



Universidade de Aveiro
2020

**Tiago João Cebolas
Bonacho**

**Transgénicos: Estado da Arte e Implicações
Bioéticas**



Universidade de Aveiro
2020

**Tiago João Cebolas
Bonacho**

**Transgénicos: Estado da Arte e Implicações
Bioéticas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Professor Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Professor Auxiliar c/ Agregação da Universidade de Aveiro

arguente

Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

orientador

Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, pela orientação que me disponibilizou ao longo deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro por me ter recebido no mestrado de Biologia Molecular e Celular, e a todos os professores com quem tive o privilégio de aprender.

Aos meus colegas de mestrado pelo seu companheirismo, em particular às pessoas com quem mais trabalhei e convivi, José Franco, Magda Correia, Rita Gouveia, Sofia Batista e Ana Martinho.

Aos meus pais e irmã por todo o apoio ao longo deste percurso.

palavras-chave

Transgênicos, OGMs, Bioética.

resumo

As tentativas de intervenção humana nas características de seres vivos sempre foram uma constante. Desde os primórdios da civilização humana, até aos dias de hoje, que o Homem tenta moldar os organismos que o rodeiam de forma a que estes lhe sejam mais vantajosos – desde a domesticação e seleção artificial de animais e plantas durante a Revolução Neolítica, até à utilização das mais precisas técnicas de engenharia genética atuais.

A criação de organismos transgênicos, sejam estas plantas, animais ou microrganismos, possui aplicabilidades em diversas áreas, como a investigação científica, medicina, agricultura/alimentação, indústria ou proteção ambiental. Contudo, estes sempre foram objeto de controvérsia a nível mundial.

Os organismos transgênicos para fins alimentares, em particular, sempre geraram dúvidas, medos, preocupações, e levaram a debates intensos e divisivos a nível mundial sobre os seus potenciais riscos para a saúde humana, ambiente e sociedade. Para além disso, poderá argumentar-se que a sua criação é incorreta por constituir uma intromissão humana na natureza.

A transmissão ao público de informações uniformes e suportadas pela ciência, decorrentes de uma comunicação fiável entre cientistas, governantes, indústria e comunicação social, poderão contribuir para eliminar possíveis perceções erradas sobre o tema e desmistificar a noção de OGM.

O objetivo do presente trabalho passou pela realização de uma revisão bibliográfica aos principais assuntos inerentes à temática dos organismos transgênicos. Foram abordados temas como os métodos para a sua transformação e deteção, áreas de aplicação, enquadramento regulatório, opinião pública, questões bioéticas e análise de um caso de estudo, sendo este a linha de milho transgênico MON 810.

keywords

Transgenics, GMOs, Bioethics.

abstract

The human being has always tried to shape characteristics of living organisms. From the dawn of human civilization to the present day that we try to shape living beings in more advantageous ways – since the domestication and artificial selection of animals and plants during the Neolithic Revolution, to the application of the most accurate genetic engineering techniques of today.

Transgenic organisms (plants, animals or microorganisms) can be applied in several areas, such as scientific research, medicine, agriculture, industry or environmental protection. However, these have always been a subject of controversy worldwide.

Transgenic organisms for food purposes, in particular, have always raised doubts, fears, concerns, and led to intense and divisive debates worldwide about risks to human health, environment and society. In addition, it can be argued that its development is incorrect because it constitutes a human intrusion into nature.

The transmission to the public of uniform and science-supported information, resulting from a reliable communication between scientists, government, industry and the media, may contribute to eliminate possible misperceptions and demystify the subject of GMOs.

The objective of this work was to do a literature review on the main topics of transgenic organisms. It addressed subjects such as transformation methods, application areas, regulatory framework, public opinion, bioethical issues and a case study analysis (transgenic maize MON 810).

Índice

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas	iv
Abreviaturas.....	v
1. Domesticação de Animais e Plantas.....	1
2. Mutagénese	4
2.1. Radiações Mutagénicas.....	4
2.2. Químicos Mutagénicos.....	5
2.3. Mutagénese Dirigida	7
3. Endonucleases de Restrição.....	9
4. Tecnologia de DNA Recombinante	11
5. Marcos Históricos no Desenvolvimento de Organismos Transgénicos	15
6. Métodos de Transformação.....	16
6.1. Eletroporação	17
6.2. Microinjeção	19
6.3. Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	21
6.4. Biobalística.....	24
7. Métodos de Detecção e Quantificação de OGMs.....	26
7.1. PCR.....	28
7.2. Microarray	30
7.3. Métodos Imunológicos Para Detecção de Proteínas.....	31
7.4. Biossensores	32
8. Transgénicos Aprovados.....	33
9. Áreas de Aplicação de Organismos GM.....	39
9.1. Plantas	39
9.2. Animais.....	45
9.3. Microrganismos.....	53
10. Enquadramento Regulatório.....	57
10.1. Regulamentos Internacionais	57
10.2. Europa.....	59
10.3. Portugal.....	66
10.4. EUA	68

11. Estudo de Caso: Milho Transgénico MON 810 Resistente a Insetos	71
12. Opinião Pública	91
13. Levantamento de Questões Bioéticas.....	101
13.1. Riscos para o Ser Humano e para o Ambiente	104
13.2. Virtude da Natureza.....	106
13.3. De Carácter Religioso	106
13.4. Desconfiança para com Grandes Empresas e Preocupações com Impactos Socioeconómicos	107
13.5. Tomada de Decisões Informadas e Debate Público.....	108
14. Conclusão	109
15. Bibliografia	114
Anexo – Proposta de Questionário para Inquérito a Estudantes da Universidade de Aveiro sobre Organismos Geneticamente Modificados	126

Índice de Figuras

Figura 1: Raça bovina <i>Belgian Blue</i> , selecionada artificialmente ao longo do tempo.....	3
Figura 2: Diferenças entre as plantas de milho e <i>tiosinto</i>	3
Figura 3: Técnica de DNA recombinante.	14
Figura 4: Técnica de microinjeção aplicada a uma célula de batata derivada de protoplastos.	19
Figura 5: Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>	24
Figura 6: Representação esquemática dos diferentes tipos de sequência alvo de DNA de um construct típico de transgene.....	28
Figura 7: Cronologia das áreas cultivadas a nível mundial por cultura GM.....	43
Figura 8: Áreas globais de produção de culturas GM.....	43
Figura 9: Construct utilizado no desenvolvimento do salmão <i>AquAdvantage</i>	50
Figura 10: Comparação entre o salmão <i>AquAdvantage</i> e o seu equivalente não-transgénico com a mesma idade.....	51
Figura 11: Processo de produção de insulina humana em <i>E. coli</i>	55
Figura 12: Mapa do plasmídeo PV-ZMBK07.....	75
Figura 13: Mapa do plasmídeo PV-ZMGT10.....	77
Figura 14: Ensaio <i>Southern Blot</i> para a análise do número de inserções na linha de milho MON 810.79	
Figura 15: Ensaio <i>Southern Blot</i> para a análise da integridade do gene Cry1Ab	80
Figura 16: Ensaio <i>Southern Blot</i> para a análise da integridade dos genes CP4 EPSPS e gox.	81
Figura 17: Área de milho MON 810 cultivada em Portugal em 2018.....	91

Índice de Tabelas

Tabela 1: Estudos mutagénicos realizados ao longo dos anos, respetivos autores e agentes utilizados .	7
Tabela 2: Diferenças entre as endonucleases de restrição de tipo I, II e III.....	10
Tabela 3: Culturas GM aprovadas na União Europeia.....	33
Tabela 4: Culturas GM aprovadas nos EUA.....	34
Tabela 5: Exemplos de plantas transgénicas utilizadas na biorremediação, respetivo gene transferido, origem e efeito.....	45
Tabela 6: Países a nível mundial que aprovaram o evento de milho MON 810, o respetivo ano e tipo de aprovação.....	72
Tabela 7: <i>Primers</i> e sondas <i>TaqMan</i> utilizadas no estudo colaborativo.....	84
Tabela 8: Elementos da reação de amplificação no volume/concentração final, por <i>eppendorf</i>	85
Tabela 9: Número de hectares de área cultivada de milho MON 810 nos respetivos países da União Europeia ao longo dos anos.....	90
Tabela 10: Valor percentual de inquiridos que apoiam a existência de alimentos GM, por país, de 1996 a 2010.....	92
Tabela 11: Valor percentual médio europeu e valor percentual obtido em Portugal relativamente às respostas obtidas no estudo <i>Eurobarometer</i> de 2010.....	94

Abreviaturas

AFP	Proteína anticongelante
APHIS	<i>US Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BADH	Betaína-aldeído desidrogenase
cDNA	DNA complementar
CTP2	Peptídeo de trânsito de cloroplasto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
E35S	Promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ENGL	<i>European Network of GMO Laboratories</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
GM	Geneticamente modificado
hmg	<i>High mobility group</i>
hsp70	Proteína de choque térmico
JRC	<i>Joint Research Centre</i>
kb	Milhar de pares de base
NOS 3'	Sequência 3' não-traduzida de nopalina sintase
nptII	Neomicina-fosfotransferase II
OGM	Organismo geneticamente modificado
Ori-pUC	Origem de replicação para os plasmídeos pUC
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
T-DNA	Região de transferência de DNA
UV	Ultravioleta

1. Domesticação de Animais e Plantas

Os antepassados do ser humano, apesar de não possuírem conceitos de genética, demonstraram a capacidade de influenciar o DNA de outros organismos. Tal deveu-se à capacidade de domesticação de animais e plantas. O termo “domesticação” refere-se à capacidade de criação de espécies em cativeiro e sua consequente modificação em relação aos seus ancestrais selvagens, de forma a que estes apresentem maiores utilidades para o ser humano (Diamond, 2002). Ao processo de seleção de determinados elementos de uma espécie atribui-se a designação de “reprodução seletiva” ou “seleção artificial”, onde ocorre a escolha de organismos com as características mais desejadas, e do posterior cruzamento entre si, com o objetivo de que estes atributos sejam transmitidos à sua descendência (Rangel, 2015).

A domesticação de animais e plantas teve início por volta de 10 000 AC entre os rios Tigre e Eufrates, na Mesopotâmia (local também apelidado por Crescente Fértil), onde atualmente se encontram os países Irão, Iraque, Turquia e Síria. Outras regiões, de forma independente, iniciaram também processos de domesticação num período temporal relativamente próximo ao da Mesopotâmia; regiões que correspondem atualmente à China, Mesoamérica, Andes/Amazônia, leste dos EUA, Sahel, oeste tropical de África, Etiópia e Nova Guiné (Diamond, 2002).

Os povos caçadores-coletores do Crescente Fértil começaram a domesticar espécies de plantas como o trigo, cevada, lentilhas e ervilhas, e espécies de animais como ovelhas, cabras, vacas e porcos, tornando-se assim nos primeiros agricultores e pastores da História (Diamond, 2002; Rutledge *et al.*, 2011). Mais tarde, começou a domesticar-se animais de maior porte, como bois e cavalos, para arar os campos e para transporte. (Rutledge *et al.*, 2011).

As utilidades para o ser humano dos organismos domesticados e selecionados artificialmente eram vastas, passando pela alimentação, vestuário e abrigo (através da obtenção de peles de animais, ou de fibras, como é o caso da planta de algodão), temperamento mais dócil dos animais, capacidade de os animais resistirem a doenças e sobreviver a climas menos favoráveis, ou até por motivos ornamentais e decorativos, como é o caso de algumas flores, como túlipas (Rutledge *et al.*, 2011).

A transição entre o estilo de vida de caçadores-coletores para produtores de alimento representou um ponto de viragem fundamental na História do ser humano. A população começou a fixar-se perto dos seus terrenos ao invés de migrar de acordo com as estações para procurar alimento, e começaram a surgir as primeiras vilas e cidades. A esta mudança deu-se o nome de Revolução Neolítica, ou Revolução Agrícola. A estabilidade que resultou de uma produção alimentar regular e previsível levou a uma explosão demográfica. Começou a existir um aumento tecnológico, uma vez

que a vida sedentária permitia a acumulação de equipamentos que os caçadores-coletores nômadas não tinham capacidade para transportar, e também porque permitiu que indivíduos, como artesãos e inventores, se dedicassem a tempo inteiro aos seus ofícios. Verificaram-se avanços na produção de ferramentas, como instrumentos agrícolas de metal e arados puxados por animais (Diamond, 2002; Rutledge *et al.*, 2011).

Uma contrapartida na domesticação de animais consistiu numa maior frequência de transmissão de doenças de animais para humanos, as quais evoluíram devido à existência de agregados populacionais mais densos; o sarampo e a tuberculose surgiram a partir de animais de gado, e as patologias provocadas pelo vírus influenza surgiram a partir de porcos e patos (Diamond, 2017).

A produção e acumulação de alimentos levou também ao início de uma estratificação social, centralização política e formação de exércitos. Os povos que o faziam possuíam vantagem sobre aqueles que não o faziam, o que levou à sua expansão e, por sua vez, à consequente disseminação dos seus genes por áreas geográficas mais vastas (Diamond, 2002).

Ao longo do tempo, os animais domesticados foram-se tornando bastante diferentes daqueles que lhes deram origem. Como exemplo, as vacas tornaram-se animais muito menos agressivos, capazes de se reproduzir ao longo dos anos e de produzir grandes quantidades de leite (Houdebine, 2017). Alguns animais de estimação, como cães (que tiveram uma provável origem nos lobos cinzentos), tornaram-se animais muito diferentes daqueles que lhes deram origem, existindo hoje espécies tão distintas como *corgis* ou *chihuahuas* (Rangel, 2015). As primeiras galinhas pesavam cerca de 1 kg; contudo, ao longo de milhares de anos de domesticação, foram selecionadas de forma a terem maiores dimensões, e atualmente podem chegar a pesar 7 kg. Para além disso, galinhas selvagens produziam apenas um pequeno número de ovos por ano, enquanto as galinhas domesticadas produzem geralmente 200 ou mais ovos por ano (Rutledge *et al.*, 2011). A raça bovina *Belgian Blue*, ilustrada pela Figura 1, representa um exemplo de uma espécie de animal de gado desenvolvida de forma a possuir uma musculatura altamente desenvolvida (Balter, 2013).



Figura 1: Raça bovina Belgian Blue, selecionada artificialmente ao longo do tempo. Adaptado de McPherron and Lee, 1997.

Uma das alterações mais drásticas na genética de plantas ocorreu com o milho. O milho foi domesticado a partir de uma planta selvagem chamada *tiosinto* (*Z. mays* ssp. *parviglumis*) no sul do México, há cerca de 9 000 anos atrás (Chen *et al.*, 2020). A planta de *tiosinto* possuía pequenas espigas com muito poucos grãos, e ao longo de milhares de anos foi reproduzida seletivamente de forma a ter espigas cada vez maiores e com um número cada vez maior de grãos, resultando na planta que hoje conhecemos como milho (Rangel, 2015). A Figura 2 demonstra as diferenças entre milho e *tiosinto*, onde em A são visíveis as diferenças morfológicas das plantas, e em B, as diferenças entre ambas as espigas produzidas.

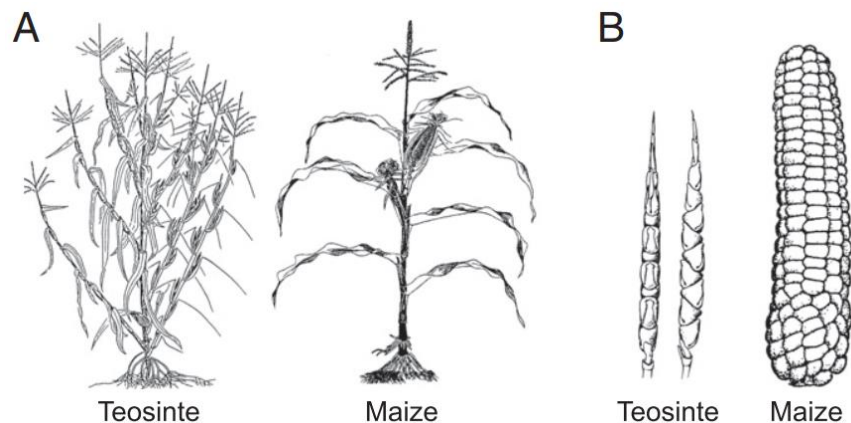


Figura 2: Diferenças entre as plantas de milho e *tiosinto*. Em A são visíveis as diferenças morfológicas das plantas; em B as diferenças entre ambas as espigas produzidas. Adaptado de Yang et al., 2019.

Embora a reprodução seletiva não seja aquilo que atualmente se considere como tecnologia de modificação genética de organismos, esta pode ser considerada como a precursora das tecnologias atuais e o primeiro exemplo da interação e influência do ser humano no material genético (Rangel, 2015). A descoberta das leis de hereditariedade por Gregor Mendel em meados do século XIX, tornou a seleção de organismos mais eficaz e mais precisa; contudo, a seleção convencional continuou estritamente dependente das mutações naturais espontâneas que ocorrem aleatoriamente em baixas frequências a cada ciclo reprodutivo (Houdebine, 2017). Por volta do ano de 1927, os cientistas começaram a induzir a ocorrência de mutações através de técnicas de mutagênese.

2. Mutagênese

A mutagênese e o *screening* de mutantes sempre representou uma ferramenta chave para os estudos de genética, permitindo identificar genes e perceber as suas funções através da observação do fenótipo alterado dos organismos mutantes (Cooper, 2019).

Os trabalhos iniciais de Thomas H. Morgan dependiam da utilização de mutações espontâneas, o que era limitante para os estudos de hereditariedade devido à sua ocorrência pouco frequente. Em 1927, Hermann Muller (Muller, 1927) observou que os raios-X tinham capacidade de provocar mutações genéticas em organismos, o que abriu caminho para os estudos de genética com indução de mutações (Flibotte *et al.*, 2010).

Estas primeiras abordagens à mutagênese impulsionadas por Muller baseavam-se em métodos que produziam mutações inteiramente aleatórias, onde as células ou organismos eram expostos a agentes mutagénicos como radiações ou químicos mutagénicos (Mandrich, 2015; DeMarini, 2020). Através destes métodos, não é possível dirigir a mutação para genes específicos ou para locais específicos dentro de um gene. Um agente mutagénico altera um número variado de genes simultaneamente, e estas mutações podem passar despercebidas caso não resultem em alterações fenotípicas que as tornem detetáveis, tais como um crescimento sensível à temperatura ou uma necessidade nutricional específica (Rehm and Reed, 1995; Cooper, 2019).

2.1. Radiações Mutagénicas

Utilizando raios-X, através do desenvolvimento de um ensaio de mutações em células germinativas (letalidade recessiva relacionada com o género), o estudo de Muller levou à indução de mutações genéticas em *Drosophila melanogaster* (DeMarini, 2020). Stadler *et al.* comprovaram a capacidade dos raios-X como agente mutagénico em milho e cevada (Stadler, 1927, 1928). As

descobertas de Muller e Stadler fizeram com que a mutagênese por raios-X dominasse o campo da genética durante os vinte anos seguintes, fornecendo uma visão sobre recombinação genética, tipos de mutações e a natureza do gene (DeMarini, 2020).

Na década de 1930 começou a explorar-se a radiação ultravioleta, cuja capacidade mutagênica foi demonstrada por Altenburg *et al.* em *Drosophila melanogaster* (Altenburg, 1933) e por Stadler *et al.* em milho (Stadler and Sprague, 1936).

A utilização de microrganismos (como esporos de fungos, bactérias e vírus) para avaliar os efeitos da radiação ultravioleta impulsionou o campo da genética, da mutagênese e daquilo que mais tarde seria chamado de reparação de DNA, por fornecer as evidências iniciais de que os ácidos nucleicos eram provavelmente o material genético, e não as proteínas, e que danos sofridos podiam ser reparados.

Hollaender *et al.* demonstraram que a mutagênese máxima induzida por radiação ultravioleta em esporos de fungos ocorria no espectro de absorção dos ácidos nucleicos, o que implicava que estes eram o material genético e a macromolécula sob a qual a radiação ultravioleta atuava para produzir mutações (Hollaender and Emmons, 1941). Contudo, a aceitação universal de que os ácidos nucleicos eram o material genético não ocorreu durante mais uma década até que os estudos de Rosalind Franklin e outros fornecessem as informações necessárias a Watson e Crick para que estes demonstrassem a estrutura do DNA (DeMarini, 2020).

2.2. Químicos Mutagênicos

Embora as tentativas para encontrar mutagênicos químicos tenham começado no ano de 1914 com Thomas H. Morgan (o qual investigou, sem resultado, os efeitos mutagênicos de álcool e éter em *Drosophila*), demonstrações claras da capacidade mutagênica de químicos apenas surgiram durante a Segunda Guerra Mundial. Utilizando ensaios de letalidade recessiva relacionada com o género para mutações em células germinativas, Charlotte Auerbach verificou que o diclorodietil sulfeto (ou gás mostarda) possuía propriedades mutagênicas (Auerbach and Robson, 1946). Pouco depois, Rapoport *et al.* demonstraram que compostos carbonilo, óxido de etileno e glicidol eram mutagênicos em células germinativas de *Drosophila* (Rapoport, 1946, 1948). Demerec *et al.* observaram que o carcinogénico químico de roedores 1,2,5,6-dibenzantraceno constituía também um agente mutagénico de células germinativas em *Drosophila* (Demerec, 1947).

A substância química mutagênica metanossulfonato de etila é uma das mais frequentemente utilizadas para produzir animais, plantas e vírus mutantes (Favor *et al.*, 2020). As suas propriedades

mutagénicas foram demonstradas em primeiro lugar por Loveless em 1959 utilizando o sistema viral T4 (Loveless, 1959). Mais tarde, demonstrou-se como administrar este químico em *Drosophila* e no nematode *C. elegans* de forma a ocorrerem mutações (Flibotte *et al.*, 2010).

O agente alquilante N-etil-N-nitrosourea representa também um mutagénico bastante utilizado desde a década de 1970 e ganhou relevância quando se verificou que se tratava do químico mais eficaz em ratos, sendo ainda hoje a escolha preferencial para este organismo (Sosa, De Gasperi and Elder, 2010).

A Tabela 1 resume as informações supracitadas, relativamente aos autores dos estudos, agentes mutagénicos, organismos utilizados e ano de realização.

Tabela 1: Estudos mutagênicos realizados ao longo dos anos, respetivos autores e agentes utilizados.

Autor	Agente mutagénico	Organismo utilizado	Ano	Referência Bibliográfica
Thomas Morgan	Álcool e Éter (sem resultado mutagénico)	<i>Drosophila melanogaster</i>	1914	(DeMarini, 2020)
Hermann Muller	Raios-X	<i>Drosophila melanogaster</i>	1927	(Muller, 1927)
Lewis Stadler	Raios-X	Milho e cevada	1927 e 1928	(Stadler, 1927, 1928)
Edgar Altenburg	Raios UV	<i>Drosophila melanogaster</i>	1933	(Altenburg, 1933)
Lewis Stadler	Raios UV	Milho	1936	(Stadler and Sprague, 1936)
Alexander Hollaender	Raios UV	Esporos de fungos	1941	(Hollaender and Emmons, 1941)
Charlotte Auerbach	Diclorodietil sulfeto (gás mostarda)	Células germinativas de <i>Drosophila melanogaster</i>	1946	(Auerbach and Robson, 1946)
Iosif Rapoport	Compostos carbonilo, óxido de etileno e glicidol	Células germinativas de <i>Drosophila melanogaster</i>	1946 e 1948	(Rapoport, 1946, 1948)
Milislav Demerec	1,2,5,6-dibenzantraceno	Células germinativas em <i>Drosophila melanogaster</i>	1947	(Demerec, 1947)
Anthony Loveless	Metanossulfonato de etila (um dos químicos mutagénicos mais utilizados em animais, plantas e vírus)	Sistema viral T4	1959	(Loveless, 1959)
William Russel	N-etil-N-nitrosourea (mutagénico químico preferencial em ratos)	Ratos	1979	(Russell <i>et al.</i> , 1979)

2.3. Mutagénesse Dirigida

A mutagénesse dirigida é o método que permite efetuar alterações específicas e intencionais à sequência de DNA, de forma a criar uma forma alterada de uma proteína através de alterações num aminoácido específico (Parekh, 2004; Mandrich, 2015). As alterações à sequência de DNA podem ser

feitas num único local ou em múltiplos locais dentro de um segmento de sequência definido, e os pares de base podem ser substituídos, inseridos ou eliminados (El-Gewely *et al.*, 2005). As alterações de nucleótidos são introduzidas numa sequência alvo através da incorporação de alterações de bases de DNA num oligonucleotido utilizado na síntese de DNA (*primer*); por exemplo, as inserções, deleções, ou mutações pontuais podem ser facilmente introduzidas utilizando *primers* adequados contendo as mutações desejadas (Cavaco and Nierstrasz, 2010).

Em 1978, Michael Smith e Clyde Hutchinson desenvolveram a primeira técnica de mutagéneses dirigida, utilizando como *primer* um oligómero de 12 nucleótidos com o desemparelhamento de um único nucleótido; como *template*, DNA ϕ X174; e uma DNA polimerase I de *E. coli* para sintetizar o DNA, de forma a construir uma molécula de DNA de cadeia dupla circular fechada com o oligonucleotido mutagénico numa das cadeias (Mandrach, 2015). A partir daí, o método evoluiu significativamente devido aos avanços nas técnicas de PCR, as quais facilitaram a criação destas alterações específicas ao DNA (El-Gewely *et al.*, 2005).

Os métodos para a mutagéneses dirigida podem classificar-se em dois grupos: baseados em PCR e não baseados em PCR. São necessários os mesmos componentes essenciais das reações de síntese de DNA: a cadeia *template*, *primers* (neste caso modificados com a alteração pretendida), os quatro dNTPs, e a DNA polimerase (Ling and Robinson, 1997).

Nos métodos baseados em PCR são utilizadas DNA polimerases termoestáveis, pelo menos dois *primers* diferentes, e múltiplos ciclos de aquecimento e arrefecimento. As vantagens deste método são o seu funcionamento mais favorável com diferentes *templates* de DNA (como cadeia de DNA simples ou dupla, ou regiões ricas em GC) e a produção de milhões de cópias do gene alvo. Uma desvantagem consiste no facto de as polimerases termoestáveis serem mais propensas a erros comparativamente com as polimerases termolábeis (Durland and Moghadam, 2020).

Nos métodos não-baseados em PCR, são utilizadas DNA polimerases termolábeis, um *primer*, e uma temperatura de reação constante (não ocorrem múltiplos ciclos como na PCR). O DNA *template* é desnaturado com uma solução alcalina ou calor, e o *annealing* entre o *template* e o *primer* modificado ocorre a 37 °C. É produzida uma molécula híbrida de DNA, com uma cadeia *template* e uma cadeia mutante sintetizada (Durland and Moghadam, 2020).

A mutagéneses dirigida possui aplicabilidades em diversas áreas, que podem ir desde a investigação científica/médica, onde é possível estudar a estrutura e atividade biológica de DNA, RNA e proteínas, até à indústria, onde podem ser obtidos processos mais eficazes.

Francis *et al.* estudaram o sistema de secreção tipo III (que constitui um fator de virulência em bactérias Gram-negativas que podem levar a infeções fatais) utilizando uma estratégia de mutagéneses

dirigida baseada em vetores pDM4. Este método permite criar mutações pontuais úteis para identificar e compreender as interações moleculares entre os componentes deste sistema (Francis *et al.*, 2017).

A β -xilosidase é uma enzima com um elevado potencial de aplicação na área da alimentação, papel e celulose, medicina, e indústria de biocombustíveis. O estudo de Dehnavi *et al.* caracterizou os resíduos de cisteína (causadores de impactos indesejados) relativamente às suas influências na estrutura, função e estabilidade de β -xilosidase de *Selenomonas ruminantium*. As proteínas com as mutações C101V e C286V apresentaram uma estabilidade térmica mais elevada comparativamente com as proteínas *wild-type*, e uma perturbação mínima na sua estrutura (Dehnavi *et al.*, 2019).

Han *et al.* utilizaram a mutagénesse dirigida para melhorar a termoestabilidade da enzima tirosina fenol-liase. O processo de catálise enzimática com tirosina fenol-liase é um dos métodos mais utilizados para a produção em escala industrial de 3,4-Dihidroxifenil-L-alanina, o fármaco de maior relevância para a doença de Parkinson. A atividade e estabilidade desta enzima representa o fator limitante na síntese do fármaco. Verificou-se que as variantes E313W e E313M possuíam uma atividade melhorada em relação à enzima *wild-type*, assim como uma meia-vida mais longa, fatores críticos para uma melhor produção do fármaco (Han *et al.*, 2020).

Detergentes para a lavagem de roupa podem conter a enzima subtilisina, a qual possui uma metionina que pode ser oxidada por lixívia, reduzindo significativamente a atividade da proteína. Esta metionina pode ser substituída por alanina, tornando-se resistente à oxidação e consequentemente mantendo a proteína ativa na presença de lixívia (Estell, Graycar and Wells, 1985).

As amílases são enzimas usadas comumente na indústria têxtil. O seu bom desempenho depende de fatores como o pH, estabilidade oxidativa e temperatura. Ben Ali *et al.* desenvolveram uma α -amilase com uma termoestabilidade melhorada através da deleção dos resíduos Ile214 e Gly215 (Ben Ali *et al.*, 2006). As celulasas possuem também aplicações na indústria têxtil. De forma a que estas demonstrem uma maior eficácia catalítica a um pH mais elevado, Becker *et al.* induziram cinco mutações pontuais (Glu223Ser, Ala224His, Leu225Val, Thr226Ala, Asp262Gly) em amílase derivada de *Trichoderma reesei* (Becker *et al.*, 2001).

3. Endonucleases de Restrição

No início dos anos de 1970 foram descobertas as endonucleases de restrição por Werner Arber, Daniel Nathans e Hamilton Smith (Nambisan, 2017). Estas enzimas possuíam a capacidade de quebrar moléculas de DNA isoladas em fragmentos que podiam ser reconstruídos em qualquer sequência desejada. Este método representou um grande avanço no que diz respeito a técnicas moleculares e tornou possível a capacidade de qualquer molécula de DNA isolada ser unida em blocos de genes, quer

do mesmo organismo quer de organismos diferentes. Este avanço na produção de moléculas de DNA recombinante deu origem à tecnologia de DNA recombinante, permitindo a modificação de genes e a criação de organismos geneticamente modificados (OGMs) (Parekh, 2004).

As endonucleases de restrição classificam-se em tipo I, II e III, por especificidade de sequência, natureza da restrição e diferenças estruturais. A Tabela 2 descreve as suas diferenças (Roberts *et al.*, 2003; Giassetti *et al.*, 2013).

Tabela 2: Diferenças entre as endonucleases de restrição de tipo I, II e III. Adaptado de Roberts *et al.*, 2003 e Giassetti *et al.*, 2013.

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Estrutura da enzima	Subunidades proteicas que funcionam como um único complexo. Duas subunidades R (clivagem), duas M (reação de metilação) e uma S (reconhecimento da sequência).	Podem existir como monómeros, dímeros e até tetrâmeros. Geralmente atuam independentemente da metiltransferase.	Enzima dimérica. Subunidade <i>mod</i> e subunidade <i>res</i> . Ambas são necessárias para a restrição. Subunidade <i>mod</i> pode funcionar independentemente para a metilação do DNA.
Local de reconhecimento	DNA de cadeia dupla	Geralmente, sequências palindrômicas de DNA de cadeia dupla.	DNA de cadeia simples
Requisito para a ativação	ATP, Mg ²⁺ e S-adenosil metionina	Mg ²⁺	ATP, Mg ²⁺ e S-adenosil metionina
Natureza da restrição	Cliva o DNA em sequências aleatórias a um Kb de distância do local de reconhecimento.	Cliva o DNA numa sequência específica, perto ou no local de reconhecimento.	Cliva o DNA a cerca de 25pb a jusante do local de reconhecimento numa sequência aleatória.

Os tipos I e III têm uma reduzida utilização em biologia molecular e engenharia genética, mas o tipo II é amplamente utilizado, uma vez que cliva o DNA numa sequência de reconhecimento específica (Giassetti *et al.*, 2013).

As endonucleases de restrição podem ser isoladas a partir de diferentes estirpes de bactérias (Nambisan, 2017), onde constituem uma defesa contra a entrada de DNA externo (como de um vírus) na célula. As bactérias possuem uma elevada variedade de endonucleases de restrição que clivam o DNA em mais de cem diferentes locais de reconhecimento, os quais consistem numa sequência específica de quatro a oito pares de base (Cooper, 2019).

As endonucleases de restrição reconhecem geralmente sequências palindrômicas e clivam o DNA em pontos específicos, chamados locais de restrição. Estas enzimas desempenham assim um papel fundamental na determinação da localização na qual o gene de interesse será inserido no genoma do vetor (Shinde *et al.*, 2018).

A clivagem por parte das endonucleases de restrição deixa terminações de cadeia simples, denominadas extremidades coesivas, que podem ser associadas entre si por emparelhamento de bases complementares. A ligação entre estas extremidades complementares é estabelecida permanentemente através de um tratamento com DNA ligase, uma enzima que tem como propósito a união de cadeias de DNA. Assim, dois tipos diferentes de fragmentos de DNA (como a inserção de DNA humano e o DNA plasmídico do vetor), preparados com as mesmas endonucleases de restrição, podem ser facilmente unidos para criar uma molécula de DNA recombinante (Shinde *et al.*, 2018; Cooper, 2019).

4. Tecnologia de DNA Recombinante

Em 1973, pouco tempo após a descoberta das endonucleases de restrição, Stanley Cohen e Herbert Boyer criaram o primeiro OGM, dando origem à tecnologia de DNA recombinante.

Foi desenvolvido um método através do qual era possível cortar e isolar especificamente um gene de um organismo e introduzi-lo noutro organismo. Através desta técnica, conseguiram transferir um gene que codifica resistência a um antibiótico de uma estirpe de *E. coli* para outra, conferindo resistência ao recetor (Cohen *et al.*, 1973).

Estudos subsequentes que transferiram genes plasmídicos de *Staphylococcus* para *E. coli* demonstraram que os genes podiam ser permutados entre espécies (Chang and Cohen, 1974).

O princípio da tecnologia de DNA recombinante, também designada por clonagem de genes ou engenharia genética (Nambisan, 2017), consiste em inserir um fragmento de DNA pretendido numa molécula de DNA denominada por “vetor”, de forma a dar origem a uma molécula de DNA recombinante. O vetor tem a capacidade de se replicar independentemente numa célula hospedeira apropriada, podendo obter-se elevadas quantidades do DNA inserido, ou do produto codificado por si (Cooper, 2019). Os passos desta técnica consistem em:

1) Seleção e isolamento do gene de interesse ou do fragmento de DNA a ser clonado.

O primeiro passo na tecnologia de DNA recombinante é a seleção de um segmento de DNA de interesse (Shinde *et al.*, 2018).

2) Inserção do gene isolado num vetor apropriado.

Um vetor atua como veículo de transporte do gene de interesse para a célula hospedeira (Rajagopal, 2012). Este consiste numa molécula de DNA auto-replicativa onde será integrado o DNA pretendido (Shinde et al., 2018). Dependendo do tamanho da inserção de DNA e propósito da experiência, vários tipos de vetores podem ser utilizados para a criação de moléculas recombinantes.

Os plasmídeos e bacteriófagos são os vetores mais comuns, uma vez que resultam num número de cópias bastante elevado.

Os vetores plasmídicos geralmente consistem em 2-4 kb de DNA, incluindo uma origem de replicação (sequência de DNA que indica à DNA polimerase da célula hospedeira o início da replicação da molécula), genes que conferem resistência a antibióticos (como resistência à ampicilina) para que as bactérias que possuem os plasmídeos possam ser selecionadas, e um local de restrição utilizado para inserir o DNA de interesse (Shinde et al., 2018; Cooper, 2019).

A enzima de restrição efetua um corte no plasmídeo, e o gene de interesse é inserido no plasmídeo através de enzimas ligase, dando origem a uma molécula de DNA recombinante. O DNA recombinante será constituído, por exemplo, pelo DNA plasmídico bacteriano e por DNA humano (gene de interesse) (Shinde et al., 2018).

3) Transformação - Introdução do vetor numa célula/organismo apropriado, denominado hospedeiro.

A molécula de DNA recombinante formada é introduzida nas células hospedeiras, chamando-se a este processo “transformação”. A célula hospedeira poderá ser uma bactéria, levedura ou célula animal. Após a introdução do plasmídeo recombinante na célula hospedeira, o portador passa a ser conhecido como hospedeiro recombinante (Rajagopal, 2012).

4) Seleção das células hospedeiras transformadas.

As células transformadas, ou células recombinantes, são as células do hospedeiro que receberam a molécula de DNA recombinante. Neste passo, as células transformadas são separadas das células não-transformadas recorrendo-se a genes marcadores. Estes genes são frequentemente marcadores antibióticos, onde as células hospedeiras com o vetor sobrevivem por lhe serem resistentes, e transmitem o DNA recombinante á sua descendência, enquanto as células sem o vetor morrem quando expostas ao antibiótico em questão (Shinde et al., 2018).

5) Expressão e multiplicação do gene introduzido no hospedeiro.

Finalmente, deve garantir-se que o DNA inserido no vetor expressa as características desejadas nas células do hospedeiro (Shinde *et al.*, 2018).

Como exemplo, fragmentos de DNA humano podem ser clonados em vetores plasmídicos. Os plasmídeos recombinantes que possuem as inserções de DNA humano podem ser introduzidos em *E. coli*, onde são replicados juntamente com as bactérias de forma a produzir milhões de cópias de DNA plasmídico. O DNA destes plasmídeos pode então ser isolado, produzindo elevadas quantidades de moléculas recombinantes que contêm um único fragmento de DNA humano. Neste exemplo, ilustrado pela Figura 3, o vetor consiste numa pequena molécula circular que contém uma origem de replicação (*ori*), um gene que confere resistência à ampicilina (*Amp^r*) e um local de restrição (como *EcoRI*) utilizado para inserir o DNA de interesse. Este DNA é ligado ao vetor, e os plasmídeos recombinantes são utilizados para transformar a bactéria *E. coli*. As bactérias são cultivadas num meio que contém ampicilina de forma a que apenas as bactérias portadoras do DNA plasmídico formem colónias. Colónias individuais de bactérias que contêm o plasmídeo podem então ser isoladas e cultivadas em grandes quantidades para o isolamento de plasmídeos recombinantes (Cooper, 2019).

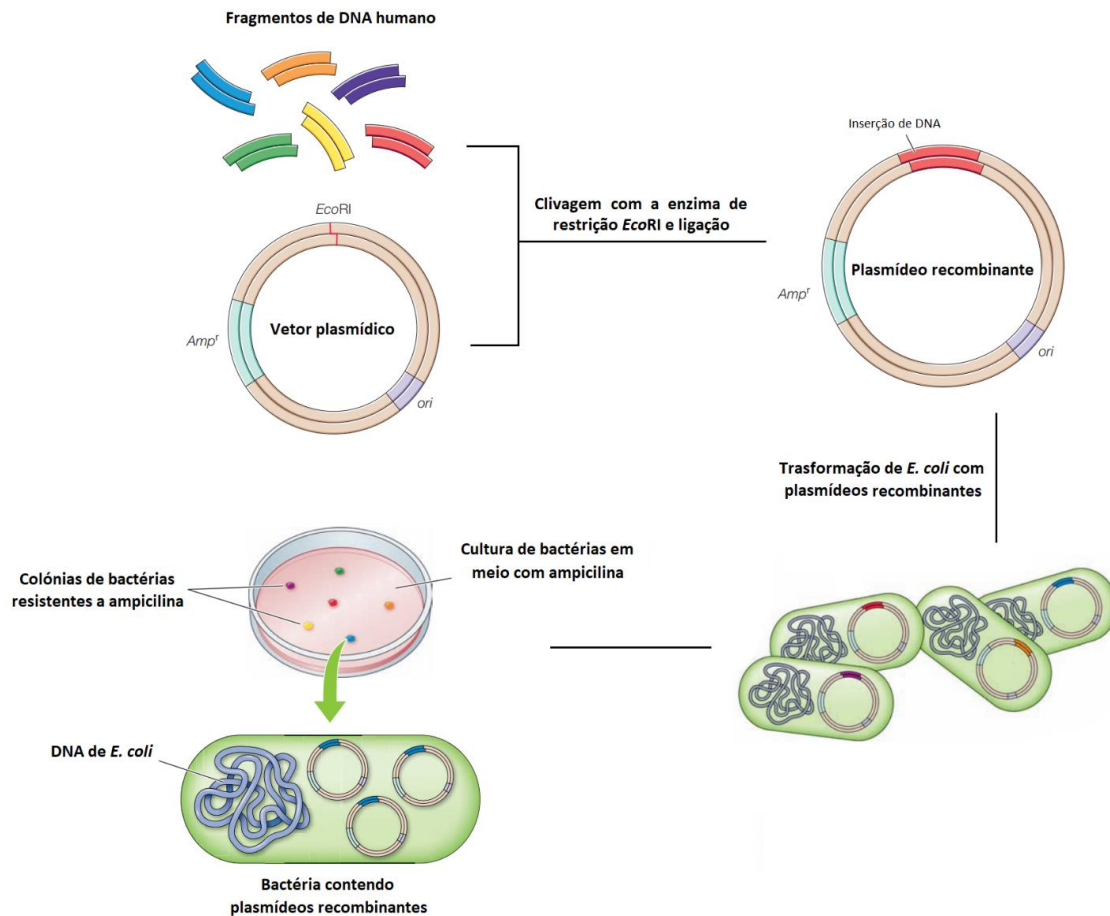


Figura 3: Técnica de DNA recombinante. Adaptado de Cooper, 2019.

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante em 1973 constituiu um passo fundamental no avanço de técnicas moleculares e impulsionou áreas como a investigação científica e a indústria. Permitiu efetuar estudos científicos como a localização específica de genes, mecanismos de regulação génica, mutações no DNA, sequenciamento de DNA e análise molecular de patologias (Shinde *et al.*, 2018).

Ao longo dos anos, com a introdução de modelos computacionais e ferramentas bioinformáticas, surgiram métodos mais robustos e precisos para a construção de OGMs com novas aplicações em diversos campos (Parekh, 2004).

5. Marcos Históricos no Desenvolvimento de Organismos Transgênicos

- **10 000 AC** - Inicia-se a domesticação de animais e plantas (Diamond, 2002).
- **1856** - Descoberta das leis de hereditariedade por Gregor Mendel (Houdebine, 2017).
- **1927** - Hermann Muller verifica a capacidade mutagênica dos raios-X (Muller, 1927).
- **1946** - Charlotte Auerbach verifica a capacidade mutagênica de uma solução química, diclorodietil sulfeto, comumente conhecida como gás mostarda (Auerbach and Robson, 1946).
- **1953** - Watson e Crick demonstram a estrutura do DNA.
- **1970** - Werner Arber, Daniel Nathans e Hamilton Smith descobrem as endonucleases de restrição (Nambisan, 2017).
- **1973** - Stanley Cohen e Herbert Boyer desenvolvem a tecnologia de DNA recombinante, criando o primeiro OGM (*E. coli*) (Cohen *et al.*, 1973).
- **1974** - Rudolf Jaenisch e Beatrice Mintz criam o primeiro animal geneticamente modificado (GM), tratando-se este de um rato. Demonstrou-se que os genes inseridos se encontravam presentes em todas as células (Jaenisch and Mintz, 1974). Contudo, o animal não transmitiu o transgene à sua descendência, o que limitou a aplicabilidade e impacto deste trabalho.
- **1976** - Criação da primeira companhia de indústria biotecnológica, *Genentech*, que pretendia explorar a tecnologia desenvolvida por Stanley Cohen e Herbert Boyer (Nambisan, 2017).
- **1977** - A companhia *Genentech* produz a primeira proteína humana, somatostatina, em *E. coli* (Nambisan, 2017).
- **1978** - A companhia *Genentech* clona o gene humano da insulina (Nambisan, 2017).
- **1981** - São criados ratos transgênicos que transmitem o transgene às gerações subsequentes (Costantini and Lacy, 1981; Gordon and Ruddle, 1981).
- **1982** - É concedida a licença à companhia *Eli Lilly and Company* do primeiro fármaco de DNA recombinante no mercado, *Humulin*, sendo produzido através da manipulação genética de *E. coli* contendo os genes da insulina humana (Johnson, 1983).
- **1983** - É desenvolvida a primeira planta GM por Mary-Dell Chilton. Neste trabalho, a planta de tabaco foi infetada com uma bactéria *Agrobacterium tumefaciens* transformada com um gene de resistência a antibiótico (Bevan, Flavell and Chilton, 1983).
- **1984** - São desenvolvidos ratos transgênicos portadores de oncogenes clonados, tornando-os suscetíveis ao desenvolvimento de cancro (Hanahan, Wagner and Palmiter, 2007)

- **1985** – São produzidos os primeiros animais transgênicos de gado, nomeadamente, ovelhas, porcos e coelhos (alterações apenas realizadas a nível experimental e de investigação, não sendo destinadas a consumo humano) (Hammer *et al.*, 1985).
- **1986** – É aprovado pela primeira vez o cultivo comercial de uma planta GM, nos EUA (tabaco *Roundup Ready*, resistente ao herbicida glifosato) (Newton, 2014).
- **1986** – É produzida a primeira proteína relevante a nível farmacêutico em plantas, sendo esta a hormona de crescimento humano, desenvolvida na planta de tabaco (Ma, Drake and Christou, 2003).
- **1989** – É criado o primeiro rato *knockout*, onde um gene foi alvo de supressão (Bevan, 2010).
- **1989** – É desenvolvido o primeiro anticorpo em plantas, expresso na planta de tabaco (Ma, Drake and Christou, 2003).
- **1992** – A China torna-se o primeiro país a cultivar uma planta GM (estirpe de tabaco resistente a vírus) (Wells, 2019).
- **1992** – É produzida pela primeira vez uma vacina experimental em plantas, dirigida contra o vírus da hepatite B (Ma, Drake and Christou, 2003).
- **1994** – É aprovada a primeira planta GM para cultivo comercial na Europa, sendo esta uma planta de tabaco resistente ao herbicida bromoxinil (Wells, 2019).
- **1994** – É aprovado para comercialização, nos EUA, o primeiro alimento GM, sendo este a variedade de tomate *Flavr Savr* (Wells, 2019).
- **1998** – A União Europeia aprova o cultivo de milho GM MON 810 (Newton, 2014).
- **2003** – É comercializado o primeiro animal GM, nos EUA. Trata-se do peixe zebra *GloFish*, ao qual foi adicionado um gene fluorescente que lhe permite brilhar no escuro sob luz ultravioleta (Vàzquez-Salat *et al.*, 2012).
- **2015** – É aprovado o primeiro animal GM no mercado alimentar, nos EUA (salmão *AquAdvantage*) (FDA, 2019).

6. Métodos de Transformação

Os principais métodos de transferência de genes para hospedeiros (processo designado por “transformação”), consistem na eletroporação, microinjeção, biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium*.

A transferência de DNA para o interior de microrganismos e células animais pode considerar-se um processo relativamente acessível. Contudo, a parede celular rígida de células vegetais representa uma barreira na captação de DNA externo para o seu interior (Nicholl, 2008). Este obstáculo poderá ser contornado através da criação de protoplastos, os quais são produzidos através do tratamento enzimático de células vegetais onde é digerida a parede celular (Heller, 2006).

6.1. Eletroporação

A eletroporação tem sido amplamente utilizada para transformar células animais, protoplastos vegetais, leveduras e bactérias (Heller, 2006).

A técnica baseia-se na aplicação de pulsos elétricos a células, protoplastos ou tecidos suspensos em meio de cultura líquido numa câmara de descarga. Os pulsos elétricos, curtos e de alta intensidade, provocam alterações de polaridade na membrana, permeabilizando reversivelmente a bicamada fosfolipídica das membranas celulares através da formação de poros transitórios (Kole *et al.*, 2010; Gosal and Wani, 2018). Estes poros permitem a ocorrência de uma difusão de macromoléculas (incluindo ácidos nucleicos, como o vetor pretendido) presentes no meio envolvente, para o interior da célula (Asfaw and Assefa, 2019); desta forma, o DNA, carregado negativamente, tem a capacidade de movimentar-se através de um gradiente de potencial elétrico para o seu interior (Zhang, Wohlhueter and Zhang, 2016). Para ser alcançada a eficácia desejada é necessário ter em conta, e otimizar, fatores como a densidade celular, fase de crescimento, meio de cultura utilizado e parâmetros da eletroporação (Parekh, 2004). O tempo e voltagem aplicados dependem do tipo de célula e tecido em causa (Kole *et al.*, 2010). A técnica não provoca alterações nas funções celulares ou na integridade da membrana (Gosal and Wani, 2018).

Em plantas, as células em crescimento em meio de cultura são despojadas da sua parede celular para produzir protoplastos. O DNA de interesse é então fornecido ao meio de cultura, sendo aplicados de seguida os pulsos elétricos (Holban and Grumezescu, 2018; Low *et al.*, 2018).

Os parâmetros mais frequentemente utilizados são uma voltagem de 25 mV e uma amperagem de 0.5 mA durante 15 minutos (Barampuram and Zhang, 2011). As paredes celulares espessas dos tecidos intactos representam uma barreira física chave para a eletroporação, tornando esta técnica apenas aplicável a protoplastos, o que faz com que não seja comumente utilizada na transformação de plantas (Barampuram and Zhang, 2011; Low *et al.*, 2018).

As células transformadas têm a capacidade de regenerar as suas paredes celulares e desenvolverem-se em plantas transgênicas (Holban and Grumezescu, 2018).

A eletroporação mostrou-se capaz de transformar com sucesso protoplastos de dicotiledóneas e monocotiledóneas.

A utilização de eletroporação em cana de açúcar é um exemplo da sua aplicação em monocotiledóneas, onde o gene *gusA* foi transferido para um tecido de meristema intacto com uma percentagem de eficácia de transformação de 80% (Barampuram and Zhang, 2011). Outros exemplos incluem as monocotiledóneas arroz e milho, e as dicotiledóneas soja, colza e tabaco (Kole *et al.*, 2010).

Comparativamente com a biobalística, a eletroporação não é tão dispendiosa e é um método relativamente mais simples para a transformação de plantas (Barampuram and Zhang, 2011; Low *et al.*, 2018). Contudo, e embora esta seja uma alternativa à biobalística, a eficácia da eletroporação é reduzida, e o seu sucesso verifica-se num baixo número de espécies (Barampuram and Zhang, 2011).

Outras desvantagens da técnica passam pela dificuldade, em diversas espécies, da regeneração de plantas transgênicas férteis a partir dos protoplastos que sofreram eletroporação, sendo esta particularmente difícil em monocotiledóneas (Kole *et al.*, 2010; Gosal and Wani, 2018).

A eletroporação em animais pode ser realizada em espermatozoides (os quais vão transportar o DNA exógeno para o óvulo durante a fertilização), óvulos ou embriões.

As células alvo são colocadas em solução com o DNA de interesse e submetidas a pulsos elétricos de alta voltagem durante uma curta duração (microssegundos) (Wheeler, Walters and Clark, 2003).

A eletroporação tem sido utilizada como uma alternativa aos métodos de microinjeção em peixes, sendo tecnicamente mais simples, não necessita de uma perícia tão grande como a microinjeção e são produzidos elevados números de organismos rapidamente.

Pesquisas obtiveram sucessos consistentes utilizando tanto peixes de água doce como salgada, tais como peixe-zebra, bagre-americano, carpa e dourada, com índices de integração entre 25-75% (Pinkert, 2014).

A eletroporação, apesar de ter sido inicialmente concebida para eucariotas, resulta com igual sucesso em procariotas.

Em bactérias, esta é uma das técnicas mais eficazes e mais utilizadas para a introdução de DNA (Parekh, 2004; Srivastava, 2013).

Alguns exemplos de microrganismos transformados por eletroporação e a sua respetiva aplicação comercial são: *Aspergillus*, para fermentações alimentares; leveduras, para fermentações de alimentos e bebidas; *Corynebacterium*, para a produção de aminoácidos; *Bacillus*, para a produção de antibióticos; e bactérias ácido-lácticas para fermentações alimentares (Parekh, 2004).

6.2. Microinjeção

A microinjeção é um processo microcirúrgico que consiste na introdução mecânica direta de DNA externo no núcleo ou citoplasma de uma única célula. Para tal, é utilizada uma pipeta de injeção microcapilar de vidro, um dispositivo de posicionamento de precisão (micromanipulador) para controlar o movimento da micropipeta e um microinjeter (Barampuram and Zhang, 2011; Asfaw and Assefa, 2019).

Esta técnica tem sido utilizada com sucesso em células de animais e plantas (Nicholl, 2008). A Figura 4 ilustra a técnica de microinjeção aplicada a uma célula de batata derivada de protoplastos.

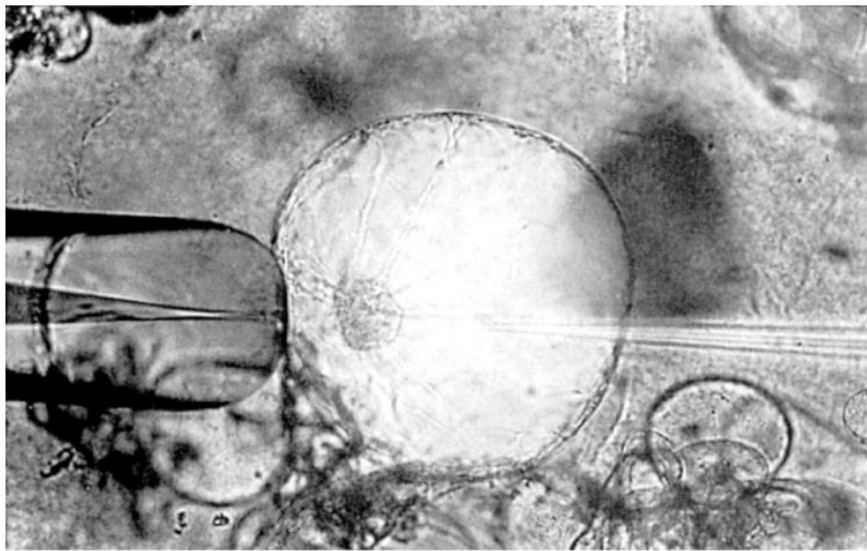


Figura 4: Técnica de microinjeção aplicada a uma célula de batata derivada de protoplastos. Adaptado de Nicholl, 2008.

A microinjeção pronuclear foi a primeira técnica de transferência de genes concebida especificamente para produzir animais transgênicos de linha germinativa (Wall, 2002) e é o método mais utilizado para a transferência de genes em animais (Miao, 2012). O método envolve a coleta de óvulos de dadores em superovulação (submetidos a um tratamento hormonal), transferência de um *construct* gênico desejado para o pronúcleo de células reprodutiva, a cultura *in vitro* das células manipuladas para se desenvolverem até uma fase embrionária específica, e a transferência das células embrionárias para uma fêmea recetora (Miao, 2012; Houdebine, 2017).

Após a transferência, os embriões manipulados desenvolvem-se e a sua descendência é analisada quanto à presença do transgene (Echelard and Meade, 2003). São utilizados procedimentos

de PCR ou *Southern blot* para detetar a descendência que possui os transgenes (Miao, 2012). O DNA introduzido poderá resultar na sobreexpressão ou subexpressão de genes, ou na expressão de genes totalmente novos para essa espécie animal (Onyinye *et al.*, 2019).

A primeira transferência de genes por microinjeção de DNA efetuada com sucesso foi realizada em ratos na década de 1980, e representa ainda o método mais utilizado nesta espécie animal (Miao, 2012; Giassetti *et al.*, 2013). Para além disso, esta técnica tem também sido aplicada com sucesso em outros animais, como aves, coelhos, porcos, ovelhas, cabras, peixe e também *Drosophila* e outros insetos (Giassetti *et al.*, 2013).

As vantagens da microinjeção aplicada a animais passam pela sua versatilidade, podendo ser aplicada a uma ampla variedade de espécies, e a sua simplicidade (apesar de a manipulação do embrião poder ser desafiante) (Wall, 2002; Echelard and Meade, 2003; Miao, 2012; Onyinye *et al.*, 2019). O método permite ainda uma integração precoce do transgene no DNA do hospedeiro, o que é vantajoso para garantir a presença do DNA transgénico em todas as células do hospedeiro (Onyinye *et al.*, 2019).

No entanto, existem várias desvantagens associadas. A sua baixa eficácia poderá atribuir-se à fraca sobrevivência do embrião, baixos índices de integração do transgene, e comportamentos imprevisíveis do transgene (Wall, 2002). A integração do transgene no genoma é um processo aleatório, e o número de integrações, a sua posição no genoma, e o número de cópias do transgene por célula são imprevisíveis; há uma elevada probabilidade de que o gene introduzido não se insira num local do hospedeiro que permita a sua expressão (Echelard and Meade, 2003; Giassetti *et al.*, 2013; Onyinye *et al.*, 2019). Verifica-se também a criação frequente de animais com mosaïcismo, transportando o transgene em apenas algumas das suas células (Echelard and Meade, 2003).

Em ratos, o rendimento desta técnica é de 1-3 transgénicos por 100 embriões microinjetados e transferidos. Por razões desconhecidas, a eficácia da integração de DNA é menor em todas as outras espécies de mamíferos para além de ratos e coelhos, e muito baixa em ruminantes (Houdebine, 2017). A frequência de integração do transgene no genoma de animais de dimensões mais elevadas é baixa; os embriões microinjetados produzem apenas uma descendência transgénica entre menos de 0.1% em animais de gado e até 2% em porcos (Echelard and Meade, 2003).

A microinjeção é uma técnica preferencialmente utilizada na transformação de células animais, uma vez que a presença de uma parede celular rígida dificulta a sua aplicação em células vegetais (Khachatourians *et al.*, 2002). Contudo, esta pode também ser aplicada em plantas, embora raramente (Barampuram and Zhang, 2011; Zhang, Wohlhueter and Zhang, 2016). A microinjeção poderá ser utilizada para a introdução de genes em células individuais, embrioides derivados de micrósporos ou protoplastos individuais (Kole *et al.*, 2010).

As células recetoras ou protoplastos são imobilizados com um capilar de retenção, ou em géis, ou com superfícies revestidas com *poly-L-lysine* (Kole *et al.*, 2010). O DNA é então injetado no citoplasma ou núcleo com recurso a equipamentos eletromecânicos para controlar a inserção das finas agulhas de vidro na célula (Kole *et al.*, 2010; Barampuram and Zhang, 2011). As células recetoras são cultivadas, em meio de cultura contendo um agente seletivo, de forma a selecionarem-se aquelas que integraram o gene (Kole *et al.*, 2010), sendo posteriormente regeneradas em plantas (Barampuram and Zhang, 2011).

A produção de colza transgénica revelou-se exequível por microinjeção em embrioides derivados de micrósporos (Khachatourians *et al.*, 2002). Verificou-se também a produção de alfafa transgénica através da injeção de plasmídeos Ti em protoplastos de alfafa, com eficácias de transformação de 26% (Kole *et al.*, 2010). Observou-se também uma regeneração com sucesso de colza, tabaco e cevada microinjetadas que resultaram em transgénicos estáveis (Barampuram and Zhang, 2011).

A técnica apresenta algumas desvantagens como a necessidade de equipamentos técnicos relativamente dispendiosos para a micromanipulação de células individuais (Barampuram and Zhang, 2011), o facto de ser um processo moroso e exaustivo (Kole *et al.*, 2010; Barampuram and Zhang, 2011), a necessidade de pessoal técnico altamente capacitado (Low *et al.*, 2018), e a dificuldade de regeneração das plantas, impedindo a sua utilização de uma forma mais ampla (Herrera, Simpson and Trujillo, 2005).

6.3. Transformação mediada por *Agrobacterium*

A transformação mediada por bactérias *Agrobacterium* é, a par com a transformação por biobalística, a técnica mais comumente utilizada na transformação de plantas (Barampuram and Zhang, 2011). Esta é eficaz numa ampla variedade de plantas, especialmente em dicotiledóneas como a batata, tomate e tabaco (Rani and Usha, 2013)

As agrobactérias são bactérias patogénicas Gram-negativas, naturalmente existentes nos ecossistemas do solo, que provocam as doenças galha-da-coroa ou raízes-em-cabeleira em plantas.

Existem dois tipos de bactérias *Agrobacterium* que são frequentemente utilizadas na transformação de plantas, nomeadamente, *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* (Low *et al.*, 2018).

As bactérias *Agrobacterium tumefaciens* contêm o plasmídeo indutor de tumor Ti, o qual codifica a informação genética para o crescimento tumoral, e que provoca a doença galha-da-coroa. As

bactérias *Agrobacterium rhizogenes* contêm o plasmídeo Ri, indutor da doença raízes-em-cabeleira (Barampuram and Zhang, 2011).

Estas duas espécies fornecem sistemas de vetores eficazes para o desenvolvimento de plantas transgênicas, tendo sido transformadas com sucesso diversas plantas como arroz, milho, cevada e tabaco (Low *et al.*, 2018).

As bactérias *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas na transformação de plantas são bactérias modificadas que não possuem os genes indutores de tumor e de síntese de opina. Estes genes são removidos dos plasmídeos bacterianos e substituídos pelo gene externo desejado ou por marcadores selecionáveis, tornando-os vetores úteis que permitem a incorporação de genes externos no genoma da planta.

A opina, juntamente com a auxina e citocinina, são os principais causadores da formação de tumor em plantas, levando à doença de galha-da-coroa. As fito-hormonas auxina e citocinina são as responsáveis pela proliferação descontrolada das células vegetais. As opinas são a principal fonte de carbono utilizada por *Agrobacterium tumefaciens*, não sendo naturalmente sintetizadas pelo metabolismo da planta; a bactéria vai garantir a sua própria produção de nutrientes através da modificação genética das células do hospedeiro (Low *et al.*, 2018).

Os plasmídeos Ti utilizados para a transformação possuem uma região de transferência de DNA (T-DNA) e uma região de virulência. A região T-DNA é transferida para o genoma da planta e possui um tamanho de cerca de 24 kb. A região de virulência codifica os genes *vir*, que auxiliam na transferência de T-DNA (Low *et al.*, 2018).

Uma incorporação estável de genes passa passos descritos de seguida e ilustrados pela Figura 5.

1) Reconhecimento do hospedeiro por sinalização química.

A ocorrência de dano num tecido da planta leva à produção de compostos fenólicos que induzem a quimiotaxia bacteriana (Pratiwi and Surya, 2020).

2) Ligação de *Agrobacterium* às células da planta.

As bactérias ligam-se à superfície das células vegetais através de ligações dependentes e não dependentes de polissacarídeos unipolares, estabelecendo um local para a formação de biofilmes multicelulares, elaboração de matriz, divisão celular e maturação dos biofilmes (Pratiwi and Surya, 2020).

3) Ativação dos genes *vir* em *Agrobacterium*.

Os genes *vir* são induzidos pelos compostos fenólicos produzidos. Existem oito operões no plasmídeo Ti, nomeadamente, *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* e *virH*. A planta de tabaco, por exemplo, produz o composto fenólico acetoseringona em resposta a um ferimento, como parte do seu sistema de defesa contra microrganismos invasores. Contudo, este composto fenólico não destrói a bactéria *Agrobacterium*; induz a expressão dos seus genes *vir*. A proteína VirA, produto do gene *virA*, é recetora dos compostos fenólicos produzidos pela planta, e a sua ligação resulta na fosforilação da proteína VirG, produto do gene *virG*. Na sua forma fosforilada, a proteína VirG reconhece e liga-se às sequências promotoras dos restantes genes *vir*, tornando-os ativos (Fosket, 1994).

4) Produção da cadeia de T-DNA.

O T-DNA é clivado do plasmídeo Ti pelas enzimas VirD1 e VirD2. A helicase sítio-específica VirD1 desenrola o T-DNA de cadeia dupla. A nuclease VirD2 cliva a cadeia de T-DNA tornando-a numa cadeia de DNA simples e linear, denominada cadeia T (Pratiwi and Surya, 2020).

5) Transferência do T-DNA para o núcleo da planta.

As proteínas VirD2 e VirE2 conduzem a cadeia T (formando o complexo T) para o núcleo do hospedeiro. Para além disso, protegem a cadeia T de qualquer atividade digestiva de nucleases. O complexo T no citoplasma da planta é transportado para o núcleo da planta através do retículo endoplasmático (Pratiwi and Surya, 2020).

6) Integração do T-DNA no genoma da planta.

A integração do T-DNA ocorre em locais aleatórios. A proteína VIP1 efetua a mediação entre o complexo T e os mononucleossomas. Quando o complexo T entra no núcleo da planta, os seus componentes proteicos são removidos pelo sistema ubiquitina-proteassoma, de forma a que a cadeia T seja exposta; a proteína VirF auxilia neste processo (Pratiwi and Surya, 2020).

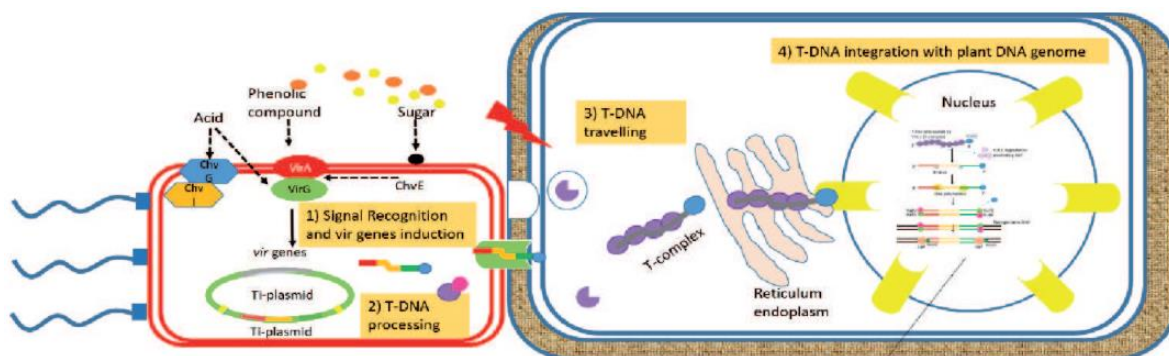


Figura 5: Transformação mediada por *Agrobacterium*. Adaptado de Pratiwi and Surya, 2020.

As vantagens da transformação mediada por *Agrobacterium* incluem a capacidade de transferir segmentos de DNA relativamente grandes; existência de uma estabilidade relativamente elevada do gene transferido; integrações de DNA geralmente bem definidas, com um baixo número de cópias, nos cromossomas da célula hospedeira (Hwang, Yu and Lai, 2017); expressão génica consistente ao longo das gerações subsequentes (Barampuram and Zhang, 2011); alta qualidade e fertilidade das plantas transgénicas resultantes (Azegami, Yuki and Kiyono, 2020); protocolos relativamente simples e pouco dispendioso, com um custo reduzido do equipamento necessário (Farias and Chaves, 2008; Hwang, Yu and Lai, 2017); e existência de protocolos desenvolvidos e otimizados para a transformação de várias espécies (Baltes, Gil and Voytas, 2017).

Por outro lado, existem desvantagens como o facto de algumas espécies de plantas serem recalcitrantes à transformação por *Agrobacterium* (Hwang, Yu and Lai, 2017), ou então a necessidade de longos períodos de cultura de tecidos (Baltes, Gil and Voytas, 2017).

6.4. Biobalística

A biobalística, também designada por bombardeamento de microprojéteis ou tecnologia de bombardeamento de partículas, é, a par com a transformação mediada por *Agrobacterium*, o método mais utilizado para a transferência de genes para plantas (Barampuram and Zhang, 2011).

A biobalística foi desenvolvida inicialmente por Sanford *et al.* na década de 1980 para modificar geneticamente plantas que apresentavam resistência à transformação por *Agrobacterium*, nomeadamente monocotiledóneas (Wheeler, Walters and Clark, 2003; Gosal and Wani, 2018; Low *et al.*, 2018).

A técnica envolve o revestimento de microprojéteis (partículas transportadoras de alta densidade, como partículas de ouro ou tungstênio, de aproximadamente 0.5-5 µm diâmetro) com o DNA de interesse (Heller, 2006; Barampuram and Zhang, 2011), na presença de cloreto de cálcio e espermidina. A espermidina auxilia na estabilização da estrutura de DNA e aumenta a ligação do DNA aos microprojéteis (Low *et al.*, 2018).

Os microprojéteis são então acelerados a altas velocidades de forma a penetrarem na célula. Sob um vácuo parcial, hélio enche o tubo de aceleração de gás e o microprojétil é disparado. O hélio cria uma pressão atrás de um disco de ruptura, o qual “explode” a uma pressão específica, libertando uma onda de choque, e os projéteis embatem e penetram no tecido alvo, entregando o DNA (Barampuram and Zhang, 2011). O DNA é separado das partículas de metal e integra-se nos cromossomas dentro do núcleo da célula da planta (Low *et al.*, 2018).

Existem diversos fatores que devem ser considerados para a transferência de genes utilizando a biobalística, como a quantidade e qualidade do DNA transferido e a utilização de um vetor adequado com um pequeno tamanho e elevado número de cópias.

O tipo e tamanho dos microprojéteis são fatores importantes porque afetam a profundidade da sua penetração e o grau de dano às células alvo.

O grau de penetração necessário depende da espessura da parede celular, tipo de tecido a ser transformado e profundidade das camadas celulares alvo. As variações na pressão de hélio, o nível de vácuo gerado, o tamanho das partículas, e a posição dos tecidos alvo, vão ditar o impulso e a capacidade de penetração com que os projéteis atingem os tecidos (Barampuram and Zhang, 2011).

A técnica pode ser utilizada para transformação nuclear e de cloroplastos, e podem ser utilizados como alvo, células, protoplastos, tecidos organizados como meristemas (grupo de células não diferenciadas com mitose ativa), embriões, ou calos vegetais (Gosal and Wani, 2018).

O método de biobalística é mais frequentemente utilizado em culturas de monocotiledóneas como o arroz, milho e trigo, onde a transformação mediada por *Agrobacterium* tem alcançado um menor sucesso (Rani and Usha, 2013), mas ambos os tipos de plantas dicotiledóneas e monocotiledóneas têm sido transformadas por biobalística. Exemplos incluem a transferência do gene *shGH* para a planta monocotiledónea *Oryza sativa*, com uma eficácia de transformação de 79.5%, e a transferência do gene *Os-mALS* para a planta dicotiledónea *Glycine max*, com uma eficácia de transformação de 60% (Barampuram and Zhang, 2011).

As principais vantagens do método passam pela sua capacidade mecânica de atravessar membranas biológicas (Wheeler, Walters and Clark, 2003), transformar uma grande variedade de espécies de plantas (o que é especialmente vantajoso quando a técnica de *Agrobacterium* não é tão

eficaz) (Herrera, Simpson and Trujillo, 2005), simplicidade do protocolo, capacidade de inserir grandes fragmentos de DNA (Baltes, Gil and Voytas, 2017), ausência de incompatibilidades biológicas que são encontradas quando se utilizam vetores biológicos (Heller, 2006), processo menos tóxico comparativamente com o de *Agrobacterium* (Low *et al.*, 2018), e uma ampla variedade de tipos de explantes pode ser submetida ao bombardeamento de partículas e obter-se plantas férteis (Herrera, Simpson and Trujillo, 2005).

No entanto, poderá ocorrer a integração de múltiplas cópias do transgene, levando ao silenciamento do gene de interesse na planta transformada (Barampuram and Zhang, 2011), existe a impossibilidade de controlar o alvo celular (como o citoplasma, núcleo, mitocôndrias ou plastídeos) (Baltes, Gil and Voytas, 2017), o equipamento é dispendioso, e a planta poderá sofrer danos tecidulares severos (Azegami, Yuki and Kiyono, 2020).

Comparações entre a biobalística e o método de *Agrobacterium*, utilizando hibridação *in situ* fluorescente, mostraram que em termos de eficácia de transformação, número de cópias do transgene, expressão, capacidade de transmissão para a descendência, e estrutura física do *loci* transgênico, o método de *Agrobacterium* em geral possuía vantagens significativas em relação à biobalística (Gosal and Wani, 2018).

Para além de plantas, a biobalística pode também ser aplicada em células de animais e microrganismos (Wheeler, Walters and Clark, 2003); contudo, não é muito utilizada em procariontes pela existência de outros métodos mais práticos (Srivastava, 2013).

7. Métodos de Detecção e Quantificação de OGMs

A autorização e colocação no mercado de OGMs requer a submissão de métodos específicos que permitam efetuar a sua deteção e quantificação em produtos alimentares ou agrícolas. O desenvolvimento e aplicação destes métodos é essencial para avaliar a conformidade dos produtos com as regulações vigentes, verificando-se se o OGM é ou não autorizado, e se a sua quantidade presente requer a rotulagem do produto (Bonfini *et al.*, 2001).

Na Europa, o *Joint Research Centre* (JRC) é responsável pela validação destes métodos (European Commission, 2016b). O primeiro método validado na União Europeia foi um método de *screening* baseado em PCR capaz de detetar a maioria dos OGMs aprovados para comercialização na altura. Este método, desenvolvido por Pietsch *et al.* em 1997, baseou-se na deteção das sequências flanqueadoras do gene introduzido, nomeadamente no promotor *35S* e no terminador *nos*. Desde então, diversos métodos baseados em PCR foram desenvolvidos e validados (Querci *et al.*, 2020).

Independentemente da possibilidade de utilização de outros métodos, é a PCR, nos seus vários formatos, que tem sido aceite de uma forma global pelas autoridades reguladoras para a identificação e quantificação de OGMs (Marmioli *et al.*, 2008).

Em 2012, a base de dados de métodos de deteção da Comissão Europeia continha 118 diferentes métodos de PCR que permitiam a identificação de 51 eventos individuais GM. Dentro destes métodos, 61% permitem uma identificação específica de evento de um OGM e, em particular, a sua determinação quantitativa (56%). 18% dos métodos permite fazer avaliações de *screening* com um propósito qualitativo (15%) ou quantitativo (3%). Os restantes 21% são métodos específicos de *construct* (Bonfini *et al.*, 2012).

O termo “evento” é utilizado para definir a inserção de um determinado transgene numa localização específica de um cromossoma, permitindo nomear diferentes variedades de culturas GM.

Os passos analíticos estipulados pela legislação europeia consistem na deteção, identificação e quantificação de OGMs (Conceição, Moreira and Binsfeld, 2006).

Na deteção ou *screening* de OGMs, o objetivo passa por determinar se um produto contém ou não um OGM. Para tal, é utilizado um método de *screening*, e o resultado obtido será expresso na forma “positivo” ou “negativo” (Bonfini *et al.*, 2001).

O propósito da identificação é revelar quantos OGMs diferentes estão presentes e se estes estão ou não autorizados. Para as identificações serem efetuadas, é necessária a existência de informações específicas disponíveis sobre o OGM, como detalhes sobre a sua composição molecular (Bonfini *et al.*, 2001; Anklam *et al.*, 2002).

Quanto à quantificação, se se verificar que um produto alimentar contém um ou mais OGMs autorizados, então torna-se necessário enquadrar a sua presença de acordo com os limites estipulados, através da determinação das quantidades presentes (Bonfini *et al.*, 2001; Anklam *et al.*, 2002).

A base de dados de métodos de deteção da Comissão Europeia divide os métodos em dois grupos de acordo com o âmbito da PCR, nomeadamente, quantitativos e qualitativos. Por sua vez, é efetuada uma subdivisão segundo a especificidade do alvo, tratando-se de ensaios específicos de OGM ou ensaios específicos de grupo taxonómico (Bonfini *et al.*, 2012).

Os métodos específicos de OGM têm como alvo diferentes tipos de sequência de DNA, com diferentes graus de especificidade. Estas poderão ser, segundo um grau crescente de especificidade, sequências de *screening*, específicas de gene, específicas de *construct* e específicas de evento. (Mafra, 2011).

As sequências de *screening* são sequências amplamente utilizadas em diversos OGMs, tais como o promotor CaMV 35S, o terminador CaMV 35S ou a neomicina fosfotransferase II (*nptII*). As

sequências específicas de gene consistem em sequências existentes no interior de um transgene e podem ser comuns a diversos eventos de transformação (Marmioli *et al.*, 2008; Mafra, 2011). As sequências específicas do *construct* genético utilizado abrangem a junção entre dois elementos de DNA, como o promotor e o transgene (Marmioli *et al.*, 2008; Bonfini *et al.*, 2012). As sequências específicas de evento permitem identificar de forma única a presença de um determinado OGM; contêm a junção única entre o DNA inserido e o genoma do recetor (Mafra, 2011; Bonfini *et al.*, 2012).

Na Figura 6 encontra-se a representação esquemática dos diferentes tipos de sequência alvo de DNA de um *construct* típico de transgene (consistindo num promotor, no gene de interesse e num terminador). As setas indicam os pares de *primers* que têm como alvo as sequências em redor ou interior do local de integração do transgene (Marmioli *et al.*, 2008).

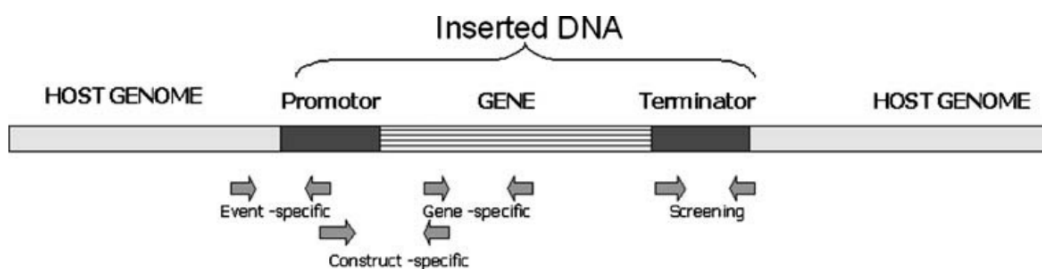


Figura 6: Representação esquemática dos diferentes tipos de sequência alvo de DNA de um *construct* típico de transgene. Adaptado de Marmioli *et al.*, 2008.

Os principais ensaios utilizados são a PCR, a qual se baseia na detecção das novas sequências de DNA inseridas, e métodos imunológicos como ELISA, onde são identificadas as proteínas expressas pelo transgene (Mafra, 2011; Querci *et al.*, 2020). A elevada estabilidade da molécula de DNA torna-a no analito preferencial para a maioria das amostras, sejam estas matérias-primas, ingredientes ou alimentos processados (Bonfini *et al.*, 2001; Anklam *et al.*, 2002). Comparativamente com abordagens baseadas na detecção de proteínas, a PCR é mais sensível, o tempo necessário para a produção de *primers* é baixo comparativamente com a produção de anticorpos, a PCR tem a capacidade de discriminar entre diferentes tipos de eventos (Querci *et al.*, 2020).

7.1. PCR

A PCR permite a amplificação seletiva de segmentos específicos de DNA existentes em número reduzido de cópias numa mistura complexa com outras sequências de DNA. São utilizadas pequenas sequências complementares de DNA em pares, designadas por *primers*. O par de *primers* é concebido

para hibridizar com locais de reconhecimento de sequências complementares em cadeias opostas do DNA alvo. Através de uma série de repetições de ciclos térmicos diferenciais, a DNA polimerase contribui para a replicação e amplificação exponencial da sequência entre o par de *primers*. Por fim, as sequências amplificadas são submetidas a uma eletroforese em gel de forma a que a sua presença possa ser visualizada com base no seu tamanho (Querci *et al.*, 2020).

Um pré-requisito para a detecção e quantificação de OGMs por PCR é o conhecimento da sequência de DNA e o tipo de modificação genética, incluindo a composição molecular do gene introduzido e os seus elementos reguladores, como promotores e terminadores (Marmioli *et al.*, 2008; Querci *et al.*, 2020). A PCR é uma técnica com uma elevada sensibilidade e especificidade, e é eficaz com um vasto número de amostras, podendo estas estar envelhecidas ou altamente processadas (Bonfini *et al.*, 2001; Anklam *et al.*, 2002).

Contudo, uma grande desvantagem da PCR convencional é a sua falta de informações quantitativas precisas, devido à influência da eficácia de amplificação. Se a eficácia da reação para cada ciclo de amplificação permanecesse constante, a concentração de DNA após a PCR seria diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo inicial. Contudo, a eficácia da reação não é um parâmetro constante, variando entre diferentes reações, assim como dentro de uma mesma reação, particularmente nos ciclos finais da PCR, quando os produtos são formados a uma taxa desconhecida e de uma forma não exponencial. Uma forma de contornar este problema foi o desenvolvimento de métodos como a PCR em tempo real, uma vez que permite estabelecer uma relação entre a concentração de DNA alvo e a quantidade de produto de PCR gerado durante a amplificação (Bonfini *et al.*, 2001; Anklam *et al.*, 2002).

7.1.1. PCR em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real é atualmente a forma mais eficaz de quantificar o material GM em produtos alimentares e agrícolas. O seu mecanismo consiste na monitorização contínua da reação de amplificação à medida que esta ocorre, utilizando fluorescência como sinal mensurável, a qual é proporcional à quantidade de produto de PCR produzido durante os ciclos de amplificação (Mafra, 2011; Querci *et al.*, 2020). Os sistemas de detecção mais utilizados são *TaqMan* e *SYBR Green*; no entanto, existem outros como *LC Green*, *FRET*, *Molecular beacons* ou *Scorpion* (Marmioli *et al.*, 2008).

O ensaio utilizando *Taqman* consiste na aplicação de numa sonda fluorescente que possui um oligonucleotido com um repórter e um *quencher*. Quando a sonda se encontra intacta, a fluorescência do repórter é suprimida pela proximidade do *quencher*. Devido à sua sequência específica para com o

alvo, a sonda emparelha especificamente com o produto de amplificação (DNA alvo) entre os *primers forward* e *reverse*. Se a hibridação ocorrer, a atividade de exonuclease 5'-3' da Taq polimerase cliva a sonda durante a amplificação e é emitido um sinal fluorescente pelo repórter como medida da quantidade do produto de amplificação gerado. Uma vez que a sinalização fluorescente do repórter apenas acontece se ocorrer o emparelhamento dos *primers* de PCR e da sonda *Taqman* ao DNA alvo, a especificidade de detecção da PCR em tempo real é consideravelmente superior comparativamente com a PCR convencional (Bonfini *et al.*, 2001).

7.1.2. PCR multiplex

Podem também ser efetuadas reações de PCR em tempo real para várias quantificações no mesmo tubo, numa reação *multiplex* (Querci *et al.*, 2020). Devido ao elevado número de eventos GM, e à importância de identificar vários transgenes numa única reação, a PCR *multiplex* tornou-se na principal ferramenta de detecção GM (Marmioli *et al.*, 2008).

Neste método são utilizados diferentes repórteres, os quais podem ser detetados separadamente e permitem uma detecção simultânea de múltiplas sequências alvo (Bonfini *et al.*, 2001). Um exemplo de uma avaliação de PCR *multiplex* em tempo real consiste no estudo de Höhne *et al.*, onde se utilizou a sequência do promotor P-35S como marcador de OGM para quatro diferentes tipos de milho GM, e se verificou um limite de detecção de 0.01% para milho GM/não-GM (Höhne, Rosa and Meyer, 2000).

As análises *multiplex* permitem efetuar quantificações precisas, são rápidas e económicas (Bonfini *et al.*, 2001), permitindo diminuir o número de reações necessárias para o teste de amostras, existindo um menor gasto de reagentes e amostra (Fraiture *et al.*, 2015).

Por outro lado, a PCR *multiplex* possui uma menor sensibilidade comparativamente com a PCR *simplex* (Mafra, 2011). Por ser um formato mais complexo, o desenvolvimento de ensaios otimizados torna-se uma tarefa mais difícil (Marmioli *et al.*, 2008). A técnica encontra-se dependente da disponibilidade de corantes com um espectro de emissão e absorção de fluorescência suficientemente distintos para evitar uma sobreposição de sinais, e a combinação de vários corantes aumenta a fluorescência de fundo (Fraiture *et al.*, 2015).

7.2. Microarray

Uma possível alternativa é o ensaio de *microarray*. Uma vez que foi concebido *a priori* para analisar vários alvos em paralelo dentro de uma única amostra, tem o potencial para combinar detecção, identificação e quantificação de um elevado número de eventos GM num único ensaio.

O princípio do *microarray* baseia-se na utilização de moléculas de ácidos nucleicos marcadas para atuarem como sondas sobre outras moléculas de ácidos nucleicos fixas num suporte sólido. Cada *microarray* consiste num suporte sólido, geralmente de vidro, sobre o qual foi depositado um elevado número de alíquotas de sequências de nucleótidos conhecidas que reconhecem o seu alvo por complementaridade de bases. No contexto de detecção GM, um determinado número de alíquotas de sequências de nucleótidos conhecidas serão derivadas de sequências dos transgenes, e o padrão de hibridação (tanto qualitativo como quantitativo) irá revelar se o analito representa uma variedade GM e qual o evento GM presente. Os ensaios de *microarray* podem também ser adaptados para uma detecção baseada em proteínas, onde as alíquotas de sequências de nucleótidos conhecidas serão, neste caso, anticorpos ou outras proteínas seletivas (Marmiroli *et al.*, 2008).

7.3. Métodos Imunológicos Para Detecção de Proteínas

A detecção específica de uma nova proteína sintetizada por um gene introduzido constitui uma abordagem alternativa à detecção de DNA. Os métodos imunológicos de detecção de proteínas baseiam-se na especificidade de ligação entre antígeno (proteína) e anticorpo (Querci *et al.*, 2020). Um dos pré-requisitos para o desenvolvimento de métodos de detecção imunológicos é a existência de anticorpos altamente específicos direcionados contra a proteína a ser detetada (Bonfini *et al.*, 2001).

O tipo de imunoensaio mais comumente utilizado é ELISA (Bonfini *et al.*, 2001). Este método deteta ou quantifica a proteína de interesse numa amostra que pode conter diversas outras proteínas. É utilizado um anticorpo para se ligar à proteína específica, um segundo anticorpo opcional para amplificar a detecção, e um anticorpo conjugado com uma enzima cujo produto gera uma reação colorida que pode ser visualizada e quantificada com base numa comparação com uma curva padrão da proteína de interesse (Querci *et al.*, 2020). Exemplos de proteínas detetadas através de métodos desenvolvidos de ELISA incluem o produto do gene *nptII*, a enzima EPSPS, a proteína inseticida Cry1Ab e a proteína PAT de tolerância a herbicidas (Bonfini *et al.*, 2001).

Os métodos imunológicos não necessitam de amplificação do alvo e, por isso, são menos suscetíveis de gerar falsos positivos provocados por pequenos níveis de contaminação. Outras vantagens são a sua rapidez e a elevada especificidade da reação imunológica (Fraiture *et al.*, 2015). São inicialmente morosos e dispendiosos durante o desenvolvimento do método e criação de anticorpos; contudo, têm um baixo custo por amostra uma vez otimizados para uso de rotina (Querci *et al.*, 2020).

Uma desvantagem dos imunoenaios passa pelo facto de qualquer alteração conformacional na estrutura terciária da proteína tornar o teste ineficaz, o que faz com que seja inadequado para a análise de amostras que sofreram processamentos (Bonfini *et al.*, 2001). Os métodos imunológicos são menos sensíveis do que os métodos de PCR, não são aplicáveis quando a modificação genética não tem impacto a nível proteico, e não conseguem discriminar entre diferentes eventos transgênicos (Fraiture *et al.*, 2015; Querci *et al.*, 2020). Para além disso, a deteção de proteínas pode ser adversamente afetada em matrizes complexas, onde existem substâncias como compostos fenólicos, ácidos gordos, fosfatases endógenas ou enzimas que podem inibir a interação específica entre antígeno e anticorpo (Bonfini *et al.*, 2001). A deteção depende também do nível de expressão das proteínas alvo, a qual é variável de acordo com o tecido da planta e o seu estado de desenvolvimento (Fraiture *et al.*, 2015).

7.4. Biossensores

Um outro método alternativo é a utilização de biossensores. Estes consistem em sensores específicos que possuem um elemento derivado de um sistema de reconhecimento biológico para o analito, juntamente com um elemento de conversão e transmissão de sinal. O bioelemento pode ser uma estrutura complexa, como um determinado tecido ou organelo, ou pode ser composto por moléculas isoladas como anticorpos, enzimas ou ácidos nucleicos. Os biossensores conseguem ser altamente específicos para um determinado analito, mas necessitam também de responder de uma forma em que a intensidade do sinal produzido seja proporcional à quantidade do analito presente (Marmioli *et al.*, 2008).

Os ensaios com biossensores em que o analito se liga diretamente ao alvo são chamados de “diretos”; neste caso, a especificidade da interação entre o sensor e o analito garante que qualquer sinal é específico. Os ensaios “indiretos”, contrariamente, são aqueles em que a ligação entre o analito e o bioelemento é reconhecida através de uma reação de acoplamento, a qual pode ser competitiva ou não-competitiva. Os sinais gerados pelos biossensores podem ser eletroquímicos, óticos, piezoelétricos ou calorimétricos. A especificidade de sensores baseados em DNA depende da complementaridade da sequência e requer que o DNA do sensor esteja imobilizado na superfície do elemento transdutor (Marmioli *et al.*, 2008). Esta técnica poderá representar uma opção atrativa na deteção de OGMs devido às suas características de tempo de resposta rápida e baixo custo (Mafra, 2011).

8. Transgênicos Aprovados

As culturas descritas nas Tabelas 3 e 4 encontram-se autorizadas para comercialização/alimentação humana e animal na União Europeia e EUA, respetivamente (ISAAA, 2019a).

Tabela 3: Culturas GM aprovadas na União Europeia. Adaptado de ISAAA, 2019a.

Organismo GM	Eventos disponíveis	Características disponíveis
Colza (<i>Brassica napus</i>)	13	Tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato
		Esterilidade masculina
		Restauração da fertilidade
		Resistência a antibióticos
Algodão (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	14	Tolerância aos herbicidas glifosato, glufosinato e isoxaflutol
		Resistência a insetos da ordem Lepidoptera
		Resistência a antibióticos
		Marcador visual
Milho (<i>Zea mays L.</i>)	52	Tolerância aos herbicidas glifosato, glufosinato e 2,4-D
		Resistência a insetos da ordem Coleoptera e Lepidoptera
		Metabolismo de manose
		Resistência a antibióticos

		Tolerância a <i>stress</i> de seca
Batata (<i>Solanum tuberosum L.</i>)	1	Amido/carboidrato modificado
		Resistência a antibióticos
Soja (<i>Glycine max L.</i>)	20	Tolerância aos herbicidas glufosinato, sulfonilureia, 2,4-D, glifosato, isoxaflutol e dicamba
		Ácido gordo/óleo modificado
		Resistência a insetos da ordem Lepidoptera
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	1	Tolerância ao herbicida glifosato
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum L.</i>)	1	Tolerância ao herbicida oxinil
Cravo (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	7	Tolerância ao herbicida sulfonilureia
		Cor floral modificada

Tabela 4: Culturas GM aprovadas nos EUA. Adaptado de ISAAA, 2019a.

Organismo GM	Eventos disponíveis	Características disponíveis
Alfafa (<i>Medicago sativa</i>)	3	Tolerância ao herbicida glifosato
		Resistência a antibióticos
		Produção alterada de lignina
Maçã (<i>Malus x Domestica</i>)	3	Resistência a antibióticos
		Não-escurecimento

Colza (<i>Brassica napus</i>)	22	Tolerância aos herbicidas glifosato, glufosinato, imazamox e oxinil
		Ácido gordo/óleo modificado
		Resistência a antibióticos
		Produção de fitase
		Esterilidade masculina
		Restauração da fertilidade
Chicória (<i>Cichorium intybus</i>)	3	Tolerância ao herbicida glufosinato
		Esterilidade masculina
		Resistência a antibióticos
Algodão (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	32	Tolerância aos herbicidas sulfonilureia, glufosinato, glifosato, dicamba, isoxaflutol, oxinil e 2,4-D
		Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e Hemiptera
		Resistência a antibióticos
		Marcador visual
		Baixo gossipol
Erva-fina (<i>Agrostis stolonifera</i>)	1	Tolerância ao herbicida glifosato
Linho (<i>Linum usitatissimum L.</i>)	1	Tolerância ao herbicida sulfonilureia

		Resistência a antibióticos
		Síntese de nopalina
Milho (<i>Zea mays L.</i>)	43	Tolerância aos herbicidas glufosinato, glifosato, dicamba, 2,4-D e sulfonilureia
		Esterilidade masculina
		Restauração da fertilidade
		Marcador visual
		Alfa amílase modificada
		Metabolismo de manose
		Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera
		Resistência a múltiplos insetos
		Resistência a antibióticos
		Modificação de aminoácido
		Biomassa aumentada da espiga
		Tolerância a <i>stress</i> de seca
Melão (<i>Cucumis melo</i>)	2	Maturação/senescência atrasada
		Resistência a antibióticos
Papaia (<i>Carica papaya</i>)	3	Resistência a doenças virais

		Resistência a antibióticos
		Marcador visual
Ananás (<i>Ananas comosus</i>)	1	Maturação/senescência atrasada
		Cor da fruta modificada
Ameixa (<i>Prunus domestica</i>)	1	Resistência a doenças virais
		Resistência a antibióticos
		Marcador visual
Batata (<i>Solanum tuberosum L.</i>)	43	Tolerância ao herbicida glifosato
		Amido/carboidrato modificado
		Resistência a insetos da ordem Coleoptera
		Resistência a antibióticos
		Asparagina livre reduzida
		Manchas negras reduzidas
		Açúcares redutores reduzidos
		Resistência a doenças virais
		Resistência foliar à requeima
Arroz (<i>Oryza sativa L.</i>)	5	Tolerância ao herbicida glufosinato

		Resistência a insetos da ordem Lepidoptera
		Metabolismo de manose
		Conteúdo de provitamina A aumentado
Rosa (<i>Rosa hybrida</i>)	2	Cor floral modificada
		Tolerância aos herbicidas glufosinato, glifosato, 2,4-D, dicamba, mesotriona, isoxaflutol e sulfonilureia
		Ácido gordo/óleo modificado
		Resistência a antibióticos
		Marcador visual
		Resistência a insetos da ordem Lepidoptera
		Tolerância a <i>stress</i> de seca
		Produção/fotossíntese aumentados
Abóbora (<i>Cucurbita pepo</i>)	2	Resistência a doenças virais
		Resistência a antibióticos
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	3	Tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato
		Marcador visual
		Resistência a antibióticos
Cana de açúcar (<i>Saccharum sp</i>)	1	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum L.</i>)	1	Redução de nicotina
		Resistência a antibióticos

Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	8	Maturação/senescência atrasada
		Resistência a antibióticos
		Resistência a insetos da ordem Lepidoptera
		Amolecimento retardado dos frutos
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	1	Tolerância ao herbicida glifosato

9. Áreas de Aplicação de Organismos GM

O desenvolvimento de plantas, animais e microrganismos GM apresenta um vasto número de aplicações em áreas como a agricultura, investigação científica, medicina e indústria. Encontram-se descritos de seguida alguns exemplos dessas aplicações nas respetivas áreas.

9.1. Plantas

9.1.1. Na Agricultura

Face ao desafio de alimentar uma população mundial prevista de nove mil milhões de pessoas em 2050, muitos acreditam que tal só poderá ser conseguido através de alimentos GM, com culturas que possuam uma maior qualidade e rendimento, que suportem práticas intensivas de cultivo e capazes de resistir às adversidades das alterações climáticas (Nambisan, 2017).

A problemática de uma população mundial cada vez maior torna-se ainda mais acentuada em países em desenvolvimento, onde a fome e a subnutrição são fatores impactantes, e um aumento de produtos alimentares através de técnicas de engenharia genética pode representar uma possível solução para atenuar este problema (Dizon *et al.*, 2016).

Alguns dos diversos benefícios do desenvolvimento de culturas GM encontram-se enumerados de seguida.

- Criação de culturas resistentes a pragas (tais como insetos), onde as plantas produzem os seus próprios “inseticidas”, como no caso da linha de milho GM MON 810, em que é produzida

uma proteína com toxicidade seletiva para com determinadas espécies de insetos (Dizon *et al.*, 2016).

- O cultivo de culturas resistentes a pragas leva a uma diminuição na utilização de pesticidas. Uma utilização excessiva de pesticidas e fertilizantes pode contaminar o abastecimento de água, provocando danos adicionais ao ambiente (Dizon *et al.*, 2016), e alguns consumidores estão menos inclinados a consumir alimentos que foram tratados com pesticidas devido a potenciais impactos na saúde (Gregorowius, Lindemann-Matthies and Huppenbauer, 2012).
- Para além disso, a criação de culturas GM pode ser mais adequada para o controlo de certas espécies de pragas comparativamente com técnicas tradicionais (Gregorowius, Lindemann-Matthies and Huppenbauer, 2012).
- Criação de culturas resistentes a herbicidas (Shinde *et al.*, 2018).
- Criação de culturas resistentes a agentes patogénicos como bactérias, fungos e vírus (Dizon *et al.*, 2016; Shinde *et al.*, 2018).
- Criação de culturas tolerantes a climas adversos, tais como a capacidade para sobreviver durante maiores períodos de seca, frio, ou altas concentrações de sal no solo ou águas subterrâneas.
 - Estas culturas GM poderão ser úteis para ajudar a contornar os impactos das alterações climáticas na agricultura. Para além da redução da quantidade de terreno disponível devido à necessidade de habitação por parte de uma população crescente, os agricultores têm também de lidar com uma redução da quantidade de terreno adequado para cultivo, devido ao solo se encontrar esgotado de nutrientes, ou simplesmente por não ser propício para a agricultura.
 - Um exemplo de maior tolerância ao clima consiste na introdução do gene da proteína anticongelante de peixe tipo II (AFP), presente em peixes de água fria, em plantas como o tabaco, batata e tomate, levando a que estas consigam sobreviver em temperaturas mais reduzidas (Dizon *et al.*, 2016). A proteína AFP contribui para a diminuição do ponto de congelamento e para a inibição da recristalização de gelo. No estudo de Kenward *et al.*, foram desenvolvidos *constructs* génicos de AFP tipo II sob o controlo do promotor 35S e introduzidos em plantas de tabaco através do método de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Observou-se a presença de proteínas AFP ativas no apoplasto, cujo tamanho era idêntico ao de proteínas isoladas

a partir de peixes e com uma atividade de histerese térmica comparável (Kenward *et al.*, 1999).

- Outro exemplo é a introdução de genes que conferem tolerância a ambientes salinos, como a transferência do gene de betaína-aldeído desidrogenase (BADH), gene de manitol-6-fosfato desidrogenase (gut D), gene da levedura transportador de K⁺/Na⁺, gene da enzima levanasacarase e gene de manitol-1-fosfato desidrogenase (mtl D), para plantas como tabaco, tomate, trigo, arroz e milho (Zhou *et al.*, 2004). Zhou *et al.* isolaram o gene CSRG1 a partir da espécie de planta tolerante a ambientes salinos *Avicennia marina* e inseriram-no no genoma da planta de tabaco. O gene foi integrado e expresso com sucesso, permitindo às plantas transgênicas crescer em ambientes com diferentes concentrações de salinidade (Zhou *et al.*, 2004).
- O desenvolvimento de culturas GM resistentes a pragas, tolerantes a herbicidas e tolerantes a fatores como a seca ou o frio, potencializam a existência de maiores rendimentos (Dizon *et al.*, 2016).
- Aumento do prazo de validade de produtos alimentares (Rani and Usha, 2013)
- A engenharia genética permite melhorar a qualidade e o valor nutritivo de alimentos (Nambisan, 2017).
 - A subnutrição representa um problema em países em desenvolvimento, onde a população depende de um tipo de cultura, como o arroz, para a sua subsistência. Grãos brancos de arroz são uma fonte pobre de vitamina A. Alimentos como o arroz GM *Golden Rice*, que possui beta-caroteno nos seus grãos (um precursor da vitamina A) podem evitar problemas de saúde resultantes de uma alimentação deficiente em vitamina A, que afeta países desfavorecidos, e pode resultar em problemas de saúde como cegueira, comprometimento do sistema imunitário e o exacerbamento de diversos tipos de doenças (Magnusson and Hursti, 2002; Dizon *et al.*, 2016). Outro exemplo é a planta de mandioca que foi geneticamente modificada de forma a melhorar o seu valor nutritivo, aumentando o seu conteúdo em minerais, proteínas e vitamina A (Dizon *et al.*, 2016).

A nível mundial, desde o início do cultivo de plantas GM, aquelas que apresentam uma maior área cultivada são a soja, milho, algodão e colza. Foi reportada, em 2017, uma área mundial total com

culturas GM de 189,8 milhões de hectares, distribuída por 24 países. A Figura 7 ilustra as áreas cultivadas a nível mundial, por cultura, ao longo dos anos (ISAAA, 2017).

Os EUA são o maior produtor mundial de culturas GM com 70.9 milhões de hectares, seguido pelo Brasil com 44.2 milhões de hectares. Na terceira, quarta e quinta posições, encontram-se a Argentina (24.3 milhões de hectares), Índia (11.6 milhões de hectares) e o Canadá (11 milhões de hectares). A Figura 8 ilustra as áreas globais de produção de culturas GM (Kamle *et al.*, 2017). Na União Europeia, apenas é cultivado o evento de milho GM MON810. A sua área de cultivo tem-se mantido relativamente estável desde 2007, com uma média de cerca de 120 000 hectares. Apesar da estabilidade em termos de área cultivada, tem-se observado uma redução significativa do número de países que cultivam este tipo de milho que, desde 2017, se limita a Portugal e Espanha (REA, 2019). Informações detalhadas sobre este evento encontram-se descritas à frente no presente trabalho, no tópico “Estudo de Caso: Milho Transgénico MON 810 Resistente a Insetos”.

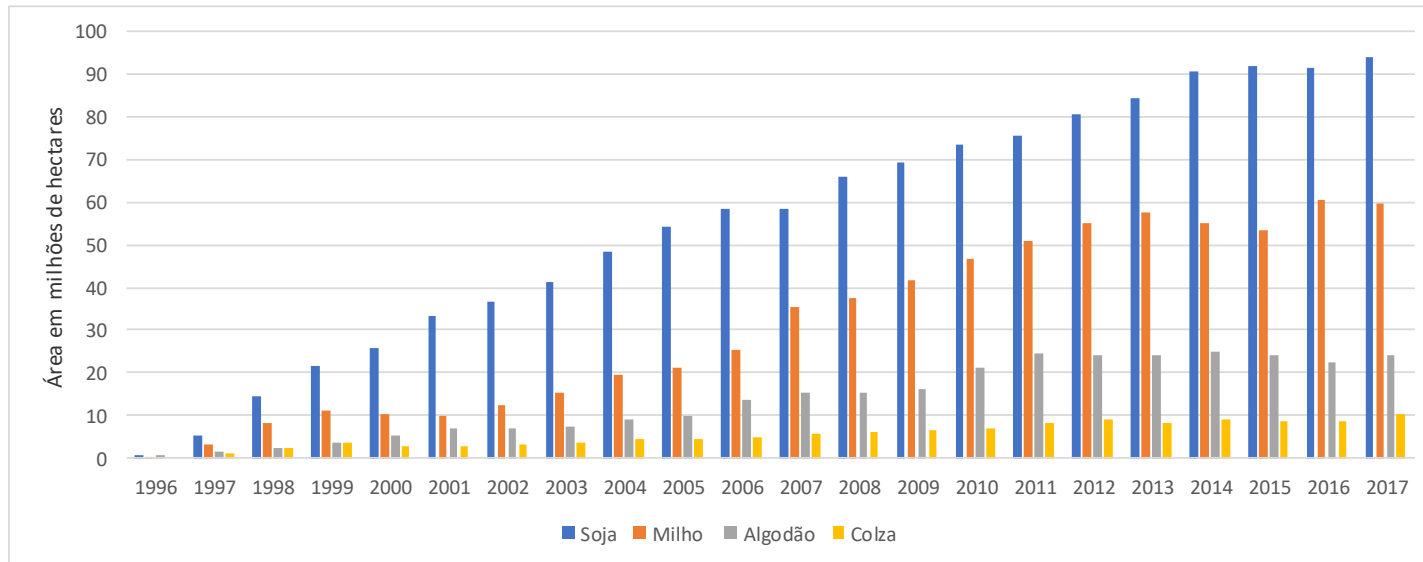


Figura 7: Cronologia das áreas cultivadas a nível mundial por cultura GM. Adaptado de ISAAA, 2017.

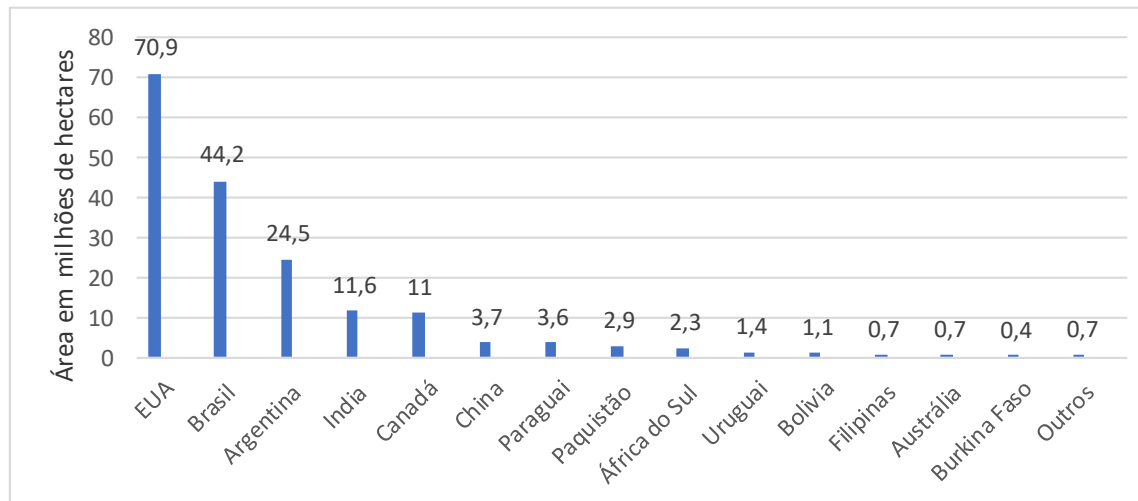


Figura 8: Áreas globais de produção de culturas GM. Adaptado de Kamle et al., 2017.

9.1.2. Na Investigação e Medicina

As plantas de tabaco e *Arabidopsis thaliana* são aquelas que, em contexto de investigação, são mais frequentemente alvo de manipulação genética, devido à sua fácil propagação, métodos de transformação bem desenvolvidos e genomas bem conhecidos. Estas são utilizadas como organismos-modelo para outras espécies de plantas (Koornneef and Meinke, 2010).

Para além disso, uma planta pode, através de tecnologia de DNA recombinante, ser modificada de forma a expressar proteínas recombinantes com valor terapêutico (Rani and Usha, 2013; Nambisan, 2017). Apesar de não serem o sistema de expressão mais utilizado para este fim, as plantas possuem diversas vantagens, como baixos custos de crescimento, capacidade de produzir proteínas complexas, baixo risco de contaminação com agentes patogénicos humanos e existência de procedimentos otimizados de crescimento. A planta de tabaco é a espécie mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes em laboratório (Burnett and Burnett, 2020).

Foram utilizadas plantas para a produção de anticorpos contra cáries dentárias, artrite reumatoide, cólera, diarreia provocada por *E. coli*, malária, vírus do Nilo ocidental, vírus Norwalk, HIV, rinovírus, influenza, vírus da hepatite B e vírus de herpes *simplex* (Thomas, Deynze and Bradford, 2002; Rani and Usha, 2013).

Sun *et al.* produziram o anticorpo monoclonal hE16 contra o vírus do Nilo ocidental em plantas de tabaco da espécie *Nicotiana benthamiana*. O anticorpo foi produzido em níveis elevados e demonstrou uma afinidade de ligação e cinética idênticas para a proteína E do vírus do Nilo ocidental, assim como uma equivalente eficácia de neutralização, comparativamente com anticorpos hE16 produzidos em células de mamíferos. Uma dose única de hE16 conseguiu proteger ratos submetidos a uma exposição letal do vírus em questão. O anticorpo hE16 foi também expresso com igual eficácia em alfaca (Sun, Chen and Lai, 2018).

Foram também expressos antígenos de vários agentes patogénicos em plantas, de forma a produzir vacinas contra diversas condições/agentes patogénicos, como a cólera, *E. coli* enterotoxigénica, hepatite B, raiva, vírus Norwalk, citomegalovírus humano e rotavírus (Thomas, Deynze and Bradford, 2002).

O estudo de Daniell *et al.* inseriu a sequência codificante da toxina de *Vibrio cholerae* no genoma de cloroplastos da planta de tabaco. Observou-se a ocorrência de uma integração estável do gene, a sua transmissão de forma estável às gerações subsequentes, e que a toxina era antígenicamente idêntica comparativamente com a sua equivalente nativa (Daniell *et al.*, 2001).

Outras proteínas com aplicações farmacêuticas e médicas foram produzidas em plantas. Derivados sanguíneos (como albumina sérica humana), citoquinas e outras moléculas de sinalização, e

as proteínas do leite beta-caseína e lisozima, representam alguns exemplos (Ma, Drake and Christou, 2003).

As plantas transgênicas podem também ser empregues na biorremediação de solos contaminados. Plantas contendo determinados genes demonstraram capacidade de remover dos solos substâncias como o selênio, cádmio, alumínio ou chumbo. A Tabela 5 enumera algumas plantas transgênicas utilizadas na biorremediação, respetivo gene transferido, origem e efeito (Farias, Chaves and Lencina, 2011).

Tabela 5: Exemplos de plantas transgênicas utilizadas na biorremediação, respetivo gene transferido, origem e efeito.

Adaptado de Farias, Chaves and Lencina, 2011.

Gene transferido	Origem	Espécie de planta utilizada	Efeito
CUP-1	Levedura	Couve-flor	Acumulação de cobre
CAX-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tabaco	Acumulação de cádmio, cálcio e manganês
Cistationina gama-sintase (CGS)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Planta de mostrada-da-Índia	Volatilização de selênio
Selenocisteína Liase (Se-cys lyase)	Rato	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acumulação de selênio

9.2. Animais

9.2.1. Na Investigação Científica

O desenvolvimento de animais transgênicos, submetidos a adições ou inativações de genes, possui uma elevada relevância na área da investigação científica e biomédica. São principalmente utilizados ratos como modelos, por serem mamíferos, pela sua rápida reprodução, acessibilidade, fácil manipulação, e relativa facilidade de realização de modificações genéticas (Houdebine, 2017; Nishu *et al.*, 2020).

9.2.1.1. Modelos Patológicos

Os animais transgênicos podem ser desenvolvidos com o intuito de criar modelos de patologias genéticas humanas, numa tentativa de compreender os processos patológicos subjacentes às mesmas. Poderão ser estudadas condições patológicas que vão desde a doença de Alzheimer, SIDA, cancro ou

doença de Parkinson (Nishu *et al.*, 2020). Para além disso, a utilização de modelos o mais aproximados possível da condição humana é benéfica no teste de novos fármacos (Breyer, Look and Cifra, 2015).

O modelo *Oncomouse* representa um modelo importante no estudo de cancro. Foi criado pela primeira vez em 1984 através da substituição do gene *myc* por um gene recombinante de fusão entre um promotor de tumor viral e o gene *myc*, de forma a tornar o rato suscetível ao desenvolvimento tumoral. Uma outra forma é a criação de ratos com ausência do alelo *p53*, o qual é o gene supressor tumoral envolvido na maioria dos cancros. A remoção deste alelo deixa o rato suscetível a vários tipos de cancro, sendo o linfoma o mais frequente (Masih *et al.*, 2013).

Um outro modelo desenvolvido consiste em *Drosophila* para o estudo da doença de Parkinson. Foi efetuada uma mutação no gene da α -sinucleína, um gene que se encontra relacionado com a hereditariedade da doença de Parkinson. As moscas demonstraram características específicas que são observáveis em humanos durante a progressão da doença, como perda de controlo de movimento e redução de dopamina. Este modelo permite compreender os sintomas iniciais, o que poderá levar a diagnósticos precoces em humanos (Feany and Bender, 2000).

Breveglieri *et al.* criaram um modelo de rato transgénico transportador da mutação pontual IVSI-6 de talassemia no gene humano da β -globina. Este modelo reproduziu com eficácia as características moleculares da β -talassemia IVSI-6, podendo ser utilizado para o seu estudo e para o possível desenvolvimento de terapias (Breveglieri *et al.*, 2015).

9.2.1.2. Produção de Proteínas Terapêuticas

Podem ser produzidas proteínas recombinantes humanas e anticorpos monoclonais em animais transgénicos, principalmente através do seu isolamento a partir do leite destes animais, que podem incluir vacas, coelhos, porcos, cabras e ratos (Maksimenko *et al.*, 2013).

Algumas proteínas recombinantes produzidas desta forma são os fatores de coagulação VIII, IX (Cott *et al.*, 2004), albumina, α -fetoproteína, antitrombina, hormona de crescimento ou eritropoietina. Atryn® (antitrombina III) e Ruconest® (inibidor da C1-esterase) são dois dos fármacos disponíveis comercialmente (Maksimenko *et al.*, 2013).

Chrenek *et al.* desenvolveram coelhos transgénicos por microinjeção utilizando um *construct* composto pelo promotor mWAP e cDNA do fator VIII de coagulação humano (hFVIII). Todos os animais demonstraram uma transmissão estáveis aos seus descendentes. Ensaios *Western blot* demonstraram que a proteína hFVIII era secretada pelas glândulas mamárias de fêmeas em lactação, e a atividade biológica da proteína foi comprovada por testes de coagulação. Estas proteínas poderão ser utilizadas no tratamento de patologias como a hemofilia (Chrenek *et al.*, 2007).

Exemplos de anticorpos monoclonais produzidos por animais transgênicos são BR96 anti-Lewis Y, coronavírus de gastroenterite transmissível, antigénio de superfície do vírus da hepatite B, recetor CD20 ou recetor CD6 (Maksimenko *et al.*, 2013).

No estudo de Sola *et al.* foram produzidas linhas de ratos transgênicos que secretavam no leite anticorpos monoclonais contra o coronavírus de gastroenterite transmissível, um vírus que infeta os tecidos entéricos e respiratórios e provoca uma elevada mortalidade quando porcos recém nascidos são infetados (Sola *et al.*, 1998).

Zhang *et al.* desenvolveram uma linha de ratos transgênicos por microinjeção de dois *constructs* génicos codificantes da cadeia leve e pesada de um anticorpo contra o vírus da hepatite B (HBV). Ambos os genes inseridos de cadeia leve e pesada foram expressos adequadamente. Os níveis de expressão do anticorpo e a sua afinidade pelo antigénio de superfície de HBV foram analisados e comprovados por ensaios ELISA (Zhang *et al.*, 2012).

9.2.1.3. Xenotransplantação

Uma forma de contornar a escassez de órgãos e problemas de histocompatibilidade poderá ser a xenotransplantação. Os animais utilizados na xenotransplantação são animais que não expressam os antigénios que são reconhecidos pelo sistema imunitário e que desencadeiam reações imunitárias contra o mesmo. O único animal atualmente escolhido para estudos de xenotransplantação é o porco, pela sua fisiologia semelhante à de humanos e por serem menos dispendiosos comparativamente com primatas. Testes em humanos ainda não foram aprovados, devido a receios relativamente a infeções zoonóticas, especialmente em pessoas com sistemas imunitários enfraquecidos como é o caso de pacientes que aguardam um transplante (Nishu *et al.*, 2020).

Coração, pulmões, rins, fígado e córneas foram alguns dos órgãos alvo de estudo para xenotransplantação (Wheeler and Walters, 2001).

A realização de modificações genéticas em porcos como o *knockout* génico de α 1,3-galactosiltransferase representou um passo significativo no estudo da xenotransplantação (Ekser *et al.*, 2009). A existência de anticorpos xenoreativos anti- α Gal é uma das principais barreiras para a transplantação de órgãos entre porco e primatas, provocando rejeição hiperaguda. Compreendeu-se que esta reação poderia ser contornada com a remoção destes anticorpos (Sprangers, Waer and Billiau, 2008).

De forma a contornar-se a rejeição hiperaguda, são também produzidos porcos transgênicos que expressam proteínas regulatórias humanas do complemento, como CD55, CD46 e CD59, ou então através da inibição do seu sistema complemento. A expressão transgênica de antigénio leucocitário

humano (HLA-E) poderá ajudar a contornar o obstáculo da rejeição de lise citotóxica provocada por células NK (Sprangers, Waer and Billiau, 2008).

9.2.1.4. Mosquitos Refratários

O desenvolvimento de mosquitos transgênicos refratários constituiu uma possibilidade atrativa para o controlo de doenças como a malária.

A abordagem de Ito *et al.* baseou-se na criação de mosquitos transgênicos que expressam genes anti-parasíticos no epitélio intestinal dos mosquitos, tornando-se vetores ineficazes da doença; identificaram-se locais recetores de proteínas que o parasita necessita para passar através do intestino após a ingestão, e na subsequente produção de proteínas que saturam os locais recetores, impedindo a amplificação e transmissão do parasita. Identificou-se o péptido SM1, o qual se liga especificamente aos dois epitélios cruzados pelo parasita: os lobos distais das glândulas salivares e a superfície luminal do intestino médio. Foi construído o gene designado *AgCP[SM1]4*, consistindo em quatro unidades SM1 e pelo promotor de carboxipeptidase. O gene foi inserido num vetor *piggyBac* e introduzido na linha germinativa do mosquito *Anopheles stephensi*. Verificou-se que o péptido SM1 inibia o desenvolvimento e transmissão do parasita (Ito *et al.*, 2002).

Uma outra abordagem é a utilização de anticorpos que matam o parasita dentro do mosquito. Capurro *et al.* desenvolveram um gene codificante de um anticorpo de cadeia única derivado de ratos, designado por N2scFv, baseado no anticorpo monoclonal anti proteína circunsporozoíta N2H6D5. A proteína circunsporozoíta é o antigénio de superfície predominante na fase de esporozoíta do parasita *Plasmodium gallinaceum*. O anticorpo liga-se aos esporozoítos do parasita e impede a infeção das glândulas salivares do mosquito *Aedes aegypti*. Utilizando como vetor o vírus Sindbis, a expressão do anticorpo N2scFv resultou numa redução significativa das infeções nas glândulas salivares do mosquito (Capurro *et al.*, 2000).

9.2.2. Melhoria de Características de Animais

A grande maioria dos animais GM produzidos com fins alimentares encontra-se em fase de investigação, sendo a única exceção o tipo de salmão *AquAdvantage*. Alguns dos fatores que estimulam a produção de animais GM são o aumento da demanda por alimentos, devido ao aumento da população humana, a necessidade de comida a preços mais reduzidos, alimentos mais enriquecidos em termos nutricionais e a necessidade de animais mais “amigos do ambiente” (Forabosco *et al.*, 2013).

Algumas das características económicas passíveis de serem melhoradas através da manipulação genética animal passam por uma produção e composição de leite melhorada, composição da carcaça melhorada, aumento da taxa de crescimento (Wheeler and Walters, 2001), melhoria da saúde animal e maior resistência a patologias (Giasseti *et al.*, 2013), utilização mais eficiente de rações, desempenho reprodutivo e fecundidade melhorados (Wheeler and Walters, 2001).

Diversas espécies de animais foram geneticamente modificadas com o intuito de conferir características mais vantajosas a nível alimentar e de pecuária, embora estas alterações sejam apenas realizadas a nível experimental e de investigação (Forabosco *et al.*, 2013; Giasseti *et al.*, 2013). Os principais animais alvo de alterações genéticas consistem em suínos, caprinos (ovelha e cabra), bovinos, peixe e aves (galinha) (Forabosco *et al.*, 2013).

Relativamente a suínos, estes têm sido alterados de forma a acentuar o seu crescimento, melhorar a sua composição da carne, aumentar a produção de lactalbumina durante a lactação, aumentar a sua resistência a doenças infecciosas e excretar matéria fecal contendo menos fosfato, diminuindo o seu impacto no ambiente (Forabosco *et al.*, 2013).

Em ovelhas, foram efetuadas manipulações genéticas de forma a aumentar o crescimento de lã e a conferir resistência a patologias. A qualidade do leite e as condições fisiológicas dos úberes têm sido os principais pontos de atenção relativamente a cabras GM (Forabosco *et al.*, 2013). Para além disso, igualmente em ovelhas e cabras, a lã e fibras têm sido alvo de manipulação transgénica relativamente à sua qualidade, comprimento, cor, elasticidade, força, suavidade, frisagem e facilidade de colheita (Wheeler, Walters and Clark, 2003).

Em bovinos, os principais aspetos tidos em conta são a resistência a patologias, qualidade do leite e as condições fisiológicas dos úberes (Forabosco *et al.*, 2013).

O aumento de tamanho, a resistência a patologias e a eficiência de conversão alimentar, têm sido os principais fatores de manipulação em galinhas (Forabosco *et al.*, 2013).

Tem sido realizada investigação de forma a combater espécies de insetos consideradas pragas agrícolas. O foco das pesquisas baseia-se na adição de características benéficas aos predadores ou parasitas da praga, ou, por outro lado, à adição de novas características à própria espécie de praga (Hoy, 2000; Thomas *et al.*, 2000).

A engenharia genética pode também ser utilizada para melhorar as interações de animais com humanos através do desenvolvimento de animais de estimação hipoalergénicos (Giasseti *et al.*, 2013).

Em relação a peixes (principalmente salmonídeos, tilápias e carpas), a principal característica alvo de manipulação genética é a aceleração do seu crescimento, sendo utilizados transgenes que aumentem a produção de hormonas de crescimento. Podem também ser efetuadas modificações de forma a que os peixes aumentem drasticamente o seu tamanho, que possa ser produzida mais carne fornecendo menos ração, que ocorra o desenvolvimento de resistência a patologias, e que haja crescimento de animais numa gama de ambientes mais vasta (produção de salmão do Atlântico no Ártico, ou crescimento de peixes de água doce no oceano, por exemplo) (Forabosco *et al.*, 2013).

O salmão *AquAdvantage* representa o primeiro animal GM a ser aprovado para consumo humano, sendo a sua aprovação obtida nos EUA e Canadá em 2015 (FDA, 2019). Durante mais de 20 anos, a sua aplicação para comercialização esteve sob avaliação pela FDA e outras agências dos EUA.

A tecnologia subjacente para a produção de salmão *AquAdvantage* foi desenvolvida em 1989 por Garth Fletcher, Peter Davies e Choy Hew (McCarthy, 2011). O *construct* utilizado, designado por opAFP-GHc2, contém o cDNA de uma hormona de crescimento proveniente da espécie de salmão Chinook, cuja expressão é regulada pela região promotora 5' e pela região de terminação 3' derivadas do gene da proteína anticongelante (AFP) de peixe-carneiro americano (Figura 9). A sua inserção é efetuada por microinjeção em óvulos fertilizados (Yaskowiak *et al.*, 2006; Tharp, 2014).

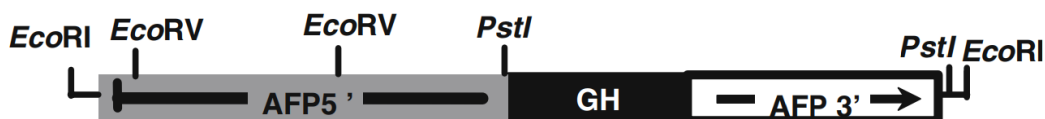


Figura 9: *Construct* utilizado no desenvolvimento do salmão *AquAdvantage*. AFP5', região promotora 5' da proteína anticongelante de peixe-carneiro americano; GH, cDNA da hormona de crescimento de salmão *Chinook*; AFP3', região de terminação 3' da proteína anticongelante de peixe-carneiro americano. Adaptado de Yaskowiak *et al.*, 2006.

No salmão *AquAdvantage*, o promotor de peixe-carneiro americano permite que o gene da hormona de crescimento seja continuamente transcrito. No salmão nativo do Atlântico, o gene da hormona de crescimento é normalmente apenas expresso na glândula pituitária do peixe. Os investigadores compreenderam que teriam de encontrar uma forma de modificar este facto, de forma a que a hormona pudesse ser expressa em outros tecidos para evitar a regulação negativa pela pituitária. Uma vez que os genes de proteínas AFP são expressos no fígado e outros tecidos, os investigadores selecionaram a região promotora de um gene anticongelante de peixe-carneiro americano e uniram-no à região codificante do gene da hormona de crescimento de salmão *Chinook* (McCarthy, 2011).

No salmão nativo do Atlântico, o gene endógeno da hormona de crescimento é regulado negativamente; a sua expressão cessa por períodos de 4-5 meses numa fase inicial do seu crescimento em alturas em que é mais provável que exista escassez de alimento, dias mais curtos e água mais fria. Na primavera, quando o alimento é mais abundante e a temperatura da água um pouco mais elevada, o seu crescimento inicia-se uma vez mais. Quando o salmão atinge uma fase adulta, deixa de possuir este tipo de regulação negativa, continuando a crescer. No salmão *AquAdvantage*, a produção da hormona de crescimento não é interrompida; esta é sempre produzida em níveis baixos e constantes, o que permite que o salmão cresça continuamente ao longo de todo o ano (McCarthy, 2011).

Esta alteração permite um crescimento entre 5-10 vezes mais rápido comparativamente com os seus homólogos não-GM durante a fase pré-juvenil, o que, por sua vez, permite que alcancem um tamanho de mercado (4-6 kg) um ano mais cedo do que o salmão não-GM (Fletcher *et al.*, 2004; Butler and Fletcher, 2009). A Figura 10 ilustra a comparação entre o salmão *AquAdvantage* e o seu equivalente não-transgénico com a mesma idade; ambos atingem o mesmo tamanho quando alcançam a maturidade, mas o salmão não-transgénico demorará um maior período temporal (Holban and Grumezescu, 2018).



Figura 10: Comparação entre o salmão *AquAdvantage* e o seu equivalente não-transgénico com a mesma idade. Adaptado de Holban and Grumezescu, 2018.

Em 2019, a FDA aprovou uma segunda instalação no Canadá para a produção de salmão *AquAdvantage*. Quanto à avaliação de medidas de contenção, a probabilidade de fuga e cruzamento com salmão selvagem do Atlântico verificou-se extremamente baixa, devido à existência de barreiras físicas (múltiplos níveis de barreiras para impedir a fuga de ovos e peixes), biológicas (esterilidade dos

peixes através de triploidia) e ao ambiente circundante desfavorável à sobrevivência deste animal. Foi também demonstrado que o salmão *AquAdvantage* era seguro para alimentação, e que a inserção génica era segura para o animal. De acordo com os regulamentos impostos pela *National Bioengineered Food Disclosure Standard* e pelos seus regulamentos emitidos em 2018, os alimentos que contenham salmão GM necessitam de uma rotulagem indicativa de conteúdo GM. A FDA irá manter um programa de monitorização, onde serão avaliados fatores como a presença e estabilidade da inserção génica, assim como a esterilidade dos animais (FDA, 2020).

Atualmente não existem animais geneticamente modificados ou produtos derivados dos mesmos no mercado europeu, assim como também não existem aplicações para animais GM recebidas na União Europeia (EFSA, 2020). Contudo, desenvolvimentos científicos sugerem que podem ser efetuadas submissões no futuro relativas a várias espécies. Assim, como medida proativa, a Comissão Europeia encarregou a *European Food Safety Authority* (EFSA) de desenvolver diretrizes abrangentes de avaliação de risco que seriam utilizadas por empresas, e organismos de avaliação de risco para avaliar os possíveis riscos para a segurança de alimentos e rações, ambiente, assim como aspetos relacionados com a saúde e bem-estar animal. Estas diretrizes iriam auxiliar possíveis candidatos futuros quando estes submetessem as suas aplicações à EFSA (EFSA, 2020).

As diretrizes para a avaliação de riscos associados a alimentos e rações derivados de animais GM e aspetos de saúde e bem estar animal baseiam-se na comparação entre animais GM e os seus equivalentes convencionais. O pressuposto base deste tipo de avaliação comparativa consiste no facto de os alimentos e rações produzidos de forma convencional possuírem um histórico de utilização segura e, por isso, poderem servir como base para a avaliação de alimentos derivados de animais GM. Algumas componentes desta avaliação incluem a sua caracterização molecular, composicional, análise de toxicidade, potencial alergenicidade e aspetos nutricionais. Os alimentos derivados de alimentos GM deverão ser, por exemplo, tão nutritivos para humanos e animais como aqueles que foram criados de forma convencional. O documento menciona também as metodologias requeridas para a avaliação comparativa de aspetos relacionados com a saúde e bem estar dos animais GM; deverá garantir-se que os sistemas corporais do animal funcionem corretamente, o que, por sua vez, também estará relacionado com a qualidade e segurança dos alimentos daí derivados, uma vez que a saúde e bem estar dos mesmos é em si um importante indicador da qualidade dos produtos. É também recomendada a realização de monitorizações caso a caso após a comercialização dos produtos (EFSA, 2012).

As diretrizes para a avaliação de riscos ambientais de animais GM indicam que deverão ser identificados potenciais perigos e a extensão da sua exposição a humanos, animais e ambiente. Seguidamente, deverá efetuar-se uma caracterização dos perigos e da sua exposição e, da combinação

de ambos, do risco potencial. Daí, os aplicantes deverão delinear estratégias de gestão dos riscos e fornecer uma avaliação geral de riscos. Deverão também ser mencionadas áreas de potencial risco, como a persistência e invasividade do animal GM, incluindo transferência vertical de genes; transferência horizontal de genes; interações do animal GM com organismos alvo; interações do animal GM com organismos não-alvo; impactos ambientais das técnicas específicas utilizadas para a gestão do animal GM; impactos do animal GM em processos biogeoquímicos; e impactos do animal GM na saúde humana e animal. São também feitas recomendações para a avaliação de potenciais efeitos a longo prazo, e indicados os animais convencionais a ser utilizados como comparadores (e substitutos apropriados, se necessário) (EFSA, 2013).

9.3. Microrganismos

Os microrganismos GM, e seus produtos derivados, possuem aplicações em diversas áreas como a investigação científica, saúde humana e animal, indústria e proteção ambiental.

9.3.1. Investigação científica

As bactérias representam organismos de fácil crescimento, baixo custo, clonais e de rápida multiplicação. Para além disso, podem ser armazenados a temperaturas de -80 °C quase indefinidamente e são relativamente fáceis de transformar. São, desta forma, elementos de elevada utilidade no estudo de função génica e evolução; a maioria da compreensão inicial dos processos de biologia molecular advém do estudo de *Escherichia coli* (Cooper, 2019).

9.3.2. Saúde humana

Alguns exemplos da utilização de microrganismos GM aplicados à saúde humana consistem em:

- Produção de vacinas recombinantes, como a vacina contra a hepatite B, produzida através da expressão do gene codificante do antigénio de superfície do vírus da hepatite B em *Saccharomyces cerevisiae* (Crooy, 1991). Outros exemplos consistem em vacinas contra a poliomielite, malária, cólera e varíola (Shinde *et al.*, 2018).
- Produção de antibióticos, tais como a tetraciclina, penicilina, estreptomicina, novobiocina e bacitracina (Shinde *et al.*, 2018).
- Produção de proteínas terapêuticas recombinantes (Nambisan, 2017). A produção de proteínas terapêuticas recombinantes em organismos de fácil crescimento e de fácil

manipulação garantem uma produção consistente e segura, livre de contaminação, um fornecimento adequado e custos reduzidos. Alguns exemplos incluem:

- Interferões (Falkner and Maurer-Fogy, 1996).
- Eritropoietina (Shinde *et al.*, 2018).
- Interleucinas (Parekh, 2004).
- Somatostatina (Shinde *et al.*, 2018).
- Hormona de crescimento humano (Cronin, 1997)
- P-endorfina (Shinde *et al.*, 2018).
- Fator de estimulação de colónias de granulócitos e macrófagos (Till, 1998)
- Insulina (Goeddel *et al.*, 1979).

A insulina humana foi, em 1978, a primeira proteína animal a ser produzida em bactérias através de métodos recombinantes. Foram clonados genes sintéticos para as cadeias A e B da insulina humana, separadamente, no plasmídeo pBR322. Os genes clonados foram inseridos no terminal carboxilo do gene de β -galactosidase de *E. coli* de forma a ocorrer uma transcrição e tradução eficazes, assim como uma proteína precursora estável. Posteriormente os péptidos de insulina foram clivados da β -galactosidase e purificados. As duas cadeias, que na insulina se encontram unidas por duas ligações dissulfeto, foram ligadas utilizando derivados S-sulfonados (Goeddel *et al.*, 1979). O processo descrito encontra-se ilustrado pela Figura 11.

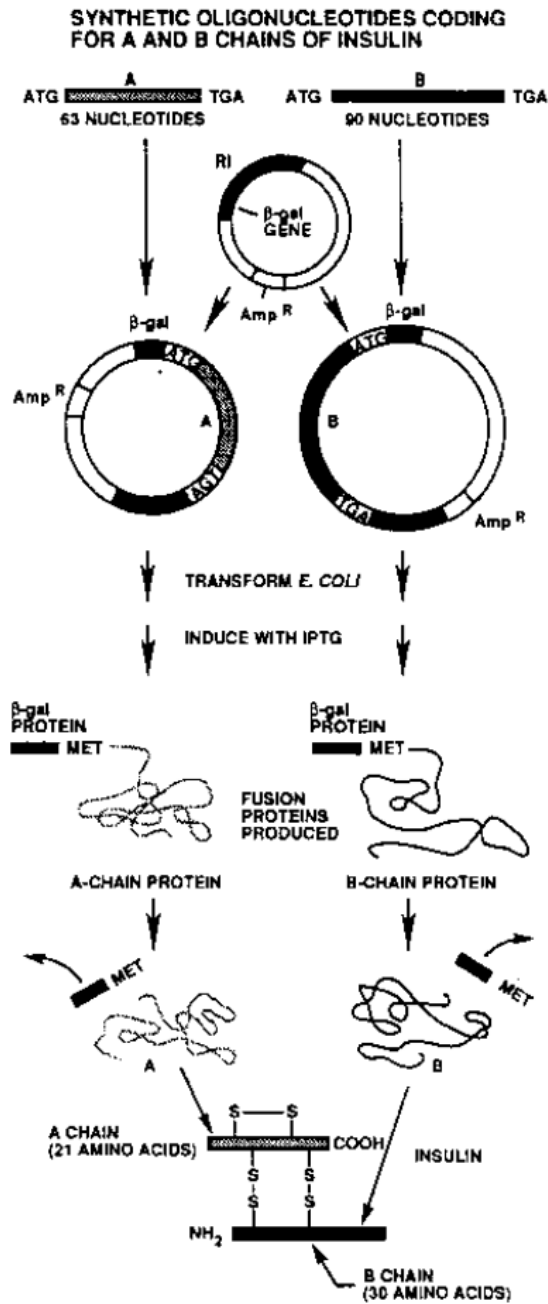


Figura 11: Processo de produção de insulina humana em *E. coli*. Adaptado de Ladisch and Kohlmann, 1992.

9.3.3. Saúde animal

- Proteínas terapêuticas recombinantes, como a somatotropina bovina produzida em *E. coli*, ou a fitase produzida em *Aspergillus niger* (Tengerdy and Szakács, 1998; Dijck, 1999).
- Vacinas recombinantes, como a vacina contra a raiva (Terré *et al.*, 1996).

9.3.4. Indústria

- Celulase, para utilização na indústria têxtil. O aumento de produção de celulase pode efetuar-se através da clonagem do gene codificante da enzima no hospedeiro heterólogo *Bacillus subtilis* (Han, 2004).
- α -amilase, para utilização na indústria têxtil. O aumento de produção de α -amilase pode ser conseguido através da clonagem do gene codificante da enzima no hospedeiro heterólogo *Bacillus licheniformis* (Han, 2004).
- Pectinases, para utilização na indústria alimentar. Desempenham um papel importante no processamento de bebidas e frutas. A pectinametilesterase I pode ter a sua expressão aumentada quando o DNA complementar codificante da enzima é expresso no hospedeiro heterólogo *Aspergillus oryzae* (Parekh, 2004).
- Quimosina, para utilização na indústria alimentar. A quimosina, utilizada na produção de queijo, pode ser obtida pela clonagem do gene codificante da quimosina do estômago de vitelos na levedura *Kluyveromyces lactis* (Jones and Quax, 1998; Dijck, 1999).
- Álcoois e bebidas alcoólicas obtidas por fermentação (Shinde *et al.*, 2018).
- Ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ácido acético (Shinde *et al.*, 2018).
- Vitaminas (Shinde *et al.*, 2018).
- Produção de plásticos biodegradáveis, como polihidroxialcanoato. Pode ser realizada em *E. coli* através da introdução dos genes responsáveis pela via deste composto. As vantagens da produção em *E. coli* passam pelo facto de o seu metabolismo ser bem caracterizado, ter um crescimento robusto e não possuir a enzima que degrada o polihidroxialcanoato (Han, 2004).
- Produção de biocombustíveis. A engenharia genética desempenha um papel essencial numa produção rentável e em larga escala de biocombustíveis. Estes são derivados de biomassa, sendo renováveis e de baixo custo. Os microrganismos utilizados no processo são modificados geneticamente de forma a obter-se um maior rendimento de produto e melhores resultados. Para a produção de biomassa, são utilizadas plantas de baixo custo e baixa manutenção que utilizam a energia solar de forma mais eficiente (*energy crops*). As melhorias genéticas destas plantas contribuem significativamente para uma maior e mais rápida obtenção de biomassa, o que por sua vez reduz o preço de produção do biocombustível. (Shinde *et al.*, 2018).

9.3.5. Proteção ambiental

- Conversão de resíduos em biocombustíveis e bioetanol (Shinde *et al.*, 2018).
- Limpeza de derramamentos de petróleo, carbono e outros resíduos tóxicos (Shinde *et al.*, 2018).
- Detecção de arsénico e outros contaminantes em águas potáveis (Shinde *et al.*, 2018).
- Biominação (Shinde *et al.*, 2018).
- Biorremediação. Como exemplo, a utilização do microrganismo GM *Pseudomonas fluorescens* HK44, para a degradação de naftaleno (Sayler and Ripp, 2001).

10. Enquadramento Regulatório

10.1. Regulamentos Internacionais

A nível internacional, existem dois principais protocolos respeitantes a OGMs: o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança de 2000 (SCBD, 2000) e o Protocolo Suplementar de Nagoya-Kuala Lumpur de 2010 (SCBD, 2011), estando ambos ligados à Convenção de Diversidade Biológica de 1993 (CBD, 1993).

A Convenção de Diversidade Biológica foi desenvolvida pelo *Ad Hoc Working Group of Experts on Biological Diversity*, grupo reunido pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, para a conservação e utilização sustentável da diversidade biológica, e conta com 168 assinaturas. O Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança foi adotado pela Conferência das Partes da Convenção de Diversidade Biológica, e conta atualmente com a assinatura de 103 países. O Protocolo Suplementar de Nagoya-Kuala Lumpur foi aceite pelo *Ad Hoc Open-ended Working Group on Access and Benefit-sharing*, grupo estabelecido pela Conferência das Partes, e conta atualmente com a assinatura de 51 países (CBD, 2020).

A Convenção de Diversidade Biológica coloca ênfase na necessidade de proteção do ambiente e da saúde humana relativamente aos possíveis impactos negativos resultantes da biotecnologia moderna, tendo em vista, simultaneamente, o potencial para resultados positivos de inovações em áreas como o melhoramento de géneros alimentícios através do desenvolvimento agrícola (CBD, 1993).

O Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança providencia um enquadramento regulatório internacional para conciliar as necessidades de comércio e proteção ambiental relativas à indústria biotecnológica. Os seus objetivos passam por assegurar um nível adequado de proteção para a transferência, manuseamento e utilização de organismos modificados através de biotecnologia moderna

que possam ter efeitos adversos na conservação e utilização sustentável da diversidade biológica. Tem também em conta os riscos para a saúde humana e, particularmente, as movimentações transfronteiriças. O princípio da precaução é um dos princípios em que o Protocolo se baseia, sendo que a existência de ameaças de danos graves ou irreversíveis, mesmo que estas não estejam cientificamente e empiricamente comprovadas que originem esses danos, por precaução, a ação pode não ser realizada. Alternativamente podem ser tomadas medidas, economicamente viáveis, para prevenir a degradação ambiental; esta é considerada uma forma útil para proteger o ambiente sem inibir excessivamente os avanços científicos e o comércio internacional. O mecanismo básico para regular a movimentação transfronteiriça de OGMs consiste no acordo prévio informado. Quando existe um plano para a movimentação destes produtos através de uma fronteira, as partes devem ser notificadas com antecedência. Durante um período de 270 dias, é decidido se a movimentação é aprovada e que condições serão impostas em caso de resposta positiva (SCBD, 2000).

O Protocolo contém também disposições sobre a movimentação acidental de OGMs através de fronteiras. Se uma parte tomar conhecimento de que algo ocorreu que leve, ou possa levar, a uma movimentação transfronteiriça não-intencional de um OGM, e se essa tiver efeitos adversos significativos na conservação e utilização sustentável da diversidade biológica e risco para a saúde humana, essa parte tem a obrigação de notificar quaisquer países afetados, organizações internacionais relevantes e a *Biosafety Clearing House*. A *Biosafety Clearing House* consiste numa base de dados central, a qual foi estabelecida pelo Protocolo de forma a facilitar a troca de informação sobre OGMs e auxiliar a implementação das suas disposições (SCBD, 2000).

O Protocolo aborda também a necessidade de existência de medidas relativas a um correto manuseamento e embalagem dos OGMs a ser transportados. Todas as transações devem ser acompanhadas de documentação que indique que os itens podem conter OGMs (SCBD, 2000).

O Protocolo Suplementar de Nagoya-Kuala Lumpur fornece regras e procedimentos sobre a responsabilidade e reparação de danos à biodiversidade resultantes de OGMs.

O Protocolo define “dano” como qualquer efeito adverso à conservação e utilização sustentável da diversidade biológica, tendo também em conta os riscos para a saúde humana, que seja significativo, mensurável ou de outra forma observável, tendo em conta critérios cientificamente estabelecidos reconhecidos por uma autoridade competente. Um efeito adverso significativo será definido por fatores como a ocorrência de alterações permanentes ou a longo prazo, a extensão das alterações qualitativas ou quantitativas resultantes, e a abrangência dos impactos na saúde humana (SCBD, 2011).

As partes devem exigir que os responsáveis pelos danos informem imediatamente as autoridades, avaliem os danos e tomem medidas de resposta apropriadas. As autoridades devem

também avaliar o dano, assim como identificar o operador que provocou o dano e determinar medidas de resposta necessárias. Quando os operadores falham em tomar medidas, estas podem ser implementadas diretamente por parte das autoridades (Lefeber, 2012).

O Protocolo Suplementar permite às partes a tomada de disposições específicas segundo as leis do respetivo país. Permite efetuar isenções de responsabilidade quando existem atos de guerra, agitação civil, ocorrências de força maior ou outros casos que as partes considerem apropriados. A lei do respetivo país pode também ser utilizada para estabelecer o tempo e limites financeiros de responsabilidade pelos custos incorridos em resposta a eventos prejudiciais provocados por OGMs (SCBD, 2011).

10.2. Europa

Na União Europeia, a utilização de engenharia genética é altamente regulada, tendo sido estabelecido um enquadramento legal extensivo desde o início da década de 1990. O seu principal objetivo passa pela proteção da saúde e ambiente, onde um OGM ou um produto alimentar derivado de um OGM pode apenas ser colocado no mercado europeu após a sua autorização, através de um procedimento detalhado com base em avaliações científicas do seu risco para a saúde e ambiente (Plan and Eede, 2010).

As duas principais ferramentas legais da legislação europeia sobre OGMs consistem na Diretiva 2001/18/EC, a qual revoga a anterior Diretiva 90/220/CEE de 23 de Abril de 1990 do Conselho, e que é referente à libertação deliberada de OGMs no ambiente para qualquer fim diferente da colocação no mercado, e à colocação no mercado de produtos que contenham ou sejam constituídos por OGMs; e no Regulamento (CE) nº 1829/2003, relativo a alimentos e rações GM (Plan and Eede, 2010).

A Diretiva 2001/18/EC define “libertação deliberada” como qualquer introdução intencional no ambiente de um OGM sem que se recorra a medidas específicas de confinamento com o objetivo de limitar o seu contacto com a população em geral e com o ambiente. Por “colocação no mercado” entende-se qualquer colocação à disposição de terceiros, quer a título oneroso, quer gratuito (European Commission, 2001).

A Diretiva começa por efetuar uma definição de OGM, sendo este qualquer organismo, à exceção do ser humano, no qual o material genético foi alterado de uma forma que não ocorre naturalmente por meios de cruzamento e/ou recombinação naturais.

Para tal, são utilizadas técnicas de recombinação de ácidos nucleicos que envolvam a formação de novas combinações de material genético, através da inserção de moléculas de ácidos nucleicos em

vírus, plasmídeos de bactérias ou outros vetores, independentemente do modo como sejam produzidas fora do organismo, e respetiva incorporação num organismo hospedeiro em que não ocorrem naturalmente, mas onde poderão continuar a ser propagadas; ou técnicas que envolvam a introdução direta num organismo de material geneticamente transmissível preparado fora desse organismo, como a microinjeção (European Commission, 2001).

São também definidos parâmetros como:

- Princípios para avaliação de risco ambiental antes de qualquer libertação de OGMs no ambiente.
- Obrigatoriedade de rotulagem e rastreabilidade de OGMs em todas as fases da sua colocação no mercado.
- Requerimentos obrigatórios de monitorização pós-comercialização, incluindo efeitos a longo prazo associados à interação com outros OGMs e com o ambiente.
- Aprovações para a libertação de OGMs limitada a um máximo de dez anos, podendo posteriormente ser renovadas.
- Obrigatoriedade de informação ao público, incluindo registos públicos sobre a libertação deliberada de OGMs no ambiente.

10.2.1. Avaliação de Riscos

O objetivo de uma avaliação dos riscos ambientais consiste em definir e avaliar, caso a caso, os potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana e sobre o ambiente, quer estes sejam diretos ou indiretos, a curto ou longo prazo, relativamente à libertação voluntária do OGM ou da sua colocação no mercado. Deverá ser feita uma caracterização de cada potencial efeito adverso, uma estratégia de gestão de riscos quando necessário, assim como uma avaliação do risco global do OGM. (European Commission, 2001)

Devem ser tidos em conta potenciais efeitos adversos, como:

- Efeitos na dinâmica das populações de espécies presentes no meio, como a persistência e invasividade do OGM, interações do OGM com organismos não-alvo, e transferência de genes para outros organismos.
- Alterações na suscetibilidade a agentes patogénicos, e comprometimento da eficácia de cuidados médicos, veterinários ou fitossanitários, devido a ocorrências como a transferência de genes de resistência a antibióticos utilizados na medicina humana ou veterinária.

- Efeitos sobre a biogeoquímica.
- Condições que acometam o ser humano, animais e plantas, como reações tóxicas ou alérgicas.

10.2.2.Libertações Deliberadas no Ambiente

De forma a ser obtida autorização para a realização de liberações deliberadas no ambiente, deverá constar na aplicação informações como (European Commission, 2001):

- Descrição geral das características modificadas.
- Métodos utilizados para a modificação.
- Descrição da sequência inserida, incluindo a fonte dos ácidos nucleicos utilizados para a transformação, dimensão e função pretendida de cada fragmento constitutivo da região destinada a inserção.
- Localização dos segmentos de ácidos nucleicos modificados/inseridos/suprimidos.
- Verificação da estabilidade genética do organismo.
- Nível de expressão do novo material genético.
- Partes do organismo onde a sequência inserida se exprime.
- Natureza e origem do vetor utilizado, indicando em que medida o vetor se limita ao DNA necessário para executar a função pretendida.
- Descrição das técnicas de identificação e deteção, incluindo o seu grau de sensibilidade, especificidade e fiabilidade.

A notificação deverá ser apresentada à autoridade competente do Estado Membro em cujo território terá lugar a libertação, sendo esta a autorizar ou rejeitar o pedido, o que torna a sua aprovação um processo exclusivamente nacional. Caso haja aprovação, o aplicante poderá libertar o OGM de acordo com as condições definidas na respetiva autorização, e são disponibilizadas informações públicas (Plan and Eede, 2010).

10.2.3.Colocação de OGMs no Mercado

Para a colocação de produtos no mercado que contenham ou sejam constituídos por OGMs, para além das informações requeridas e mencionadas anteriormente para liberações deliberadas no ambiente, é também necessário incluir a realização de análises bioinformáticas utilizando bases de dados atualizadas para a pesquisa de eventuais homologias entre sequências inseridas (ou novas

proteínas expressas) e genes conhecidos (ou péptidos conhecidos) que possam ter efeitos adversos, e a colocação num formato eletrónico normalizado das sequências do material genético inserido (European Commission, 2001).

O procedimento de autorização para a colocação de OGMs no mercado, contrariamente ao de libertações deliberadas no ambiente, é um processo comunitário que envolve todos os estados membros, e não um processo nacional. Tal justifica-se pelo facto de a autorização do produto implicar a sua livre movimentação através do território europeu (Plan and Eede, 2010).

A notificação para a colocação de um novo produto no mercado é primeiramente submetida à autoridade nacional competente de um Estado Membro. Deverá conter uma proposta de período de consentimento que não exceda dez anos, assim como uma proposta de rotulagem (que inclua a designação “Este produto contém organismos geneticamente modificados”), e um plano de monitorização pós-comercialização (European Commission, 2001).

Após a receção da notificação, a autoridade nacional deverá emitir um parecer relativo à sua avaliação e, caso este seja positivo, informar os restantes Estados Membros através da Comissão Europeia. Posteriormente, a Comissão pedirá um parecer à EFSA, a qual é composta por cientistas independentes, qualificados em áreas como a biologia, medicina, química, nutrição e toxicologia (Plan and Eede, 2010).

No caso de um parecer favorável por parte da EFSA, a Comissão apresenta um projeto de decisão ao Comité Regulador, composto por representantes dos Estados Membros. Se o parecer do Comité for favorável por maioria qualificada, a Comissão adota a decisão; caso contrário, o projeto de decisão é submetido ao Conselho de Ministros para que este seja aprovado ou rejeitado por maioria qualificada (Plan and Eede, 2010).

A permissão para a sua colocação no mercado é dada por um máximo de dez anos, podendo posteriormente ser renovada. Esta é válida em toda a Comunidade Europeia; contudo, um Estado Membro pode proibir a colocação do OGM no mercado do seu território (European Commission, 2001).

Durante o processo de autorização, o público pode consultar informações disponibilizadas, como o resumo das notificações apresentadas pelos aplicantes, os relatórios de avaliação das autoridades competentes nacionais, os pareceres da EFSA e as decisões de autorização da Comissão Europeia (Plan and Eede, 2010).

10.2.4. Utilização de OGMs como Alimentos e Rações

O Regulamento (CE) nº 1829/2003 regula a colocação no mercado de alimentos e rações que contenham, consistam ou sejam produzidos a partir de OGMs. Os seus principais objetivos consistem na proteção do ambiente, da vida e saúde humana e do bem-estar e saúde animal. São estabelecidos procedimentos comunitários para a autorização e supervisão de alimentos e rações GM, assim como para a rotulagem dos mesmos (European Commission, 2003a).

As principais disposições do Regulamento (CE) nº 1829/2003 definem a existência de um único procedimento europeu harmonizado, aprovações limitadas a um máximo de dez anos (podendo posteriormente ser renovadas), a submissão de amostragem e métodos de deteção, um limiar de 0.9% para alimentos/rações cuja presença de material GM seja adventícia ou tecnicamente inevitável, e a obrigatoriedade de rotulagem a partir desse valor (European Commission, 2003a).

A aplicação para autorizar a colocação de um alimento/ração GM no mercado deverá ser enviada para a autoridade competente nacional, contendo as informações relativas aos estudos de segurança efetuados para demonstrar que o produto não apresenta efeitos adversos para a saúde humana, animal e ambiente, assim como as informações supracitadas. A aplicação deverá posteriormente ser enviada para a EFSA, sendo esta responsável pela avaliação científica do risco para o ambiente, saúde humana e animal. O parecer da EFSA é disponibilizado ao público, o qual poderá expressar a sua opinião (Plan and Eede, 2010).

A avaliação da EFSA inclui a validação do método de deteção submetido para o respetivo produto; um alimento/ração GM não pode ser autorizado na União Europeia sem que um método de deteção seja validado (Plan and Eede, 2010).

Após a receção do parecer da EFSA, a Comissão Europeia submete um projeto de decisão ao *Standing Committee on the Food Chain and Animal Health*, composto por representantes dos Estados Membros. Caso o parecer do Comité seja favorável, a Comissão adota o projeto de decisão; caso tal não aconteça, o projeto de decisão é submetido ao Conselho de Ministros para que seja adotado ou rejeitado por maioria qualificada. Uma vez concedida, a autorização para um alimento/ração GM é válida em toda a Comunidade Europeia (Plan and Eede, 2010).

10.2.5. Rastreabilidade

Produtos que tenham sido autorizados encontram-se sujeitos a requisitos de rastreabilidade. Define-se rastreabilidade como a capacidade de rastrear produtos em todas as fases da sua colocação no mercado. A sua execução permite uma monitorização específica de potenciais efeitos para a saúde e

ambiente, quando necessário; uma verificação e controlo de informações contidas na rotulagem; e uma remoção de produtos caso se identifique um risco imprevisto para a saúde e ambiente (European Commission, 2001, 2003a).

Produtos que consistam ou contenham OGMs possuem diferentes requisitos de rastreabilidade relativamente a produtos que tenham sido produzidos a partir de OGMs. No primeiro caso, deve garantir-se que o operador que receba o produto seja informado por escrito de que este contém ou consiste em OGMs, juntamente com a presença dos identificadores únicos atribuídos aos respetivos OGMs. No segundo caso, deve garantir-se que o operador que receba o produto seja informado por escrito sobre os ingredientes produzidos a partir de OGMs. Em ambos os casos, deve manter-se um registo de informações durante um período de cinco anos a partir de cada transação que inclua a identificação do operador que disponibilizou e do operador ao qual foi disponibilizado o produto (Plan and Eede, 2010).

10.2.6. Rotulagem

Para além da rastreabilidade, produtos que tenham sido autorizados encontram-se sujeitos a requisitos de rotulagem. A sua execução permite ao comprador do produto a toma de uma escolha informada (European Commission, 2001, 2003a).

A rotulagem deverá incluir os termos “geneticamente modificado” ou “produzido a partir de (nome do ingrediente) geneticamente modificado”. A rotulagem inclui também produtos altamente refinados, como o óleo obtido a partir de soja ou milho GM (Plan and Eede, 2010).

Produtos convencionais, produzidos sem recurso a modificação genética, podem involuntariamente conter vestígios de OGMs, devido a polinizações cruzadas durante o cultivo, ou devido a misturas adventícias ou tecnicamente inevitáveis de compostos GM e não-GM durante a colheita, armazenamento, transporte ou processamento. Desta forma, a legislação estabeleceu um limiar de 0.9% para excluir a necessidade de rastreabilidade e rotulagem para estes produtos convencionais (European Commission, 2003a).

10.2.7. Detecção de OGMs

A legislação estipula que a aplicação para a autorização de produtos GM deve incluir métodos para a deteção do evento, para além de amostras do produto e respetivos controlos. O aplicante deverá fornecer descrições detalhadas do método, de forma a que possa ser aplicado independentemente noutros laboratórios, e relatórios de ensaios realizados. Deverá ser um método altamente específico

para o respetivo evento, permitindo efetuar deteções/quantificações inequívocas. Através da introdução das sequências específicas de evento numa base de dados molecular, é possível verificar a especificidade do método através de pesquisas de homologia (European Commission, 2003a).

O *Joint Research Center* (JRC) da Comissão Europeia é o Laboratório de Referência da Comunidade. Este deve ser assistido pelos laboratórios nacionais de referência, os quais constituem o consórcio designado por *European Network of GMO Laboratories* (ENGL) (Plan and Eede, 2010).

De entre as incumbências do JRC, incluem-se:

- Receção e distribuição das amostras de controlo aos membros da ENGL.
- Avaliação e validação dos métodos de deteção.
- Submissão de relatórios completos de avaliação à EFSA.
- Coordenar a aplicação dos métodos pelos laboratórios nacionais de referência.
- Realização de controlos oficiais.
- Dar assistência científica e técnica à Comissão, especialmente em casos de contestação de resultados por parte dos Estados Membros.

10.2.8. Coexistência Entre Culturas GM e Culturas Convencionais

As medidas de coexistência em vigor na União Europeia têm como objetivo evitar a presença não-intencional de culturas GM em culturas convencionais, prevenindo potenciais perdas económicas e os impactos resultantes desta mistura (European Commission, 2010b).

Um produto convencional que tenha sofrido a presença adventícia de OGMs e se encontre acima do limiar estabelecido pela legislação europeia, terá de ser rotulado como um produto que contém OGMs. Isto poderá provocar perdas económicas devido a um preço de mercado mais reduzido, a uma dificuldade acrescida em vender o produto, ou a custos adicionais para os produtores caso estes tenham de adotar sistemas de monitorização e medidas para minimizar a mistura de culturas GM e não-GM (European Commission, 2010b).

O desenvolvimento e gestão das medidas de coexistência cabe a cada um dos Estados Membros de acordo com o princípio de subsidiariedade. Apesar da inexistência de legislação europeia sobre coexistência, a Comissão, de forma a auxiliar os Estados Membros no desenvolvimento de abordagens nacionais, desenvolveu diretrizes não-vinculativas para o desenvolvimento de estratégias e boas práticas que garantam a coexistência de culturas GM e não-GM (European Commission, 2010b).

É reconhecido por parte das diretrizes que muitos dos fatores importantes neste contexto são específicos das condições nacionais, regionais e locais. A *European Coexistence Bureau*, pertencente

ao JRC, realiza e mantém atualizada uma lista de medidas e de fatores agronómicos, naturais e específicos de culturas para serem considerados aquando do desenvolvimento de medidas nacionais. Os Estados Membros deverão contribuir continuamente para a *European Coexistence Bureau* (European Commission, 2010b).

10.2.9.A Europa no Contexto Internacional

A Comunidade Europeia faz parte do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança. A incorporação do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança na legislação europeia baseia-se fundamentalmente na Diretiva 2001/18/EC, que aborda, em particular, a regulação de importações de OGMs para a União Europeia (European Commission, 2001), e no Regulamento (CE) n.º 1946/2003 sobre movimentações transfronteiriças de OGMs, que trata principalmente sobre a regulação de exportações de OGMs a partir da União Europeia (European Commission, 2003b).

O Regulamento (CE) n.º 1946/2003 estipula a obrigatoriedade de notificar as exportações de OGMs destinados a uma libertação deliberada no ambiente; assegurar o consentimento expreso antes de um primeiro movimento transfronteiriço; e a obrigatoriedade de fornecer informações ao público e aos parceiros internacionais sobre a legislação, práticas e decisões europeias relativas a OGMs (European Commission, 2003b). O JRC é a entidade europeia que estabelece contacto com a *Biosafety Clearing House* (Plan and Eede, 2010).

10.3. Portugal

Em Portugal, as regras estabelecidas para o cultivo e comercialização de OGMs baseiam-se fundamentalmente nos Decretos-lei n.º 72/2003, 168/2004 e 160/2005.

O Decreto-lei n.º 72/2003, emitido pelo Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente, regula a libertação deliberada no ambiente de OGMs para qualquer fim diferente da colocação no mercado, bem como a colocação no mercado de produtos que os contenham ou por eles sejam constituídos, transpondo para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2001/18/CE do Parlamento Europeu e do Conselho (MCOTA, 2003).

10.3.1.Libertação Deliberada no Ambiente

A libertação deliberada no ambiente de um OGM encontra-se sujeita à autorização prévia da autoridade competente, nomeadamente, a Agência Portuguesa do Ambiente. O interessado na libertação deverá submeter à Agência Portuguesa do Ambiente uma notificação que contenha

informações como a avaliação efetuada de riscos ambientais e métodos utilizados; interações do OGM com o ambiente; planos de monitorização e avaliação dos efeitos do OGM para a saúde humana ou ambiente; e informações sobre o controlo, métodos de remediação, tratamento de resíduos e planos de emergência (MCOTA, 2003).

Após ouvir os pareceres da Direção-Geral de Saúde e Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, cabe à Agência Portuguesa do Ambiente autorizar a libertação, inspecionar e controlar a libertação, juntamente com a Inspeção-Geral do Ambiente, assim como suspender autorizações. Antes da tomada de decisão, o público deverá ser consultado e as suas opiniões tidas em conta. Um resumo de cada notificação recebida, assim como da decisão final, é enviado para a Comissão Europeia pela Agência Portuguesa do Ambiente (MCOTA, 2003).

10.3.2. Colocação de Produtos GM no Mercado

A colocação pela primeira vez no mercado de um produto que contenha ou seja constituído por OGMs requer a submissão de uma notificação à Agência Portuguesa do Ambiente, a qual ouvirá os pareceres da Direção-Geral de Saúde e da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. As informações deverão ser enviadas à Comissão Europeia e aos restantes Estados Membros, e a autorização publicada em *Diária da República* (MCOTA, 2003).

É da incumbência da Agência Portuguesa do Ambiente autorizar a sua colocação no mercado; inspecionar e tomar medidas de controlo, com a coadjuvação da Inspeção-Geral do Ambiente; verificar se as condições de rotulagem do produto estão em conformidade; limitar o prazo da autorização ou proibir provisoriamente a colocação no mercado de um produto autorizado; solicitar informações, fazer comentários ou apresentar objeções em relação à colocação no mercado de OGMs em processos a decorrer noutros Estados Membros; facultar informações ao público sobre os OGMs colocados no mercado (MCOTA, 2003).

10.3.3. Coexistência Entre Culturas GM e Culturas Convencionais

O Decreto-Lei nº 160/2005, emitido pelo Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, tem como objetivo a regulação do cultivo de variedades GM, visando assegurar a sua coexistência com culturas convencionais e com o modo de produção biológico, sendo apresentadas normas técnicas para o seu cultivo (MADRP, 2005).

O disposto no Decreto é aplicável às variedades GM inscritas nos Catálogos Comuns de Variedades de Espécies Agrícolas e Hortícolas, ou no Catálogo Nacional de Variedades de Espécies Agrícolas e de Espécies Hortícolas (MADRP, 2005).

Os agricultores que pretendam cultivar variedades GM devem participar, antes de iniciar pela primeira vez o cultivo de variedades GM, em ações de formação cujo conteúdo é aprovado pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. A formação aborda as normas a aplicar ao cultivo de variedades GM, nomeadamente no que respeita às medidas de minimização da presença acidental de pólen, e de minimização da presença acidental proveniente de misturas mecânicas associadas a operações de sementeira, colheita, transporte e armazenamento. Incluem-se também as normas relativas à rastreabilidade e rotulagem de produtos (MADRP, 2005).

A respetiva Direção Regional de Agricultura deverá ser notificada, indicando-se a variedade GM a cultivar, área, local, e medidas de coexistência que serão aplicadas. As Direções Regionais de Agricultura deverão enviar as informações para a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, a qual fará uma apreciação, e comunicará com a Agência Portuguesa do Ambiente (MADRP, 2005).

A execução de ações de controlo e fiscalização é feita pelas Direções Regionais de Agricultura. São realizadas aleatoriamente, devem incidir sobre as fases do ciclo vegetativo da cultura e sobre as instalações, equipamentos agrícolas, em qualquer período do processo de produção, armazenamento e entrega (MADRP, 2005).

O Decreto-lei nº 168/2004, emitido pelo Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente, pretende assegurar a rastreabilidade e rotulagem de produtos que contenham ou sejam constituídos por OGMs. São definidas as ações consideradas como contraordenações, e são atribuídas competências fiscalizadoras e sancionatórias à Inspeção-Geral do Ambiente, Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, e à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (MCOTA, 2004).

10.4. EUA

Nos EUA, os OGMs são regulados de acordo com a legislação da saúde, segurança e ambiente que rege os produtos convencionais, não existindo leis federais que sejam específicas para os mesmos. A sua abordagem em relação aos OGMs baseia-se na premissa de que a regulação deve concentrar-se na natureza do produto, ao invés do processo pelo qual foi produzido. Comparativamente com outros países, a regulação de OGMs é relativamente favorável ao seu desenvolvimento. Os EUA não fazem parte do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (Pew, 2001).

Relativamente à rotulagem, não existem leis que exijam a sua execução em alimentos GM ou alimentos com ingredientes GM. A *Food and Drug Administration* (FDA) declara que se um produto alimentar GM não for materialmente diferente do seu equivalente tradicional, não existe a necessidade de rotulagem ou alteração do nome do produto; porém, é apropriada a alteração do nome do produto quando um alimento GM for tão distinto do seu equivalente tradicional que o mesmo nome não descreva adequadamente o novo alimento, ou caso existam questões de segurança sobre as quais os consumidores deverão ser alertados, como a presença de alergénios (FDA, 1992).

Os três principais organismos envolvidos na regulação de OGMs são a *US Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service* (APHIS), FDA e *Environmental Protection Agency* (EPA).

A plantação, importação e transporte de plantas GM é regulada pela APHIS ao abrigo da *Plant Protection Act*. A *Secretary of Agriculture* é autorizada a proibir ou restringir a importação, entrada, exportação ou movimentação de quaisquer plantas ou produtos vegetais considerados prejudiciais a animais ou ao ambiente. Uma planta GM deverá ser aprovada pela APHIS, o que pode acontecer de três formas: através de um processo de notificação, de um processo de permissão ou da determinação de um estatuto não-regulado (USC, 2000).

O processo de notificação está disponível para plantas que não sejam classificadas como prejudiciais a animais ou ao ambiente, se determinados critérios e padrões de execução forem cumpridos. Alguns dos critérios passam pela planta ser de uma espécie que a APHIS tenha determinado como de introdução segura, que o material genético seja integrado de forma estável e que a expressão do material genético não resulte em doenças para as plantas. Os padrões de execução são relativos à expedição, armazenamento, plantação e testes, e destinam-se a impedir que a planta seja libertada do seu espaço de contenção (CFR, 2003).

O processo de permissão requer que o aplicante submeta informações como o organismo dador, recetor e composição do organismo a ser aprovado; a expressão do material genético alterado no organismo GM e uma caracterização de biologia molecular do sistema utilizado para produzir o organismo; o propósito do organismo; e processos para impedir a sua libertação. Caso a APHIS conceda a permissão, são estabelecidas condições que garantam que o organismo aprovado permanece contido e que a APHIS possa manter a supervisão regulatória (CFR, 2003).

Na determinação de um estatuto não-regulado, as plantas GM que foram testadas e demonstraram uma ausência de riscos, podem ser elegíveis para este processo. Um pedido para a obtenção deste estatuto deve incluir informação biológica detalhada sobre o organismo em causa e o organismo recetor, estudos científicos, informações de testes de campo e outras informações que

possam auxiliar a APHIS a determinar se a planta constitui uma praga. Após a receção do pedido, é publicada pela APHIS uma notícia na *Federal Register* e permite um período de sessenta dias para discussão pública (CFR, 2003).

A FDA regula os OGMs presentes em alimentos para humanos e animais, assim como fármacos e produtos biológicos, sob a *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* e a *Public Health Service Act*.

Relativamente à alimentação, a maior parte dos alimentos derivados de OGMs são tratados de igual forma relativamente àqueles derivados de plantas criadas de forma convencional, sendo geralmente reconhecidos como seguros, dispensando a realização de uma pré-aprovação. Contudo, produtos GM que “difiram significativamente em estrutura, função ou composição de substâncias encontradas comumente em alimentos”, irão requerer uma aprovação prévia antes da entrada no mercado (FDA, 1992). A FDA aconselha aqueles que desenvolvem novas variedades de plantas destinadas a uso alimentar, incluindo OGMs, a iniciar um procedimento de consulta com a FDA, de forma a garantir que as questões de segurança relacionadas com a alimentação humana e animal, assim como outras questões regulatórias, como a rotulação, sejam resolvidas antes da distribuição comercial. O procedimento de consulta permite à FDA determinar a necessidade de ações regulatórias caso existam níveis significativamente aumentados de elementos tóxicos, redução de nutrientes importantes, novos alergénios, a presença de aditivos alimentares não-aprovados ou questões relacionadas com a segurança alimentar de novas proteínas produzidas (FDA, 1997).

A FDA possui também autoridade regulatória sobre fármacos em geral. As companhias interessadas em introduzir um novo fármaco no mercado dos EUA, devem submeter uma *New Drug Application* à FDA. Esta deve incluir informações abrangentes sobre a segurança e eficácia do fármaco, tais como a sua estrutura química, fabrico, estudos *in vitro* e em animais e informações clínicas. Os fármacos desenvolvidos através de engenharia genética devem seguir o mesmo processo (CFR, 2019b).

Produtos médicos, classificados como produtos biológicos, tais como vacinas, soros e derivados sanguíneos, são regulados pela FDA. Os produtos biológicos devem ser licenciados por si antes da sua introdução no mercado, quer estes envolvam modificações genéticas ou não. O processo de licenciamento requer a submissão de informações detalhadas sobre estudos laboratoriais e clínicos, métodos de fabrico e outras informações relevantes sobre a sua segurança e eficácia (CFR, 2019a).

A EPA regula os microrganismos e pesticidas GM de acordo com a *Toxic Substances Control Act* e *Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act*.

Sob esta regulamentação, os pesticidas não devem provocar efeitos adversos na segurança ambiental e alimentar. Todos os pesticidas devem ser registados junto da EPA antes de poderem ser

distribuídos comercialmente. De forma a efetuar-se o seu registo, estes deverão ser testados e a sua segurança comprovada. Uma aplicação de registo deve incluir informações respeitantes à tolerância de resíduos, testes realizados, rotulagem preliminar e outras informações sobre segurança. Cabe também à EPA a regulação de plantas que sejam geneticamente modificadas de forma a produzir substâncias destinadas ao controlo de pragas, sendo o seu procedimento de registo idêntico ao de pesticidas (USC, 2012).

A EPA determinou que os microrganismos GM são substâncias químicas sujeitas a regulamentação nos termos da *Toxic Substances Control Act*, e estabeleceu regulamentos para a realização de notificações antes de estes serem utilizados comercialmente. A notificação deve incluir informações sobre as características do microrganismo e a sua construção genética, os subprodutos do seu fabrico, utilização e descarte, e informações sobre efeitos no ambiente e saúde (CFR, 2011).

11. Estudo de Caso: Milho Transgénico MON 810 Resistente a Insetos

A empresa Monsanto desenvolveu uma alternativa aos inseticidas químicos para o controlo de pragas através de modificações genéticas à planta de milho (Monsanto, 2007c). A linha de milho transgénico MON 810 resistente a insetos foi desenvolvida na década de 1990 e designa-se pelo nome comercial de *YieldGard*. O seu identificador único consiste em MON-ØØ81Ø-6 (Monsanto, 2002; Bertho et al., 2020).

Trata-se de uma linha substancialmente equivalente a variedades de milho convencional, à exceção da produção em baixas concentrações da proteína Cry1Ab, idêntica à encontrada na natureza e utilizada numa variedade de formulações comerciais, expressa naturalmente pela bactéria *Bacillus thuringiensis* e que possui um efeito inseticida para com algumas espécies de insetos prejudiciais às culturas de milho (Monsanto, 2007c).

O evento de milho MON 810 encontra-se aprovado em diversos países em todo o mundo. A Tabela 6 enumera estes países, o respetivo ano e tipo de aprovação (ISAAA, 2019b).

Tabela 6: Países a nível mundial que aprovaram o evento de milho MON 810, o respetivo ano e tipo de aprovação.

Adaptado de ISAAA, 2019b.

País	Aprovação para alimentos (uso direto ou processamento)	Aprovação para rações (uso direto ou processamento)	Aprovação para cultivo (uso doméstico ou não-doméstico)
Estados Unidos da América	1996	1996	1996
Canadá	1997	1997	1997
África do Sul			1997
União Europeia	1998	1998	1998
Argentina	1998	1998	1998
Austrália	2000		
Nova Zelândia	2000		
Honduras			2001
Japão	2001	2003	2004
China	2002	2002	
Filipinas	2002	2002	2002
Taiwan	2002		
México	2002		
Coreia do Sul	2002	2004	
Uruguai	2003	2003	2003
Colômbia	2003	2006	2007
Suíça	2005	2005	
Brasil	2007	2007	2007
Chile			2007
Egipto			2008
Rússia	2009	2008	
Malásia	2010	2010	
Turquia		2011	
Paraguai	2012	2012	2012
Singapura	2014	2014	
Vietnam	2015	2015	
Nigéria	2019	2019	

As utilizações da linha de milho MON 810 são idênticas às de variedades convencionais, consistindo estas em alimentação animal, processamento em produtos alimentares e industriais, tais como a produção de álcool etílico através de fermentação, produção de farinha de milho por moagem seca, produção de amido altamente refinado e produtos adoçantes para alimentos através de moagem húmida, amidos industriais, rações com glúten de milho e farinha de glúten de milho (Monsanto, 2007c).

A proteína Cry1Ab possui toxicidade seletiva para com insetos da ordem Lepidoptera, nomeadamente para espécies como *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea grandiosella* e *Sesamia cretica*, sendo segura para outros seres-vivos, incluindo insetos não-alvo benéficos para as plantações (Monsanto, 2002, 2007c).

A espécie de insetos *Ostrinia nubilalis*, vulgarmente conhecida por broca europeia do milho, representa uma praga economicamente impactante que se espalhou ao longo das principais regiões de cultivo de milho dos EUA e da Europa (Monsanto, 2002). Dependendo da zona geográfica, a espécie *Ostrinia nubilalis* pode ter de uma a três gerações durante a época de crescimento do milho (Monsanto, 2007c). Os danos provocados por esta espécie à planta de milho caracterizam-se por alimentação das folhas pela primeira geração; escavação do caule pelas primeira e segunda gerações; alimentação do colar foliar e danos na bainha foliar e espiga pela segunda e terceira gerações. O controlo químico oferece uma utilidade limitada uma vez que a sua aplicação deverá ser efetuada antes de os insetos entrarem na planta; após a sua entrada, as substâncias químicas tornam-se ineficazes devido à inacessibilidade das mesmas (Monsanto, 2007c).

De forma a desempenhar a sua função inseticida, proteína Cry1Ab deverá ser ingerida pelo inseto. Apesar de a proteína na sua forma cristalina ser insolúvel em soluções aquosas de pH ácido ou neutro, o pH alcalino do intestino larvar dos insetos favorece a sua solubilização. A proteína solubilizada é então ativada por proteases no intestino do inseto e difunde-se através da membrana peritrófica até ao epitélio do intestino médio, onde se liga aos recetores específicos de alta afinidade na superfície do epitélio do intestino médio dos insetos-alvo. Como consequência das alterações nos seus eletrólitos e pH, o intestino fica paralisado, o inseto para de alimentar-se e morre. A proteína Cry1Ab afeta apenas os insetos lepidópteros que possuem os recetores específicos em causa. De forma a comprovar a sua eficácia, ensaios de campo efetuados nos EUA e Europa verificaram que as plantas de milho da linha MON 810 se encontravam essencialmente intactas pelas populações de *Ostrinia nubilalis* nativas e introduzidas experimentalmente (Monsanto, 2007c).

Algumas das vantagens do cultivo da linha de milho MON 810 incluem:

- Um controlo com toxicidade seletiva em relação às pragas de milho supracitadas, e consequente redução de prejuízo económico (Monsanto, 2002).
- Uma forma mais fiável, económica e menos trabalhosa de controlar as pragas em causa (Monsanto, 2007c).
- Eliminação de insetos-alvo, sem prejudicar outras espécies e insetos benéficos para as culturas (Monsanto, 2002, 2007c).

- Redução da utilização de inseticidas químicos, o que a torna mais amigável do ambiente (Monsanto, 2007c).
- Menor exposição dos agricultores a pesticidas químicos (Monsanto, 2007c).
- Redução dos níveis da micotoxina fumonisina nos grãos de milho (Monsanto, 2002).

11.1. Caracterização Genética da Linha de Milho MON 810

A linha de milho MON 810 foi desenvolvida através da transformação do milho convencional, família *Gramineae*, género *Zea*, espécie *mays* ($2n = 20$), linha germoplasma “*High Type-II*” (Hi-II) (Monsanto, 2007c). Para tal, foram utilizados os plasmídeos PV-ZMBK07 e PV-ZMGT10. A sua composição é constituída pelos seguintes elementos:

Plasmídeo PV-ZMBK07.

- **E35S**

Promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S (CaMV) que controla o gene *Cry1Ab*. Possui um tamanho de 0.61 Kb.

- **hsp70**

Intrão do gene *hsp70* (proteína de choque térmico) do milho, presente para aumentar os níveis de transcrição génica, com um tamanho de 0.80 Kb.

- **Cry1Ab**

O gene *Cry1Ab* é isolado a partir do DNA da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), subespécie *kurstaki*, estirpe HD-1 (B.t.k. HD-1), e codifica a proteína *Cry1Ab*. O gene e a proteína apresentam um tamanho de 3.46 Kb e de 1156 aminoácidos, respetivamente.

- **NOS 3'**

Sequência 3' não-traduzida de nopalina sintase (NOS3'), de 0.26 Kb, cuja função é fornecer o sinal de poliadenilação do mRNA e terminar a transcrição.

- **lacZ**

Região alfa do gene *lacZ* para a beta-galactosidase sob o controlo de um promotor bacteriano. Esta região contém um local de clonagem múltipla (poliligante) que permite a clonagem dos genes pretendidos dentro do plasmídeo. Tamanho de 0.24 Kb.

- **Ori-pUC**

Representa a origem de replicação para os plasmídeos pUC, permitindo a replicação dos plasmídeos em *E. coli*. Tamanho de 0.65 Kb.

- **nptII**

O gene *nptII*, isolado a partir do transposão Tn5 de *E. coli*, é utilizado como marcador selecionável. Codifica a enzima neomicina-fosfotransferase II que confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos como a neomicina ou canamicina, permitindo efetuar a seleção de bactérias que contêm o plasmídeo. O promotor deste gene apenas se encontra ativo em hospedeiros bacterianos. Gene de 0.79 Kb.

A Figura 12 ilustra os elementos constituintes do plasmídeo PV-ZMBK07, juntamente com os locais de restrição utilizados nos ensaios de *Southern Blot* (Monsanto, 1996, 2007c).

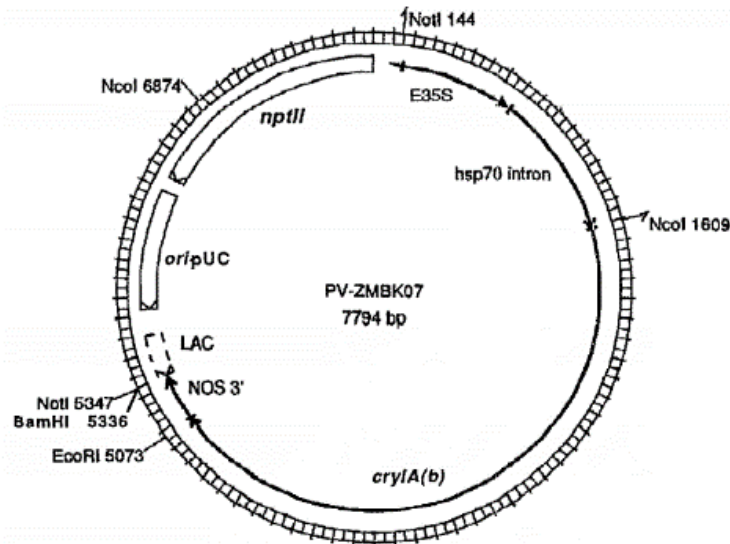


Figura 12: Mapa do plasmídeo PV-ZMBK07. Adaptado de Monsanto, 1996.

Plasmídeo PV-ZMGT10.

- **E35S**

Promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S (CaMV) que controla os genes *gox* e CP4 EPSPS. Possui um tamanho de 0.61 Kb.

- **hsp70**

Intrão do gene *hsp70* (proteína de choque térmico) do milho, presente para aumentar os níveis de transcrição génica, com um tamanho de 0.80 Kb.

- **CTP2**

Peptídeo de trânsito de cloroplasto, isolado a partir da enzima EPSPS de *Arabidopsis thaliana*, cuja função é encaminhar a proteína CP4 EPSPS para os cloroplastos (local de ação do glifosato). Possui um tamanho de 0.31 Kb.

- **CP4 EPSPS**

O gene CP4 EPSPS, isolado a partir da estirpe CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*, é utilizado como marcador selecionável. Codifica a enzima CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, a qual confere tolerância ao herbicida glifosato. O glifosato é utilizado como um agente seletivo que permite selecionar as células transformadas que receberam o gene Cry1Ab. Possui um tamanho de 1.4 Kb.

- **CTP1**

Sequência do peptídeo de trânsito de cloroplasto, derivada do gene SSU1A de *Arabidopsis thaliana*, cuja função é encaminhar a proteína GOX para os cloroplastos (local de ação do glifosato). O seu tamanho é de 0.26 Kb.

- **gox**

O gene *gox*, isolado a partir da estirpe LBAA de *Ochrobactrum anthropi*, é utilizado como marcador selecionável. Codifica a enzima glifosato oxirredutase (GOX), uma enzima que metaboliza o glifosato e confere tolerância ao herbicida. O glifosato é utilizado como um agente seletivo que permite selecionar as células transformadas que receberam o gene Cry1Ab. Possui um tamanho de 1.3 Kb.

- **NOS 3'**

Sequência 3' não-traduzida de nopalina sintase (NOS3'), de 0.26 Kb, cuja função é fornecer o sinal de poliadenilação do mRNA e terminar a transcrição.

- **lacZ**

Região alfa do gene *lacZ* para a beta-galactosidase sob o controle de um promotor bacteriano. Esta região contém um local de clonagem múltipla (poliligante) que permite a clonagem dos genes pretendidos dentro do plasmídeo. Tamanho de 0.24 Kb.

- **Ori-pUC**

Representa a origem de replicação para os plasmídeos pUC, permitindo a replicação dos plasmídeos em *E. coli*. Tamanho de 0.65 Kb.

- **nptII**

O gene *nptII*, isolado a partir do transposão Tn5 de *E. coli*, é utilizado como marcador selecionável. Codifica a enzima neomicina-fosfotransferase II que confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos como a neomicina ou canamicina, permitindo efetuar a seleção de bactérias que contêm o plasmídeo. O promotor deste gene apenas se encontra ativo em hospedeiros bacterianos. Gene de 0.79 Kb.

A Figura 13 ilustra os elementos constituintes do plasmídeo PV-ZMGT10 juntamente com os locais de restrição utilizados nos ensaios de *Southern Blot* (Monsanto, 1996, 2007c).

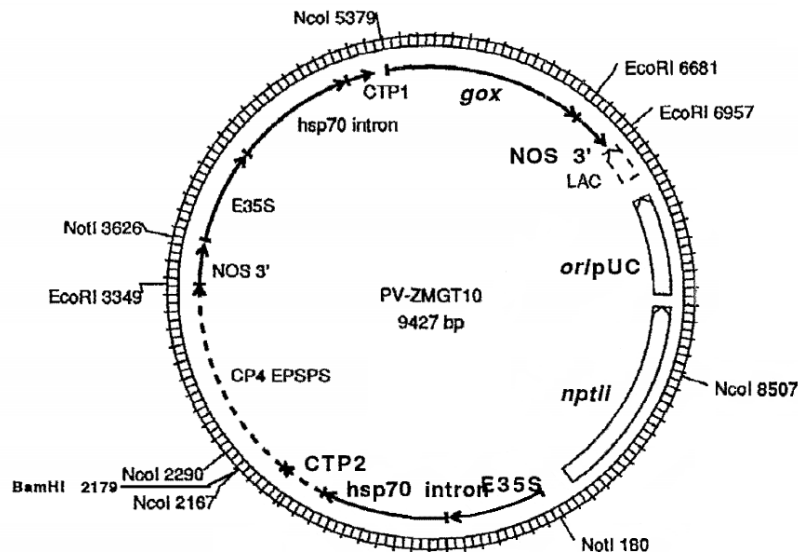


Figura 13: Mapa do plasmídeo PV-ZMGT10. Adaptado de Monsanto, 1996.

11.2. Método de Transformação

O DNA plasmídico é introduzido na planta através do método de biobalística. O DNA é precipitado em partículas microscópicas de ouro ou tungstênio utilizando cloreto de cálcio e espermidina. As partículas revestidas são aceleradas a uma alta velocidade e penetram nas células-alvo da planta, onde o DNA é depositado e incorporado no seu genoma. As células são incubadas num meio de cultura de tecidos contendo 2,4-D, o qual permite o crescimento do calo vegetal. Uma vez que o DNA introduzido contém genes que conferem resistência ao glifosato (CP4 EPSPS e *gox*), as células vegetais são cultivadas na presença do herbicida, e apenas as células transformadas continuam o

crescimento. As plantas são regeneradas a partir do tecido do calo vegetal tolerante, e são analisadas em relação à presença da proteína Cry1Ab expressa (Monsanto, 1996, 2007c).

11.3. Análise Molecular da Linha de Milho MON 810

A empresa Monsanto levou a cabo análises moleculares com o propósito de caracterizar o DNA integrado na linha de milho MON 810, utilizando ensaios *Southern Blot* para a análise do número de locais de integração no genoma do milho, e do número e integridade dos genes inseridos. Como controlo, utilizou-se a linha de milho MON 818, a qual não possui os genes Cry1Ab, gox ou CP4 EPSPS. O DNA utilizado foi isolado a partir do tecido de folhas das linhas de milho (Monsanto, 2007c).

De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que as únicas sequências de DNA inseridas na linha de milho MON 810 são as requeridas para a expressão do gene Cry1Ab que confere o fenótipo de proteção contra insetos; encontra-se presente uma integração de DNA contida num fragmento NdeI de aproximadamente 5.5Kb, constituído pelo promotor E35S, pelo intrão hsp70 e pelo gene Cry1Ab. Os genes CP4 EPSPS e gox não foram integrados (e as respetivas proteínas não foram detetadas), assim como também não foram integradas as sequências de estrutura, nptII/ori-pUC, dos plasmídeos PV-ZMBK07 e PV-ZMGT10 (Monsanto, 2007c).

Através de análises de segregação e *Southern Blot*, demonstrou-se que o gene Cry1Ab inserido se encontra integrado de forma estável no cromossoma da planta e é herdado como um único gene dominante, de acordo com os princípios mendelianos. A estabilidade da inserção foi comprovada através de sete gerações de cruzamentos (Monsanto, 2007c).

Estas análises e respetivos resultados efetuaram-se de acordo com as diretrizes da FDA (de forma a demonstrar-se que a nova variedade de planta desenvolvida com recurso a técnicas de engenharia genética é tão segura e nutritiva como o seu equivalente convencional) (Monsanto, 1996), e encontram-se também presentes na notificação submetida à Europa (Monsanto, 2007c). Os resultados encontram-se descritos de seguida.

11.3.1. Determinação do Número de Inserções na Linha de Milho MON 810

O resultado obtido para a determinação do número de inserções é ilustrado pela Figura 14. Observou-se que o DNA da linha MON 818, na faixa 1, produziu uma banda bastante leve e difusa de aproximadamente 21.0 Kb, sendo esta uma banda de fundo, dado que também se encontra presente na faixa 2, relativa ao DNA da linha MON 810. Na faixa 2 é observável uma banda de aproximadamente

5.5 Kb. Com este resultado concluiu-se que a linha MON 810 contém um fragmento de DNA integrado (Monsanto, 2007c).

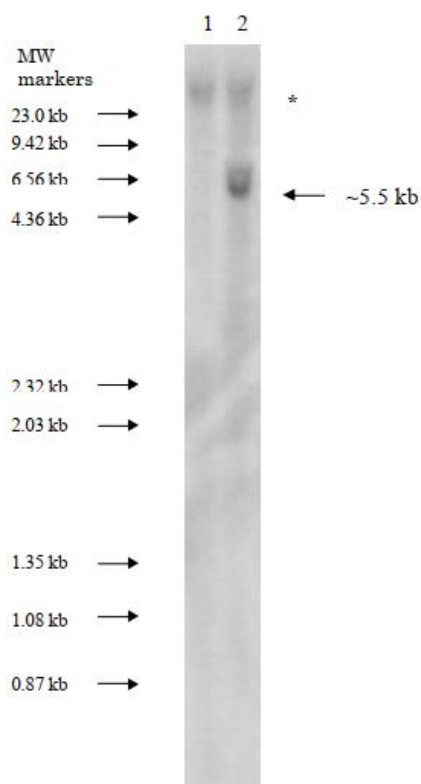


Figura 14: Ensaio *Southern Blot* para a análise do número de inserções na linha de milho MON 810. Adaptado de Monsanto, 2007.

11.3.2. Análise da Composição da Inserção

Relativamente à análise da composição da inserção, foi avaliada a integridade dos genes Cry1Ab, CP4 EPSPS e gox (Monsanto, 2007c).

Os resultados obtidos da avaliação da integridade do gene Cry1Ab encontram-se ilustrados na Figura 15. Na faixa 1, o controlo positivo de hibridação produziu um fragmento de 3.46 Kb, correspondendo ao tamanho esperado do gene Cry1Ab. Na faixa 2, o DNA da linha MON 818, como esperado, não produziu quaisquer bandas. O DNA da linha MON 810, na faixa 3, produziu uma banda de aproximadamente 3.1 Kb, sendo o suficiente para codificar uma proteína Cry1Ab ativa com capacidade inseticida (Monsanto, 2007c).

Análises *Western Blot* verificaram a existência do núcleo de resistência à tripsina da proteína Cry1Ab (porção com função inseticida ativa) o que permite um controlo inseticida efetivo (Monsanto, 2007c).

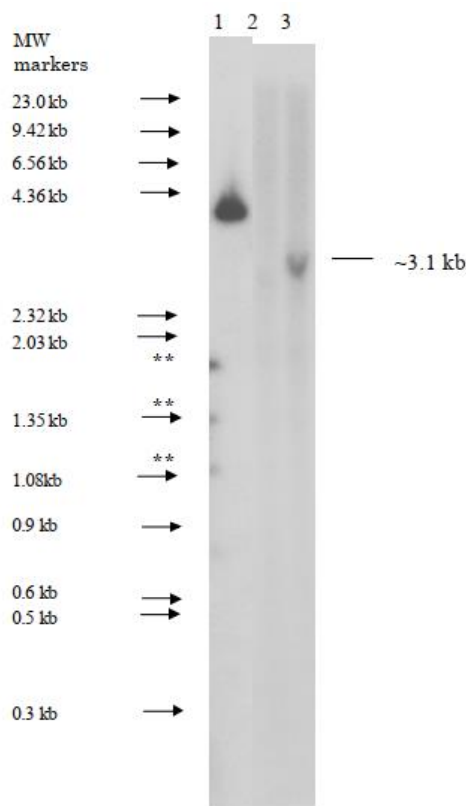


Figura 15: Ensaio *Southern Blot* para a análise da integridade do gene Cry1Ab. Adaptado de Monsanto, 2007.

A Figura 16 ilustra os resultados obtidos na avaliação da integridade dos genes CP4 EPSPS e gox. A faixa 1, com o DNA dos plasmídeos, produziu uma banda que corresponde ao tamanho esperado do fragmento CP4 EPSPS. O DNA da linha MON 810, na faixa 2, não produziu quaisquer bandas, demonstrando que a linha de milho MON 810 não contém o gene CP4 EPSPS (Monsanto, 2007c).

Na faixa 3, com o DNA dos plasmídeos, observou-se uma banda que corresponde ao tamanho esperado do fragmento gox. O DNA da linha MON 810, na faixa 4, não produziu quaisquer bandas, demonstrando que a linha de milho MON 810 não contém o gene gox. A ausência das proteínas CP4 EPSPS e gox na linha de milho MON 810 foi também confirmada através de ensaios *Western Blot* e ELISA (Monsanto, 2007c).

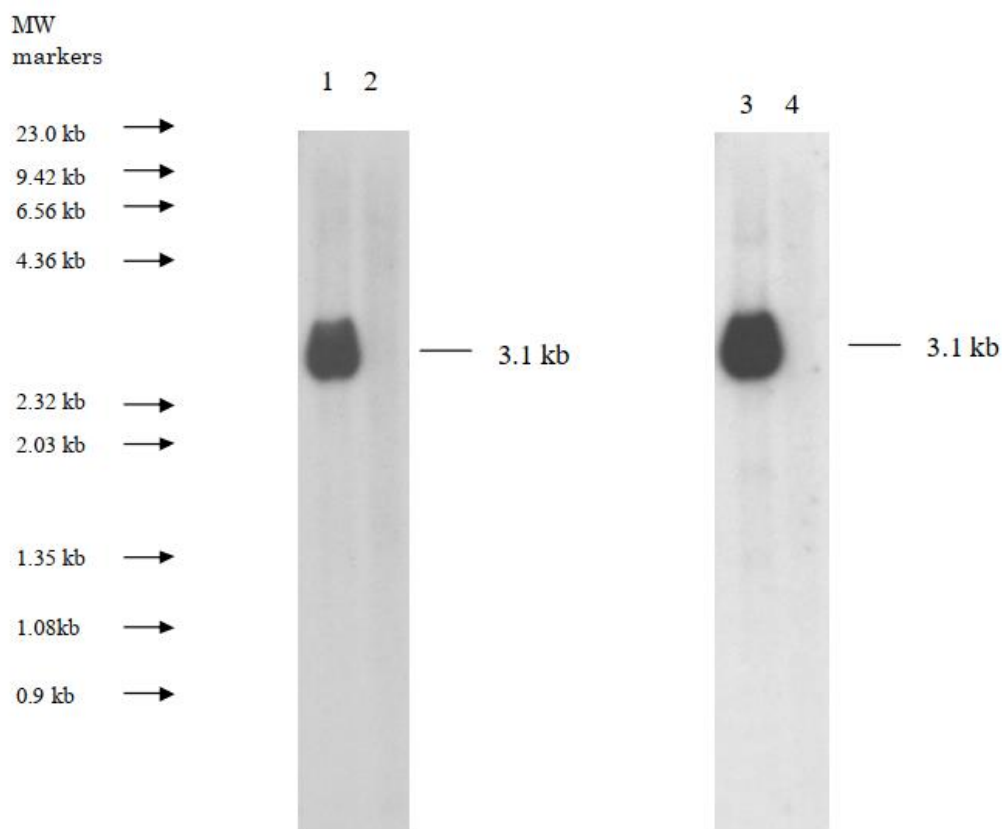


Figura 16: Ensaio *Southern Blot* para a análise da integridade dos genes CP4 EPSPS e gox. Adaptado de Monsanto, 2007.

11.4. Nível de Expressão do Material Genético Inserido

Foram recolhidas amostras de milho MON 810 de diferentes localizações geográficas, representando diferentes condições ambientais, e analisados os níveis de expressão da proteína Cry1Ab nos tecidos da planta através de ensaios ELISA (Monsanto, 2007c).

Em testes nos EUA, o intervalo de variação da presença da proteína Cry1Ab nas folhas da planta foi de 7.93-10.34 $\mu\text{g/g}$ do peso fresco do tecido. Em forragem, o intervalo situou-se entre 3.65-4.65. Observou-se um intervalo de 0.19-0.39 nos grãos de milho. Estes resultados foram de encontro aos obtidos em testes na Europa (Monsanto, 2007c).

Posteriormente, a descendência das plantas de milho MON 810 cultivadas nos testes foram cruzadas com linhas comerciais, dando origem a híbridos. A avaliação da expressão da proteína Cry1Ab revelou intervalos de variação de 8.20-10.51 $\mu\text{g/g}$ nas folhas da planta, 4.00-5.11 em forragem, e 0.35-0.60 nos grãos de milho (Monsanto, 2007c).

Os níveis da proteína Cry1Ab nos tecidos de plantas MON 810 provaram ser semelhantes quando estas são cultivadas em diferentes locais geográficos, ao longo da sua descendência, e quando esta é cruzada com outras linhas. A expressão mantém-se consistentemente elevada para controlar as espécies-alvo de insetos (Monsanto, 2007c).

11.5. Interações do OGM com o Ambiente e Saúde Humana

A linha de milho MON 810 tem vindo a ser testada desde a década de 1990, e os resultados das avaliações realizadas mostraram não existir diferenças, entre a linha de milho MON 810 e variedades de milho convencionais, relativamente a fatores como as suas características fenotípicas (à exceção da característica inseticida pretendida), vigor vegetativo, qualidade agronómica, maturidade da planta ou composição dos grãos de milho (Monsanto, 2007c).

Não foram observados efeitos adversos, sinais de toxicidade ou mortalidade relacionada com a proteína Cry1Ab para com espécies de insetos não-alvo como *Apis mellifera L.*, *Chrysopa carnea*, *Brachymeria intermedia* ou *Hippodamia convergens* (Monsanto, 2007c).

A avaliação de segurança da proteína Cry1Ab para a saúde humana dividiu-se em estudos relativos à digestão da proteína Cry1Ab em fluidos gástricos e intestinais simulados, estudos de gavagem em ratos para determinar a toxicidade aguda da proteína Cry1Ab, avaliação da homologia entre a proteína Cry1Ab e toxinas conhecidas, e avaliação do potencial alergénico da proteína Cry1Ab (Monsanto, 2007c).

Os estudos relativos à digestão da proteína Cry1Ab revelaram que esta é rapidamente degradada nos fluidos gástricos (Monsanto, 2007c).

Os resultados do estudo de gavagem em ratos para avaliar uma potencial toxicidade associada à proteína Cry1Ab demonstraram que a proteína não é tóxica para mamíferos (Monsanto, 2007c).

Realizou-se uma avaliação de homologia entre a sequência de aminoácidos da proteína Cry1Ab e toxinas conhecidas com recurso às bases de dados *GenBank*, *EMBL*, *PIR* e *SwissProt*, com base no facto de que padrões de sequências de aminoácidos ou regiões de elevada homologia entre proteínas podem fornecer informações sobre as suas atividades biológicas. Os resultados demonstraram que não existem homologias biologicamente significativas entre a sequência da proteína Cry1Ab e toxinas conhecidas (Monsanto, 2007c).

Na avaliação do potencial alergénico da proteína Cry1Ab, um dos fatores a considerar é a fonte do gene introduzido. Neste caso, a bactéria *Bacillus thuringiensis* não possui relatos de alergenicidade

ao longo dos anos de utilização comercial. De igual forma, a proteína Cry1Ab e outras proximamente relacionadas não possuem um histórico de alergenicidade (Monsanto, 2007c).

A comparação da sequência de aminoácidos desta proteína com sequências de aminoácidos de alérgenos conhecidos, com recurso às bases de dados *GenBank*, *EMBL*, *PIR* e *SwissProt*, não revelou homologies imunologicamente significativas (Monsanto, 2007c).

Para além disso, os níveis reduzidos da proteína nos grãos de milho, em combinação com a sua labilidade digestiva, torna improvável a ocorrência de respostas alérgicas (Monsanto, 2007c).

11.6. Análises Composicionais da Linha de Milho MON 810

Os grãos de milho e forragem de plantas MON 810, assim como da sua descendência, foram avaliados quanto à sua composição. Avaliaram-se parâmetros como proteínas, lípidos, cinzas, hidratos de carbono, matéria seca, calorias, humidade, aminoácidos, ácidos gordos, fibras em detergente ácido e fibras em detergente neutro (Monsanto, 2007c).

Os resultados obtidos demonstraram que a linha de milho MON 810 possui valores idênticos em todos os parâmetros analisados comparativamente com os controlos utilizados e com valores reportados na literatura para linhas comerciais (Monsanto, 2007c).

11.7. Método de Detecção

Para a deteção e quantificação específicas do evento de milho MON 810, uma técnica de PCR em tempo real foi validada num estudo colaborativo levado a cabo pela *Federal Institute for Risk Assessment* em colaboração com a *American Association of Cereal Chemists*, *JRC*, *Institute for Reference Material and Measurement*, *Institute for Health and Consumer Protection* e *GeneScan*. O estudo, que testou a reprodutibilidade e precisão do método, envolveu a participação de quinze laboratórios e foi realizado de acordo com diretrizes internacionalmente aceites. Os resultados obtidos foram avaliados segundo os critérios de aceitação e requisitos de desempenho estabelecidos pela ENGL (Mazzara et al., 2009).

O método foi otimizado para sementes de milho moídas contendo misturas de milho convencional e milho MON 810. Foram utilizadas amostras cujos conteúdos apresentavam diferentes percentagens de material GM (Mazzara et al., 2009).

O procedimento operacional do estudo colaborativo consistiu na extração de DNA das amostras e na realização da técnica de PCR em tempo real. Para a extração de DNA, foi utilizado o sistema *GENESpin*. Para a deteção específica do evento de milho MON 810, foi amplificado, através de PCR

TaqMan, um fragmento de 92 bp da fronteira de integração entre a sequência genômica e a sequência inserida que tem origem no promotor CaMV 35S. Para a quantificação relativa do evento de milho MON 810, amplificou-se um fragmento de 79 bp do gene específico de milho hmg (*high mobility group*), utilizando uma combinação de *primers* e sondas específicos para o gene (Mazzara et al., 2009).

Cada laboratório participante recebeu doze amostras desconhecidas, consistindo estas em seis materiais de referência certificados, cujos conteúdos GM de MON 810 variavam entre <0,02%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2% e 5% no milho convencional (w/w). Cada amostra foi analisada por RT-PCR em três repetições. Os *primers* e sondas *Taqman* utilizados no estudo estão descritos na Tabela 7 (Mazzara et al., 2009).

Tabela 7: Primers e sondas *TaqMan* utilizadas no estudo colaborativo. Adaptado de Mazzara et al., 2009 e JRC, 2016.

Sequência alvo do gene de referência (hmg)	
ZM1-F (primer forward)	5'-TTg gAC TAg AAA TCT CgT gCT gA-3'
	Elemento Alvo: hmg
ZM1-R (primer reverse)	5'-gCT ACA TAg ggA gCC TTg TCC T-3'
	Elemento Alvo: hmg
Tamanho do fragmento amplificado: 79 bp	
Sonda ZM1	5'-FAM—CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA-TAMRA-3'
Sequência alvo do OGM (fronteira de integração entre o evento MON 810 e o genoma hospedeiro do milho)	
Mail-F1 (primer forward)	5'-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA CgT-3'
	Elemento Alvo: 5'-genoma hospedeiro
Mail-R1 (primer reverse)	5'-gCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'
	Elemento Alvo: inserção
Tamanho do fragmento amplificado: 92 bp	
Sonda Mail-S2	5'-FAM-AAC ATC CTT TgC CAT TgC CCA gC-TAMRA P-3'
FAM: 6-carboxylfluorecein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine	

Foi utilizado um sistema *simplex*, em que a preparação da PCR para a sequência alvo do gene de referência, e para a sequência alvo do OGM, é efetuada em diferentes *ependorfs*. Os elementos da reação de amplificação no volume/concentração final, por *ependorf*, estão descritos na Tabela 8 (Mazzara et al., 2009).

Tabela 8: Elementos da reação de amplificação no volume/concentração final, por *ependorf*. Adaptado de Mazzara et al., 2009 e JRC, 2016.

Sequência alvo do gene de referência (hmg)		Sequência alvo do OGM	
Reagente	Concentração final	Reagente	Concentração final
AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG)	0.5 U	AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG)	0.5 U
DNA polimerase AmpliTaq Gold	1.25 U	DNA polimerase AmpliTaq Gold	1.25 U
TaqMan buffer A (com ROX)	1x	TaqMan buffer A (com ROX)	1x
MgCl₂	6.5 mmol/L	MgCl₂	6.5 mmol/L
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP)	200 µmol/L	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP)	200 µmol/L
dUTP		dUTP	400 µmol/L
Primer forward	0.30 µmol/L	Primer forward	0.30 µmol/L
Primer reverse	0.30 µmol/L	Primer reverse	0.30 µmol/L
Sonda	0.16 µmol/L	Sonda	0.18 µmol/L
DNA Template	2.3-150 ng	DNA Template	2.3-150 ng
Volume final	25 µL	Volume final	25 µL

As condições da reação de PCR consistiram em 1) descontaminação (opcional), em pré-PCR, com uma duração de 120 segundos a 50°C; 2) ativação da DNA polimerase e desnaturação inicial da cadeia de DNA, em pré-PCR, com uma duração de 600 segundos a 95°C; e 3) 45 ciclos de PCR, com a desnaturação a ocorrer durante 15 segundos a 95°C, e *annealing* durante 60 segundos a 60 °C (Mazzara et al., 2009; JRC, 2016).

A reprodutibilidade do método e a sua precisão foram comprovados através dos parâmetros de desvio padrão relativo de reprodutibilidade e de *bias* do método, respetivamente, os quais se encontraram dentro dos parâmetros estabelecidos (Mazzara et al., 2009).

Determinou-se que o limite absoluto de deteção do método consistia em cinco cópias da sequência alvo, e que o limite relativo de deteção do método era de, pelo menos, 0.1% (w/w). Verificou-se que o limite absoluto de quantificação era de dez cópias da sequência alvo, e que o limite relativo de quantificação era de, pelo menos, 0.1% (w/w) (Mazzara et al., 2009).

Os resultados obtidos no estudo inter-laboratorial indicam a aptidão do método para a deteção e quantificação do evento de milho MON 810. Os resultados relativos à sua exatidão e variabilidade

verificaram-se dentro dos critérios de aceitação e dos requisitos de desempenho estabelecidos pela ENGL (Mazzara et al., 2009).

Posteriormente, e de acordo com a legislação europeia, a validade do método foi verificada e confirmada pelo Laboratório de Referência da Comunidade, JRC (EFSA, 2009).

11.8. Rotulagem

De acordo com a legislação europeia, produtos alimentares e rações produzidos a partir de milho MON 810, que possuam conteúdos GM acima de 0.9%, deverão ser rotulados de forma a que estejam presentes os termos “produzido a partir de milho geneticamente modificado” (Monsanto, 2007a).

Para alimentos e rações que consistam ou contenham MON 810, que possuam conteúdos GM acima de 0.9%, a rotulagem deverá indicar “milho geneticamente modificado” ou “contém milho geneticamente modificado” (Monsanto, 2007b).

As entidades que vendem sementes MON 810 deverão rotular as embalagens de sementes com os termos “milho geneticamente modificado”, ou “contém milho geneticamente modificado”, e deverão também conter o identificador único relativo ao evento MON 810, MON-ØØ81Ø-6 (Monsanto, 2007b).

11.9. A Linha de Milho MON 810 no Enquadramento Europeu

Em 1995, a empresa Monsanto submeteu, de acordo com a Diretiva 90/220/EEC, uma aplicação para a importação e utilização, incluindo cultivo, de milho MON 810. A notificação foi submetida para França, país que desempenhou o papel de relator e que, seguidamente, encaminhou a informação recebida para a Comissão Europeia com uma opinião favorável. Os Estados Membros levantaram objeções. A Comissão Europeia procurou a opinião da *Scientific Committee on Plants*, a qual, a 10 de fevereiro de 1998, emitiu a sua opinião científica concluindo que não existiam evidências de que o milho MON 810, quando cultivado e processado, apresentasse efeitos adversos para a saúde humana, animal ou para o ambiente (Monsanto, 2019).

A 18 de março de 1998, o Comité Regulador, composto por especialistas dos Estados Membros, atribuiu um parecer favorável por maioria qualificada ao evento de milho MON 810 para importação e utilização, incluindo cultivo. A 3 de agosto de 1998, França, como país relator, ratificou a decisão da Comissão. De acordo com esta decisão, a empresa Monsanto terá de informar a Comissão Europeia e

as autoridades competentes dos Estados Membros, com uma periodicidade anual, sobre os resultados da monitorização da resistência de insetos à proteína Cry1Ab (Monsanto, 2019).

A 4 de maio de 2007, a empresa Monsanto submeteu à Comissão Europeia, de acordo com o Regulamento (CE) nº 1829/2003, uma aplicação para a renovação da autorização de comercialização de alimentos e rações que consistam, conttenham ou sejam produzidas a partir de milho MON 810, assim como de sementes para cultivo. A EFSA emitiu uma opinião científica positiva a 15 de junho de 2009 (Andersson et al., 2009; Monsanto, 2019).

Devido às contínuas discussões a nível político sobre a nacionalização do cultivo de OGMs, os processos de aplicação para renovação falharam em progredir desde a opinião positiva da EFSA publicada em 2009. De acordo com o enquadramento legal, os produtos anteriormente autorizados continuam legalmente no mercado até que uma decisão de reautorização seja tomada. De forma a conferir certeza ao comércio internacional de MON 810 para fins de alimentação e ração, a empresa Monsanto pediu à Comissão Europeia, a 9 de março de 2016, para avançar com duas decisões em separado para a renovação de autorizações, sendo estas: 1) alimentos e rações que consistam, conttenham ou sejam produzidas a partir de milho MON 810; e 2) utilização de sementes para cultivo. A Comissão Europeia adotou, a 4 de julho de 2017, a renovação da autorização para a colocação no mercado de MON 810 para todos os fins, exceto para cultivo (Monsanto, 2019). As sementes MON 810 para cultivo continuam legalmente no mercado, sem data de expiração, uma vez que a aplicação para renovação permanece pendente (European Commission, 2017).

Aquando da aplicação submetida em 2007 pela empresa Monsanto à Comissão Europeia, as entidades competentes nacionais dos países Áustria, França, Alemanha, Eslovénia, Holanda, Bélgica, Hungria, Irlanda, Itália, Noruega, Suécia e Reino Unido levantaram questões relativas ao transgénico em causa, durante o período de consulta aos Estados Membros estipulado pela Diretiva 2001/18/EC.

Os comentários efetuados abordavam questões como a falta de informação em vários tópicos; ambiguidades na informação submetida; inconsistências e incoerência da aplicação; apresentação confusa da informação; inexistência de referências a diversas publicações individuais; existência de informações discordantes na literatura; informação fornecida insuficiente para completar a avaliação de risco ambiental (ex: não ser apresentada uma análise de exposição válida de organismos não-alvo, e a avaliação de ecotoxicidade ser insuficiente); necessidade de um aprofundamento e de uma discussão em maior detalhe sobre alguns tópicos; incumprimento da totalidade dos requisitos do Regulamento 1829/2003, e impossibilidade em conceder a autorização requerida; parte substancial da informação fornecida não atualizada desde a aplicação de 1998; ausência de menção a novos estudos científicos; e

existência de preocupações baseadas em novas publicações científicas, sendo mencionados estudos científicos a ser tidos em conta (EFSA, 2008b, 2008a).

Sob o Artigo 23 da Diretiva 2001/18/EC, países como a França, Áustria, Grécia, Alemanha, Hungria e Luxemburgo baniram o cultivo de milho MON 810, com base em alegadas informações sobre potenciais impactos negativos deste transgénico (Bøhn, Primicerio and Traavik, 2012).

A suspensão alemã foi uma das que originou uma maior controvérsia. Em abril de 2009, a agência *Federal Office of Consumer Protection and Food Safety* do governo alemão suspendeu a aprovação e baniu o cultivo de milho MON 810 do seu território nacional (Bøhn, Primicerio and Traavik, 2012), evocando o Artigo 23, segundo o qual o cultivo de um OGM num Estado Membro da União Europeia pode ser temporariamente restringido ou proibido apenas se o “Estado-Membro, no seguimento de informações novas ou suplementares disponíveis [...] tiver razões válidas para considerar que um produto que contenha ou seja constituído por OGM [...] constitui um risco para a saúde humana ou para o ambiente” (DRZE, 2017).

O documento apresentado pelo governo alemão mencionava o surgimento de informações adicionais que forneciam razões justificadas para assumir que o cultivo de milho MON 810 constituía um perigo para o ambiente. Foi também afirmado não ser necessário esperar que os perigos relativos ao cultivo de milho MON 810 fossem completamente clarificados para que fossem tomadas medidas, o que pode considerar-se uma decisão que vai de encontro ao princípio da precaução. O governo alemão argumentou que o milho em questão representava um potencial perigo para o ambiente, em particular para artrópodes não-alvo, os quais representam uma parte importante da biodiversidade natural e agrícola, para além de desempenharem funções economicamente relevantes no ecossistema, como a polinização de frutos e vegetais (Bøhn, Primicerio and Traavik, 2012).

A principal controvérsia sobre o caso passou pelo facto de a suspensão alemã ao milho MON 810 ser ou não cientificamente justificável, em particular, se os estudos científicos referidos possuíam relevância e qualidade científica (nomeadamente sobre os seus métodos, controlos, poder estatístico, significância e interpretação) (Bøhn, Primicerio and Traavik, 2012).

De forma a levantar a suspensão, a empresa Monsanto iniciou um processo judicial após a decisão alemã, o qual foi rejeitado pelo tribunal por este considerar que as informações científicas da suspensão eram suficientes (Bøhn, Primicerio and Traavik, 2012).

A Diretiva (EU) 2015/412 de 11 de março de 2015 introduziu a possibilidade de um Estado Membro requerer que o âmbito geográfico de uma autorização para cultivo já concedida seja ajustada de forma a que todo ou parte do território desse Estado Membro seja excluído (European Commission, 2016a), sem existir a anterior necessidade de apresentar novas evidências científicas que demonstrem

os riscos do transgênico (DRZE, 2017). No seguimento da Diretiva (EU) 2015/412, a 3 de março de 2016, o âmbito geográfico de autorização de cultivo de milho MON 810 foi adaptado, onde dezanove Estados Membros requereram a proibição de cultivo de milho MON 810 em parte ou na totalidade do seu território. Estes países foram: Bélgica (território de Valónia), Bulgária, Dinamarca, Alemanha, Grécia, França, Croácia, Itália, Chipre, Letónia, Lituânia, Luxemburgo, Hungria, Malta, Holanda, Áustria, Polónia, Eslovénia e Reino Unido (territórios da Irlanda do Norte, Escócia e País de Gales) (European Commission, 2016a; Monsanto, 2019).

Apesar da redução significativa do número de países que cultivam milho MON 810, a área de cultivo na Europa, desde 2007, tem-se mantido relativamente estável com uma média de aproximadamente 120 000 hectares. A Tabela 9 enumera os hectares de área cultivada de milho MON 810 nos respetivos países ao longo dos anos (REA, 2019). Em 2018, o milho MON 810 era plantado em dois países da EU, nomeadamente Portugal, com uma área de plantação de 5 886 ha, e Espanha, com uma área de plantação de 115 246 ha (Monsanto, 2019).

Tabela 9: Número de hectares de área cultivada de milho MON 810 nos respetivos países da União Europeia ao longo dos anos. Adaptado de REA, 2019.

	Espanha	França	República Checa	Portugal	Alemanha	Eslováquia	Roménia	Polónia
2004	58 000				300			
2005	53 225	488	270	772	341			
2006	53 667	5 028	1 290	1 254	947			
2007	75 148	21 174	5 000	4 199	2 685	900	332.5	320
2008	79 269		8 380	4 856	3 371	1 940	6 130.4	
2009	79 706		6 480	5 093.7		875	3 243.5	3 000
2010	76 574.8		4 680	4 868.5		1 248.7	822.6	3 000
2011	97 346.3		5 090	7 723.5		760.7	588.2	3 000
2012	116 306.6		3 052.6	9 278.1		189	216.9	
2013	136 962		2 560	8 202		100	834.6	
2014	131 537.4		1 754 ha	8 542.4		411	770.7	
2015	107 749		997 ha	8 017.2		104.4		
2016	129 081.1		75.2 ha	7 056.8		122.1		
2017	124 227.5			7 307.6				
2018	115 246			5 886				

Em Portugal, o número de hectares cultivados com milho MON 810 em 2018 foi de 5 886 ha, apesar de a média entre 2011 e 2017 ter sido de aproximadamente 8 000 ha. A região do Alentejo foi a que apresentou uma maior área de cultivo, seguida pela região Centro e de Lisboa e Vale do Tejo. Os valores relativos às áreas de cultivo em Portugal, no ano de 2018, encontram-se descritos na Figura 17 (DGAV, 2019).

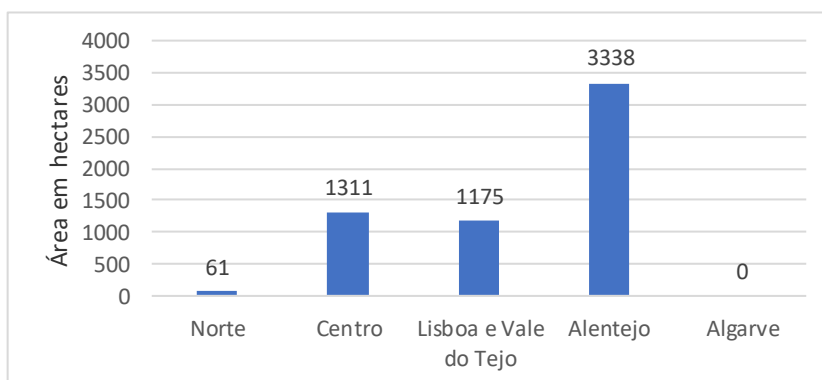


Figura 17: Área de milho MON 810 cultivada em Portugal em 2018. Adaptado de DGAV, 2019.

12. Opinião Pública

A criação de organismos transgénicos tem sido objeto de dúvidas, medos, preocupações, e levado a debates intensos e divisivos a nível mundial sobre os seus potenciais riscos para a saúde humana, ambiente e sociedade (Amin, 2009). O desenvolvimento de uma atitude para com este tema depende de fatores como a perceção de benefícios, riscos, considerações éticas e morais (Magnusson and Hursti, 2002; Lefebvre, Cook and Griffiths, 2019), e também de elementos como o contacto que um individuo tem com informações, e da atenção dada ao tema por parte dos meios de comunicação (Rozin, Fischler and Shields-argelès, 2012).

De acordo com os estudos europeus *Eurobarometer*, em 1999 e 2010, 41% e 53% dos inquiridos, respetivamente, encontravam-se otimistas em relação à biotecnologia e engenharia genética (Woźniak, Tyczewska and Twardowski, 2020). Uma das principais questões em relação à aceitação da engenharia genética prende-se com a sua aplicação, e não com a tecnologia em si. Existe uma aceitação superior quando esta é aplicada com fins biomédicos comparativamente com a sua aplicação a plantas e animais com fins alimentares (Boccia, 2016).

A engenharia genética aplicada a plantas para fins alimentares tem sido, ao longo dos anos, um dos tópicos mais controversos. No estudo *Eurobarometer* de 2010, 84% dos europeus revela já ter

ouvido falar em alimentos GM. Dentro deste grupo, 66% já abordou o tema anteriormente e 38% procura informações ativamente (European Commission, 2010a). O valor percentual de inquiridos que apoiam a existência de alimentos GM, por país, de 1996 a 2010, encontra-se descrito na Tabela 10 (Gaskell *et al.*, 2010).

Tabela 10: Valor percentual de inquiridos que apoiam a existência de alimentos GM, por país, de 1996 a 2010.

Adaptado de Gaskell *et al.*, 2010.

País	Valor percentual de inquiridos que apoiam a existência de alimentos GM				
	1996	1999	2002	2005	2010
Reino Unido	52	37	46	35	44
Irlanda	57	45	57	43	37
Portugal	63	47	56	56	37
Espanha	66	58	61	53	35
Dinamarca	33	33	35	31	32
Holanda	59	53	52	27	30
Noruega	37	30	-	-	30
Finlândia	65	57	56	38	30
Bélgica	57	40	39	28	28
Suécia	35	33	41	24	28
Itália	51	42	35	42	24
Áustria	22	26	33	24	23
Alemanha	47	42	40	22	22
Suíça	34	-	-	-	20
Luxemburgo	44	29	26	16	19
França	43	28	28	23	16
Grécia	49	21	26	14	10
República Checa	-	-	-	57	41
Eslováquia	-	-	-	38	38
Malta	-	-	-	51	32
Hungria	-	-	-	29	32
Polónia	-	-	-	28	30
Estónia	-	-	-	25	28

Eslovénia	-	-	-	23	21
Letónia	-	-	-	19	14
Lituânia	-	-	-	42	11
Chipre	-	-	-	19	10
Islândia	-	-	-	-	39
Roménia	-	-	-	-	16
Bulgária	-	-	-	-	13
Croácia	-	-	-	-	13
Turquia	-	-	-	-	7

O estudo *Eurobarometer* de 2010 analisou parâmetros como a opinião dos europeus em relação a alimentos GM; processo horizontal e vertical de transferência de genes para alimentos; clonagem de animais para fins alimentares; investigação em animais transgénicos, como a xenotransplantação ou a produção de células para o tratamento de patologias; e trabalho realizado, em benefício da sociedade, de entidades relacionadas com a biotecnologia. A Tabela 11 descreve o valor percentual médio europeu e o valor percentual em Portugal, obtidos para cada questão em estudo. Relativamente às áreas de formação e crenças dos participantes, observou-se que 53% estudaram ciências naturais, tecnologia ou engenharia, na escola, universidade ou outro local. 51% acredita em Deus, 26% acredita em algum tipo de entidade ou força vital, e 20% não acredita em Deus, algum tipo de entidade ou força vital (European Commission, 2010a).

Tabela 11: Valor percentual médio europeu e valor percentual obtido em Portugal relativamente às respostas obtidas no estudo *Eurobarometer* de 2010. Adaptado de European Commission, 2010a.

Alimentos GM		
Questão em estudo	Valor percentual médio na Europa	Valor percentual em Portugal
São fundamentalmente antinaturais	70	57
Beneficiam algumas pessoas mas colocam outras em risco	57	45
Não são bons para o próprio consumo e da sua família	54	49
Ajudam pessoas em países em desenvolvimento	43	36
São bons para a economia nacional	31	29
O seu desenvolvimento não deve ser encorajado	61	43
São prejudiciais para o ambiente	53	33
Não são seguros para a própria saúde e da sua família	59	48
Não são seguros para as gerações futuras	58	42
Consumidores ouviram falar sobre o tema	84	54
Consumidores estão apreensivos	61	51
Processo de transferência horizontal e vertical de genes para alimentos		
Questão em estudo	Valor percentual médio na Europa	Valor percentual em Portugal
A transferência horizontal de genes é uma ideia promissora	43	47
A transferência horizontal de genes não é segura	50	46
A transferência horizontal de genes vai ser prejudicial para o ambiente	43	39
A transferência horizontal de genes é fundamentalmente antinatural	72	66
A transferência horizontal de genes não deve ser encorajada	57	48

Consumidores apreensivos sobre a transferência horizontal de genes	58	56
Deve existir rotulagem quando realizada transferência horizontal de genes	83	72
A transferência vertical de genes é útil	63	60
A transferência vertical de genes é arriscada	40	41
A transferência vertical de genes não vai ser prejudicial para o ambiente	50	43
A transferência vertical de genes é fundamentalmente antinatural	52	54
A transferência vertical de genes não deve ser encorajada	38	35
Consumidores apreensivos sobre a transferência vertical de genes	40	41
Deve existir rotulagem quando realizada transferência vertical de genes	72	64
Clonagem de animais para fins alimentares		
Questão em estudo	Valor percentual médio na Europa	Valor percentual em Portugal
Consumidores ouviram falar sobre o tema	75	58
Não é benéfica para a economia nacional	60	44
Não é algo bom para o próprio e para a sua família	57	53
Não é algo que beneficie a população de países em desenvolvimento	50	37
Não é segura para as gerações futuras	64	51
Beneficia algumas pessoas mas coloca outras em risco	54	47
É fundamentalmente antinatural	77	63
Não é segura para a própria saúde e da sua família	63	56
É prejudicial para o ambiente	49	37
Não deve ser encorajada	70	53
Consumidores apreensivos sobre o tema	67	57
Investigação em animais transgênicos		

Questão em estudo	Valor percentual médio na Europa	Valor percentual em Portugal
Concorda, sem achar necessário a criação de leis específicas	11	7
Concorda, desde que seja regulado por leis específicas	46	53
Não concorda, exceto em determinadas circunstâncias	19	17
Não concorda sob quaisquer circunstâncias	17	12
Não tem opinião	7	11
Boa contribuição para a sociedade relativamente ao trabalho desempenhado por entidades relacionadas com a biotecnologia		
Questão em estudo	Valor percentual médio na Europa	Valor percentual em Portugal
Médicos	81	74
Cientistas em universidades a realizar investigação em biotecnologia	77	67
Organizações de consumidores que testam produtos biotecnológicos	73	61
Grupos ambientais que fazem campanhas sobre biotecnologia	66	62
Jornais, revistas e televisão que reportam sobre biotecnologia	64	59
Comités de ética que consideram os aspetos morais e éticos da biotecnologia	61	55
Retalhistas que garantem que os alimentos são seguros	61	55
União Europeia que define leis sobre biotecnologia para todos os Estados Membros	60	57
Indústrias que desenvolvem novos produtos com recurso à biotecnologia	58	47
Governos nacionais que definem leis sobre biotecnologia	55	46
Líderes religiosos que estabelecem o que é certo e errado no desenvolvimento da biotecnologia	31	39

O estudo *Eurobarometer* de 2010 demonstrou que a opinião pública divide-se em relação à biotecnologia; os europeus, de forma geral, não consideram que os alimentos GM sejam benéficos, não são a favor do seu desenvolvimento, e pensam que não são seguros ou até mesmo que são prejudiciais. O público europeu percebe a transferência vertical de genes de uma forma mais positiva comparativamente com a transferência horizontal de genes, e tem uma posição a favor da rotulagem de produtos GM. Existem fortes reservas em relação à clonagem de animais para produção alimentar e não se considera que existam benefícios nesta prática. Existe uma aprovação geral na investigação com animais transgênicos para fins biomédicos, embora o público defenda que devam existir leis específicas (European Commission, 2010a).

Uma atitude positiva relativamente aos transgênicos encontra-se também dependente da confiança da população nas autoridades governamentais responsáveis pela sua regulação. Tal poderá dever-se ao facto de a indústria ser muitas vezes percebida pelos consumidores como uma fonte de informações dúbias, por possuírem um maior interesse na obtenção de lucros do que no bem-estar dos consumidores (Ribeiro, Barone and Behrens, 2016). Em 1999 e 2010, a confiança dos europeus nos governos para a regulação da biotecnologia era de 45% e 55%, respetivamente. Em 2019, a tendência geral de confiança era de 34% (Woźniak, Tyczewska and Twardowski, 2020).

A população norte-americana, comparativamente com a população europeia, tem uma atitude mais favorável em relação a alimentos GM; estes são percebidos como algo mais útil para a sociedade, menos arriscado (Magnusson and Hursti, 2002; Rozin, Fischler and Shields-argelès, 2012), moralmente mais aceitável, e existe um pouco mais de confiança na sua regulação por parte do público (Gaskell *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, Paarlberg afirma que as atitudes para com as culturas GM dependem das influências relativas dos EUA e Europa (Paarlberg, 2008). Embora os países latino-americanos estejam mais positivamente dispostos a adotar culturas GM, países africanos (à exceção da África do Sul), estão mais economicamente dependentes e mais socialmente ligados à Europa, o que afeta as suas atitudes negativas para com as culturas GM.

Estudos verificaram uma relação entre um maior grau de educação e um maior conhecimento sobre o que é a engenharia genética (López *et al.*, 2016; Lakomý *et al.*, 2018).

Os resultados sobre a relação entre maiores conhecimentos sobre o tema e atitudes mais favoráveis para com os transgênicos têm sido ambíguos. Estudos com consumidores da Suécia, Finlândia, Reino Unido, EUA, China e Japão demonstraram que indivíduos com maiores conhecimentos tendiam a possuir uma atitude mais positiva do que aqueles com menores conhecimentos (Ribeiro, Barone and Behrens, 2016). O oposto verificou-se em outros estudos realizados na Argentina, EUA, Itália, Alemanha, Dinamarca e Reino Unido (Ribeiro, Barone and

Behrens, 2016; Popek and Halagarda, 2017). Estes resultados, indicando atitudes ambivalentes, podem indicar que os consumidores são capazes de compreender os fundamentos desta tecnologia e suas aplicações, mas ainda assim rejeitá-la por diversas razões (Ribeiro, Barone and Behrens, 2016).

Lakomý *et al.* observaram que uma maior percentagem de homens ouviu falar em engenharia genética comparativamente com mulheres (Lakomý *et al.*, 2018). Vários autores observaram que homens demonstram uma atitude mais positiva para com alimentos GM, viam mais benefícios e possuíam uma maior disposição para a compra destes produtos, comparativamente com mulheres (Magnusson and Hursti, 2002; Saher, Lindeman and Hursti, 2006; Popek and Halagarda, 2017). Embora existam resultados contraditórios, sugere-se que pessoas mais jovens tenham uma atitude mais positiva para com alimentos GM comparativamente com pessoas mais velhas (Magnusson and Hursti, 2002; Gaskell *et al.*, 2006).

Estudos verificaram que questões morais e éticas influenciavam a aprovação dos consumidores em relação a alimentos GM (Fjæstad *et al.*, 1998). No estudo de Magnusson *et al.*, 58% dos consumidores afirmou que consumir alimentos GM seria moralmente incorreto, e 62% que iria contra os seus princípios (Magnusson and Hursti, 2002).

Magnusson *et al.* e Frewer *et al.* verificaram, tal como em estudos anteriores, que os produtos GM são percecionados pela população como sendo menos “naturais” do que os seus equivalentes convencionais, e também menos saudáveis (Frewer, Howard and Shepherd, 1996; Magnusson and Hursti, 2002). Os inquiridos no estudo de Grunert *et al.* afirmaram que a principal vantagem dos alimentos convencionais face a alimentos GM residia exatamente no facto de estes não terem sido geneticamente modificados. Observou-se também que “alimentação saudável” era percecionada pelo público como o consumo de alimentos “naturais”, e “alimentação não-saudável” como o consumo de alimentos processados (Grunert *et al.*, 2001).

Existem diversas perceções sobre riscos, medos e preocupações associadas à engenharia genética. Os participantes do estudo de Lakomý *et al.* indicaram que as suas maiores preocupações consistiam na existência de potenciais efeitos secundários e na má utilização da tecnologia (Lakomý *et al.*, 2018). No estudo de Popek *et al.*, foram apontados riscos como a existência de consequências imprevistas provenientes da modificação de DNA, produção de toxinas e alergenicidade alimentar (Popek and Halagarda, 2017). O total desaparecimento de produtos convencionais do mercado, propriedades carcinogénicas dos OGMs, danos ambientais e alergenicidade alimentar foram mencionadas no estudo de Tas *et al.* (Tas *et al.*, 2015). Outros estudos revelaram preocupações como o surgimento de riscos de saúde imprevistos, questões de segurança alimentar a longo prazo, riscos de segurança ambiental e riscos para as gerações futuras (Popek and Halagarda, 2017). O estudo de Lefebvre *et al.*, realizado nos EUA, observou que os

riscos mais identificados pelos participantes consistiam em efeitos negativos para a saúde (nomeadamente efeitos a longo prazo, cancro e reações alérgicas) e para o ambiente (Lefebvre, Cook and Griffiths, 2019).

Os meios de comunicação podem desempenhar um papel relevante na perceção de riscos, benefícios e no desenvolvimento de uma atitude face aos transgénicos. Um exemplo de como a opinião dos consumidores pode ser influenciada, neste caso negativamente, consiste no caso do salmão GM *AquAdvantage*, onde os meios de comunicação americanos promoveram o termo “*Frankenfish*”, o que contribuiu para o desenvolvimento de medos e preocupações sobre a segurança destes produtos (Lefebvre, Cook and Griffiths, 2019).

Apesar dos riscos e preocupações mencionados, um estudo europeu sobre segurança alimentar verificou que a presença de ingredientes GM em alimentos representava uma das menores preocupações entre os europeus; as maiores preocupações prendiam-se com a presença de antibióticos, hormonas e esteróides em carnes, e com a presença de resíduos de pesticidas em alimentos (EFSA, 2019).

Existe um apoio especialmente forte para as aplicações médicas da engenharia genética. Os consumidores demonstram ter atitudes mais positivas em relação à sua utilização para fins médicos comparativamente com fins de produção alimentar. De forma geral, as aplicações médicas são percecionadas como mais benéficas, menos arriscadas e eticamente mais corretas comparativamente com as aplicações alimentares (Magnusson and Hursti, 2002; Prati, Pietrantoni and Zani, 2012; Boccia, 2016).

O estudo de Lakomý *et al.* vai de encontro a estas observações; verificou-se que as aplicações que receberam um maior apoio por parte dos europeus são as aplicações biomédicas, como a prevenção e tratamento/cura de doenças, prevenção de incapacidades, produção de fármacos e vacinas, ou transplantação de órgãos, sendo percecionadas como moderadamente úteis e arriscadas. Contrariamente, aquelas que receberam um menor apoio foram a alteração de características não-limitantes da vida de embriões humanos, melhoria da produção pecuária e melhoria da produção de cultivo de plantas (Lakomý *et al.*, 2018).

Existem também evidências de que a aceitação dos consumidores depende do tipo de organismo a ser manipulado; Frewer *et al.* verificaram que a engenharia genética aplicada a microrganismos e plantas era associada a menos riscos do que quando aplicada a animais (Frewer, Howard and Shepherd, 1996). O estudo de Magnusson *et al.* verificou que, embora a maioria das aplicações da engenharia genética a produtos alimentares tenha sido encarada de forma negativa, a alteração genética de animais para fins alimentares (como a modificação genética de porcos de forma a que estes produzam carne com um menor conteúdo de gordura, ou a modificação genética de salmão para que a rapidez do seu crescimento seja dez vezes superior) recebeu as maiores taxas

de reprovação por parte da população (Magnusson and Hursti, 2002). De igual forma, Lefebvre *et al.* verificaram que o público americano possui uma atitude mais negativa para com alimentos GM derivados de animais do que de plantas (Lefebvre, Cook and Griffiths, 2019).

Relativamente a alimentos GM, alterações genéticas que tenham como objetivo conferir benefícios à saúde e ambiente são consideradas mais aceitáveis do que aquelas que têm como objetivo a redução de custos, aumento do prazo de validade de produtos e consumo de alimentos fora do período de colheita (Ribeiro, Barone and Behrens, 2016; Popek and Halagarda, 2017). Principalmente na Europa, aplicações que tenham como propósito o aumento de resistência a pesticidas e o aumento da validade de produtos, são frequentemente contestadas por grupos de consumidores e organizações ambientais como a *Greenpeace* ou *Friends of the Earth* (Saher, Lindeman and Hursti, 2006).

Para além disso, estudos demonstraram que o nível de aceitação é mais elevado quando os produtos proporcionam benefícios tangíveis e diretos para o consumidor e/ou ambiente, do que quando os beneficiários são apenas os produtores e as empresas (Ribeiro, Barone and Behrens, 2016). Benefícios tangíveis como um preço mais acessível, alimentos mais nutritivos ou mais amigos do ambiente, podem influenciar positivamente as intenções de compra de alimentos GM (Magnusson and Hursti, 2002).

Os inquiridos no estudo brasileiro de Ribeiro *et al.* afirmaram que estariam dispostos a comprar produtos GM se estes possuíssem benefícios diretos para o consumidor (Ribeiro, Barone and Behrens, 2016). Nos estudos de Magnusson *et al.* e Frewer *et al.*, um número substancial de consumidores afirmou que compraria alimentos GM se estes fossem mais saudáveis/nutritivos ou mais amigos do ambiente (Frewer, Howard and Shepherd, 1996; Magnusson and Hursti, 2002). No estudo de Spence *et al.*, 75% dos participantes afirmou que compraria um alimento GM se este estivesse disponível por um determinado preço (Spence and Townsend, 2006). De igual forma, um estudo realizado na China observou que alimentos GM com um preço mais reduzido, comparativamente com alimentos convencionais, aumentariam as intenções de compra por parte dos consumidores (Huang *et al.*, 2006).

Contudo, apenas 19.83% dos inquiridos no estudo de Popek *et al.* acredita que a aplicação de engenharia genética a alimentos trará benefícios tangíveis (Popek and Halagarda, 2017), e Grunert *et al.* observaram que os benefícios em causa não conseguem compensar as associações negativas inerentes à modificação genética (Grunert *et al.*, 2001).

Existe uma preferência generalizada a nível global pela rotulagem de alimentos GM (Popek and Halagarda, 2017). Nos EUA, embora não existam leis obrigatórias de rotulagem, demonstrouse que a esmagadora maioria dos consumidores gostaria que esta fosse realizada (Lefebvre, Cook and Griffiths, 2019).

Para além disso, autores verificaram que apresentar o propósito da modificação genética no rótulo do produto aumenta as intenções de compra entre os consumidores (Mucci and Hough, 2004; Roe and Teisl, 2007). De Steur *et al.* verificaram que consumidores chineses aceitariam um tipo de arroz GM enriquecido com folato, e estariam até dispostos a aceitar pagar um preço mais elevado, uma vez informados sobre os benefícios claros do produto (De Steur et al., 2010).

Participantes de um estudo nos EUA afirmaram que, ao lerem a descrição de um produto de soja GM com benefícios claros para o consumidor, se sentiram significativamente mais confortáveis ao ingerir este produto, comparativamente com aqueles que leram informações que não indicavam estes benefícios (Brown and Ping, 2003).

Contudo, embora a existência de informação sobre a modificação genética do produto seja uma importante fonte de informação para as escolhas dos consumidores, pode também gerar preocupações e aumentar a resistência a esta tecnologia; a presença de informação excessiva e termos técnicos presentes no rótulo pode ter um impacto negativo nos consumidores (Ribeiro, Barone and Behrens, 2016). Estudos verificaram que a referência “produzido por GM” gera frequentemente no público a ideia de que o produto é prejudicial para a natureza, que a tecnologia não é confiável, que não é saudável e que é eticamente errado (Prati, Pietrantonio and Zani, 2012; Popek and Halagarda, 2017).

Uma vez que a existência de um vasto número de informações poderá representar uma causa de confusão para os consumidores, Woźniak *et al.* realçam a necessidade da comunicação de uma mensagem comum suportada pela ciência para aumentar a compreensão dos consumidores sobre a engenharia genética (Woźniak, Tyczewska and Twardowski, 2020). As entidades governamentais, afirmam Lefebvre *et al.*, devem apresentar uma uniformidade nas mensagens transmitidas, eliminar as possíveis perceções erradas dos consumidores, desmistificar a noção de OGM, educar adequadamente os consumidores e aumentar a transparência. A apresentação ao público de informação com um formato familiar, de uma forma não-técnica e de fácil compreensão, poderá contribuir para a existência de uma atitude mais positiva, uma minimização de incertezas, e uma opinião mais fundamentada por parte da população relativamente aos OGMs (Lefebvre, Cook and Griffiths, 2019).

13. Levantamento de Questões Bioéticas

O desenvolvimento de transgénicos desde sempre gerou preocupações e medos junto da população, levantando questões sobre potenciais riscos para a saúde humana, ambiente e sociedade, incluindo questões de natureza ética, o que levou à existência de um debate divisivo a nível mundial (Amin, 2009). Este debate, cuja controvérsia tem polarizado a sociedade em defensores e opositores, envolve a participação de cientistas, políticos, jornalistas, grandes empresas, o comércio

e o público. A discussão em torno dos transgênicos envolve temas de elevada relevância em filosofia, tais como o conceito entre “certo” e “errado”, responsabilidade, dever, justiça e liberdade para a realização de escolhas individuais. São levantadas questões como o risco para o ser humano e para o ambiente, quer a curto e longo prazo; a desconfiança para com grandes empresas e preocupações com impactos socioeconômicos; a tomada de decisões informadas e debate público; fatores de carácter religioso e a virtude da natureza (Robinson, 1999).

A tomada de decisões sobre a forma mais correta de proceder deverá ponderar benefícios e potenciais danos, tendo em conta evidências científicas e princípios éticos. Contudo, tal provou ser algo bastante complexo devido a múltiplos aspetos e pontos de vista a ter em conta (Amin, 2009). A conceção pública do que representa um “risco” é ampla e complexa, incorporando fatores como incerteza, equidade, risco para as gerações futuras e probabilidades de dano e mortalidade (Lönnroth, 2003). De igual forma, existem múltiplos aspetos éticos, como ética pessoal, médica, ambiental, de negócios, política, animal e científica, para além da religião (Amin, 2009).

A ética consiste no ramo da filosofia que estuda os ideais morais e princípios do comportamento humano. Enquanto a moralidade tem como base a obediência a costumes e hábitos, e ao conceito geral daquilo que é “certo” e “errado”, a ética baseia-se em ações morais geradas pela razão. Desta forma, o termo “bioética” refere-se à aplicabilidade da ética às ciências biológicas e às suas respetivas descobertas e avanços (Purchase, 2002; Giassetti *et al.*, 2013).

O debate ético em torno dos transgênicos baseia-se em princípios filosóficos como beneficência, não-maleficência, autonomia, justiça, consequencialismo, utilitarismo, virtude ou deontologia.

O princípio da beneficência defende que as ações praticadas deverão criar algum “bem” ou algum benefício para os demais, ponderando riscos de forma a evitar causar danos (Dizon *et al.*, 2016). Contudo, definir aquilo que representa “bem” poderá ser algo complexo em determinadas situações. No caso do desenvolvimento de culturas GM, algumas pessoas poderão defender que o “bem” consiste na produção de alimentos mais nutritivos, enquanto outras poderão defender que este se encontra na prevenção de danos ao ambiente (Purchase, 2002).

A não-maleficência baseia-se na obrigação moral de evitar causar danos. Embora este conceito possa parecer óbvio, em determinadas situações uma ação que beneficie muitos pode requerer a ocorrência de danos a alguns, ou a outras espécies, e nestes casos as opiniões poderão não ser unânimes (Purchase, 2002).

O princípio de autonomia defende que cada ser humano deverá ser tratado como um indivíduo autónomo, tendo o direito de fazer escolhas sobre a sua própria vida e de não ser sujeito a imposições de outros. Este princípio relaciona-se estreitamente com a existência de rotulagem em alimentos GM (Amin, 2009).

De acordo com o princípio de justiça, existe a obrigação moral de efetuar aquilo que é considerado justo. O conceito de “justo” poderá ser difícil de definir porque as percepções filosóficas, religiosas e políticas daquilo que é justo variam amplamente. Ainda assim, possíveis questões relacionam-se com a distribuição de recursos escassos e com a divisão entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (Purchase, 2002).

O consequencialismo é uma abordagem frequentemente utilizada no debate sobre os riscos e benefícios dos transgênicos (Amin, 2009). Segundo o princípio consequencialista, a questão central que se coloca consiste no facto de os transgênicos resultarem em boas ou más consequências, e não em qualquer ideia preexistente de dever ou adequação em manter um determinado comportamento. Segundo esta abordagem, não existem preocupações como a movimentação de genes entre espécies; a preocupação reside na adequação dessa ação com base nas suas consequências possíveis ou prováveis (Amin, 2009). Se se considerar que as consequências resultantes serão positivas, então, pode argumentar-se que existe a obrigação moral de utilizar-se esta tecnologia; contrariamente, se se considerar que as consequências resultantes serão negativas, banir a tecnologia em questão poderá ser visto como uma obrigação moral. A realização de avaliações científicas de risco pode desempenhar um papel fundamental na caracterização dessas consequências (Ricroch, Guillaume-Hofnung and Kuntz, 2018). Contudo, apesar de esta ser uma das teorias morais mais influentes na orientação do comportamento humano, existem críticos que argumentam que o consequencialismo despreza valores morais tradicionais (Amin, 2009).

O utilitarismo, pertencente aos princípios consequencialistas, afirma que uma ação deverá ser praticada na medida em que maximize a sua utilidade através do equilíbrio entre o bem-estar e sofrimento resultantes dessa ação. Caso o bem-estar seja superior ao sofrimento, a ação é moralmente justificada (Dyson and Harris, 1994; Purchase, 2002). As ações praticadas deverão ter como objetivo o maior bem-estar possível para o maior número de pessoas (Rehm and Reed, 1995; Purchase, 2002). Uma das principais críticas que poderá ser apontada a este princípio consiste no facto de se focar exclusivamente no resultado da ação, aceitando ações que podem ser consideradas moralmente incorretas (Purchase, 2002).

O princípio ético da virtude centra-se no indivíduo que pratica a ação e que demonstra determinados valores/virtudes. Uma virtude pode definir-se por uma característica, estado ou disposição de carácter que permite a um indivíduo agir de uma forma em que um bem-estar individual ou coletivo é promovido. Para ser considerada uma virtude, uma característica de carácter tem de possuir um compromisso para com um valor ético como a justiça ou a benevolência. O princípio ético da virtude implica que agir de uma forma moralmente correta baseia-se nas atitudes morais pessoais do indivíduo que pratica a ação e suas convicções, o que

significa que o valor de uma ação pode ser julgado pelo valor das virtudes que levam a essa ação (Gregorowius, Lindemann-Matthies and Huppenbauer, 2012).

O princípio da deontologia relaciona-se com a realização de um dever ou de uma obrigação moral. Defende que a avaliação moral de uma ação depende da qualidade da mesma; determinadas ações são corretas ou incorretas em si mesmas e, por isso, devem ser permitidas ou proibidas. Não é efetuada uma ponderação entre vantagens e desvantagens. Algumas ações são moralmente proibidas, e não podem ser justificadas pelos seus resultados, independentemente dos seus benefícios (Gregorowius, Lindemann-Matthies and Huppenbauer, 2012).

Quando existem incertezas científicas sobre algum tipo de efeito prejudicial para o ambiente ou saúde humana, poderá argumentar-se que existe o dever de adotar uma abordagem a partir do princípio de precaução. Este reconhece a possível necessidade de intervenção para proteger o ambiente ou a saúde humana, uma vez que os danos resultantes de algo como a libertação de OGMs para o ambiente poderiam ser bastante vastos, possivelmente não imediatos, dispendiosos e difíceis/impossíveis de remediar (Amin, 2009).

Algumas das principais questões éticas levantadas relativamente ao desenvolvimento de transgénicos encontram-se descritas de seguida. Estas poderão ser agrupadas em tópicos como risco para o ser humano e para o ambiente; virtude da natureza; desconfiança para com grandes empresas e preocupações com impactos socioeconómicos; fatores de carácter religioso; e tomada de decisões informadas e debate público

13.1. Riscos para o Ser Humano e para o Ambiente

A libertação de OGMs no ambiente pode provocar danos ecológicos a longo prazo, graves e irreversíveis (Peterson and Sandler, 2008).

A tecnologia GM promove a “agricultura industrial” (monocultura de plantas similares em amplos campos dependendo de aplicações repetidas de fertilizantes químicos, pesticidas e herbicidas) que prejudicam o ecossistema, contribuindo para a perda de espécies, depleção e erosão do solo e poluição de aquíferos, rios e lagos (Peterson and Sandler, 2008).

A existência de plantas GM resistentes a herbicidas pode levar a uma maior aplicação de herbicida nas culturas, e estes pesticidas poderão ser menos amigos do ambiente. Os seus resíduos poderão ser persistentes e ter efeitos nocivos (Robinson, 1999).

Uma vez que culturas GM possuem características que diminuem a qualidade do solo mais severamente que plantas convencionais, será necessária uma maior utilização de fertilizantes químicos, sendo estes prejudiciais aos ecossistemas. Ou, então, poderá ser necessário diminuir a produtividade agrícola ao ponto de habitats selvagens adicionais terem de ser ocupados para a agricultura (Peterson and Sandler, 2008).

Poderá ocorrer a criação acidental de “superplantas”. Dada a possibilidade de plantas GM (detentoras de genes que conferem resistência a herbicidas ou pesticidas) e plantas convencionais poderem crescer em zonas próximas, poderá existir uma polinização cruzada entre estas e produzir-se uma descendência que perturbe severamente os ecossistemas, quer por prejudicarem outras plantas, quer por requererem aplicações massivas de pesticidas para o seu controlo (Polkinghorne, 2000; Dizon *et al.*, 2016).

Poderá ocorrer a disseminação agressiva de plantas GM. Plantas GM podem ocupar o espaço de plantas convencionais e reduzir a diversidade de espécies, o que poderá prejudicar o correto funcionamento do ecossistema (Peterson and Sandler, 2008).

Grandes populações de plantas geneticamente idênticas que possuam suscetibilidade a alguma doença ou praga imprevistas podem resultar na destruição de culturas inteiras (Peterson and Sandler, 2008).

Pragas robustas o suficiente para superar plantas GM resistentes a insetos poderão multiplicar-se, e o seu controlo irá requerer quantidades cada vez maiores de pesticidas, ou pesticidas cada vez mais fortes, provocando danos ao ambiente (Peterson and Sandler, 2008).

Os genes de resistência a antibióticos inseridos em plantas podem disseminar-se para populações selvagens de plantas (Robinson, 1999), ou para populações bacterianas, o que levará a uma ineficácia dos antibióticos no tratamento de infeções bacterianas (Amin, 2009).

Culturas geneticamente modificadas de forma a serem resistentes a vírus podem resultar na evolução de novos vírus mais prejudiciais (Amin, 2009).

Culturas geneticamente modificadas de forma a produzir toxinas podem afetar outros organismos que não os pretendidos (Robinson, 1999).

Podem existir riscos de segurança alimentar associados a transgênicos que afetem a saúde humana (Dizon *et al.*, 2016). Os alimentos transgênicos poderão ser tóxicos (Amin, 2009), alergênicos (Robinson, 1999), ou possuir um menor valor nutricional (Amin, 2009).

Podem existir riscos associados à xenotransplantação. Aquando da transplantação de células ou órgãos de animais para humanos, existe o risco, embora pequeno, de transmissão de doenças zoonóticas geralmente fatais, como a encefalopatia espongiforme bovina, retrovírus endógenos porcinos e encefalite pelo vírus Nipah. A introdução destas doenças na população humana pode ter consequências devastadoras (Glenn, 2013).

Os animais transgênicos podem ser mais propensos ao sofrimento. Embora a criação de animais GM possa trazer benefícios para o ser humano, como a criação de animais GM como modelos de patologia humana, esta poderá ser eticamente questionável por serem produzidos animais doentes deliberadamente, os quais vão sofrer/sentir dor (Rehm and Reed, 1995). Diversos

bioéticos, ambientalistas e ativistas dos direitos dos animais argumentam que é errado criar animais que irão sofrer como resultado de alterações genéticas (Glenn, 2013).

13.2. Virtude da Natureza

A engenharia genética é fundamentalmente antinatural e por isso contrária à sustentabilidade ecológica porque substitui os processos naturais do funcionamento da vida por manipulações humanas propensas a erros (Peterson and Sandler, 2008; Bennett *et al.*, 2013).

A engenharia genética interfere na evolução natural dos organismos (Dizon *et al.*, 2016). As transformações evolutivas que ocorrem na natureza acontecem lentamente; a tecnologia GM pretende fazer numa geração aquilo que levaria longos períodos temporais a acontecer no processo de transformação natural. Este longo período de modificações genéticas e co-evolução permitiu que as espécies encontrassem um nicho ecológico no qual coexistir e prosperar com o resto do mundo natural que as rodeia. A co-evolução ao longo de grandes períodos temporais garante que as modificações que ocorreram, e sobreviveram, são sustentáveis e úteis (Sherlock and Morrey, 2000).

A engenharia genética representa um ataque à natureza por desprezar o carácter inerente e o valor intrínseco da natureza tal como ela é (Peterson and Sandler, 2008).

A engenharia genética é desrespeitosa para com a natureza, uma vez que reduz a vida a uma série de produtos génicos que podem ser trocados entre organismos (Robinson, 1999).

Os recursos genéticos da natureza não devem ser propriedade de nenhum indivíduo ou companhia através da atribuição de patentes (Rehm and Reed, 1995; Amin, 2009).

A engenharia genética representa uma manifestação da arrogância humana, a qual já levou a grandes degradações ambientais. O desenvolvimento e utilização desta tecnologia encorajam a subestimação contínua do potencial da ação humana para o dano ecológico, e a sobrestimação contínua da capacidade humana em desenvolver uma “correção” para os danos ambientais já provocados (Peterson and Sandler, 2008).

13.3. De Carácter Religioso

A utilização de engenharia genética é uma tentativa humana de alterar a natureza e de “desempenhar o papel de Deus” (Amin, 2009).

A intromissão do ser humano na natureza é pecaminosa e vai contra os desejos de Deus, ao qual pertence o destino da humanidade (Robinson, 1999).

A engenharia genética representa uma tentativa sacrílega de redefinir a natureza de forma a adequar-se à conveniência humana, o que substitui a orientação divina do funcionamento do universo pelo discernimento humano (Peterson and Sandler, 2008). A Pontifícia Academia para a

Vida questiona o direito que o ser humano possui para intervir na ordem estabelecida por Deus (PAFL, 2001).

A engenharia genética viola a santidade ou o carácter intrínseco da vida por reduzi-la a sequências genómicas e por promover o tratamento de seres-vivos como mercadorias a ser possuídas, compradas, vendidas e redefinidas a gosto (Peterson and Sandler, 2008).

A engenharia genética destrói barreiras entre espécies estabelecidas por Deus (Robinson, 1999; Glenn, 2013). Sobre a xenotransplantação, a Pontifícia Academia para a Vida menciona a quebra de barreiras entre a espécie animal e a espécie humana, e o comprometimento da essência de uma pessoa (PAFL, 2001).

13.4. Desconfiança para com Grandes Empresas e Preocupações com Impactos Socioeconómicos

O principal objetivo das grandes empresas pode passar pela maximização de lucros, controlando a disponibilidade dos produtos e tornando os consumidores dependentes dos mesmos (Polkinghorne, 2000). A criação de um monopólio de mercado pode ameaçar a sobrevivência dos pequenos agricultores (Amin, 2009), e estes podem tornar-se dependentes das grandes empresas (Lönnroth, 2003).

A “*Terminator Technology*” é uma tecnologia transgénica particularmente controversa, dado que garante que as sementes não possam ser salvas no final de um ciclo de cultivo para serem semeadas no ciclo seguinte, forçando os agricultores a comprar novas sementes a cada ano, colocando-os sob o controlo da companhia que as fornece (Robinson, 1999; Amin, 2009).

As decisões sobre quando e como utilizar tecnologia GM podem ser influenciadas por interesses individuais de grandes empresas, e não por considerações daquilo que é melhor para o público e para o bem-estar geral (Peterson and Sandler, 2008).

A engenharia genética poderá favorecer os agricultores de larga escala (Robinson, 1999). O tamanho da organização necessária para desenvolver culturas GM, e o tamanho de terreno necessário para um maior benefício das culturas GM, poderão favorecer as grandes empresas e os grandes cultivos industriais, face às pequenas empresas de agricultores (Peterson and Sandler, 2008).

A tecnologia genética pode afetar as exportações de países em desenvolvimento e ter um impacto negativo nas suas economias rurais (Robinson, 1999; Amin, 2009). Um exemplo é a produção de adoçantes artificiais, e o seu consequente impacto negativo na indústria de açúcar dos trópicos (Robinson, 1999).

A engenharia genética poderá beneficiar os grupos que criam um monopólio através de patentes ou outras formas de direitos de propriedade intelectual (Peterson and Sandler, 2008).

Alguns autores afirmam que os direitos de propriedade intelectual, embora outrora estimulassem a inovação e recompensassem a invenção, atualmente são utilizados para expansão económica e controlo de mercado (Robinson, 1999).

Poderá verificar-se a ocorrência de “biopirataria”. Um exemplo é o caso de direito de propriedade intelectual de quinoa na Bolívia. A quinoa é uma cultura tradicional dos Andes, onde agricultores indígenas têm-na cultivado durante séculos, e têm, particularmente, explorado a esterilidade masculina citoplasmática de forma a produzir cultivares híbridos. Em 1994, uma patente foi emitida a dois agrónomos dos EUA relativa à utilização de esterilidade masculina citoplasmática no cultivar boliviano *Apelawa*. Considera-se que conceder uma patente de uma cultura alimentar básica de um país em desenvolvimento a uma entidade estrangeira pode representar uma prática perigosa e eticamente incorreta (Robinson, 1999).

Cientistas podem não demonstrar um comportamento ético face ao seu trabalho. Existe alguma desconfiança nos cientistas por parte do público devido às fortes relações existentes entre a indústria e universidades, levando o público a crer na existência de interesses económicos diretos por parte dos cientistas na potencial comercialização dos seus resultados de investigação.

A escassez de fundos públicos para a investigação encoraja os cientistas a aceitar fundos de entidades privadas, o que poderá resultar numa maior influencia privada; existem preocupações de que os cientistas em instituições académicas de investigação possam estar a servir os interesses da indústria e não do público em geral. Esta possível falta de integridade poderá ter um impacto negativo na confiança do público, levando a que as avaliações de risco efetuadas pelos cientistas sejam desvalorizadas (Lönnroth, 2003).

13.5. Tomada de Decisões Informadas e Debate Público

O público deverá ter o direito de saber se os alimentos consumidos são GM, permitindo-lhe efetuar as suas próprias decisões informadas (Glenn, 2013).

Para além disso, defende-se que as decisões relativas aos transgénicos devem ser submetidas a processos que permitam uma ampla participação de várias partes interessadas, a um escrutínio público e a uma ampla consideração antes de serem postas em prática (Peterson and Sandler, 2008). Um estudo mostrou que 55% dos europeus é da opinião de que é necessário um diálogo público quando se trata de decisões sobre ciência e tecnologia (Lakomý *et al.*, 2018).

As questões descritas representam pontos de vista e argumentos que contrabalançam os benefícios oferecidos pelos transgénicos e que podem influenciar a perceção individual de cada pessoa sobre aquilo que representa o caminho moralmente correto a seguir.

Os pontos de vista individuais são vastos, onde cada pessoa dará um maior peso a determinados argumentos em detrimento de outros. A título de exemplo, relativamente ao desenvolvimento de um alimento GM mais nutritivo, um indivíduo poderá ser da opinião de que a sua produção deverá ser encorajada, devido aos benefícios alimentares que este oferece; para outro, a opção moralmente correta a seguir poderá ser o desencorajamento da sua produção, porque os benefícios do produto não justificam os danos ambientais que daí possam surgir. Uma terceira pessoa, por sua vez, pode defender que o desenvolvimento de transgénicos é um imperativo moral porque permitirá reduzir a fome em países necessitados, independentemente dos potenciais riscos associados. Ou então, uma outra pessoa poderá ser da opinião de que a ação de criação de um transgénico é moralmente inaceitável em si mesma, independentemente de benefícios como o enriquecimento nutricional de um alimento e o combate à subnutrição.

Uma mudança na perceção do risco para a saúde humana e para o ambiente poderá levar a uma maior aceitação por parte do público. Esta mudança poderá depender de uma comunicação fiável entre cientistas, governantes, indústria e comunicação social, assim como de evidências científicas (Robinson, 1999). Contudo, uma resistência aos transgénicos que tenha como base crenças e argumentos de ordem religiosa, por exemplo, dificilmente será abalada por dados de carácter científico. Ainda assim, a existência de avaliações científicas completas e transparentes de cada caso, e do reconhecimento das suas implicações a curto e longo prazo para o ser humano, ambiente e sociedade, e do reconhecimento de incertezas científicas, poderá contribuir para que o debate se torne menos contencioso e mais construtivo, e que sejam maximizados os benefícios da tecnologia em causa (Amin, 2009).

14. Conclusão

A seleção de determinadas características genéticas de animais e plantas que sejam de alguma forma vantajosas para o ser humano é uma prática ancestral que remonta há aproximadamente 10 000 anos atrás. Esta era inicialmente efetuada através de reprodução seletiva, um processo de cruzamento entre organismos com as características pretendidas de forma a que estas fossem transmitidas às gerações subsequentes.

Com a descoberta de informações como os princípios genéticos de Mendel, a possibilidade de induzir mutagenese, a ação das endonucleases de restrição ou a desmonstração da estrutura do DNA, o ser humano ganhou uma compreensão inédita sobre os processos genéticos, o que lhe conferiu um controlo muito superior na seleção de características genéticas, e que levaria àquilo que hoje conhecemos como técnicas de biotecnologia moderna.

A caracterização das endonucleases de restrição e o desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante tornou possível a quebra de moléculas de DNA isoladas em fragmentos que podiam ser reconstruídos em qualquer sequência desejada, permitindo a combinação de sequências de DNA de diferentes organismos e a sua introdução em organismos pretendidos, o que representou um grande avanço no que diz respeito a técnicas moleculares e permitiu a criação de OGMs. Esta tecnologia permitiu efetuar estudos científicos que investigassem a localização específica de genes, mecanismos de regulação génica, mutações no DNA, sequenciamento de DNA e análise molecular de patologias.

O desenvolvimento de plantas, animais e microrganismos GM apresenta um vasto número de aplicações em áreas como a agricultura, investigação científica, medicina e indústria. A engenharia genética pode ser utilizada em contextos tão diversificados como a produção de proteínas com valor terapêutico, anticorpos, vacinas, xenotransplantação, aprimoramento de características animais, produção de proteínas com relevância industrial ou proteção ambiental.

A nível alimentar, perante o desafio de alimentar uma população que cresce exponencialmente, acredita-se que tal só poderá ser conseguido através de alimentos GM, com culturas que possuam uma maior qualidade e rendimento, que suportem práticas intensivas de cultivo e capazes de resistir às adversidades das alterações climáticas.

No ano de 2017, foi reportada uma área mundial total de culturas GM de 189,8 milhões de hectares, distribuída por 24 países, sendo os EUA, Brasil, Argentina, Índia e Canadá os seus maiores produtores. As culturas GM com uma maior área de plantação consistem na soja, milho, algodão e colza.

Na União Europeia, apenas é cultivado o evento de milho GM MON810. Apesar da estabilidade em termos de área cultivada (120 000 hectares em média), tem-se observado uma redução significativa do número de países que cultivam este tipo de milho, que, desde 2017, se limitam a Portugal e Espanha. Em Portugal, no ano de 2018, a área ocupada com o cultivo de milho GM MON810 foi de 5 886 hectares, apesar de a média entre 2011 e 2017 ter sido de cerca de 8 000 hectares. Uma possível justificação para que Portugal e Espanha sejam os únicos países que cultivam milho GM poderá passar pelo facto de estes serem dois dos países que, ao longo dos anos, demonstraram uma maior aceitação de alimentos GM comparativamente com outros países do espaço europeu.

Em termos regulatórios, a União Europeia possui um complexo processo de aprovação e de avaliação de riscos em relação a alimentos transgénicos. Nos EUA – o maior produtor mundial de culturas GM – os OGMs são regulados de acordo com a legislação da saúde, segurança e ambiente que rege os produtos convencionais, não existindo uma lei específica para os mesmos. A sua abordagem em relação aos OGMs baseia-se na premissa de que a regulação deve concentrar-se na

natureza do produto ao invés do processo pelo qual foi produzido. Apenas produtos alimentares GM que “*difiram significativamente em estrutura, função ou composição de substâncias encontradas comumente em alimentos*” irão requerer uma aprovação prévia antes da entrada no mercado, e produtos que não sejam materialmente diferentes dos seus equivalentes tradicionais dispensam a necessidade de rotulagem ou alteração do seu nome. Desta forma, poderá considerar-se que o enquadramento regulatório nos EUA é relativamente mais favorável ao desenvolvimento de OGMs comparativamente com o europeu.

A população norte-americana tem uma atitude mais favorável em relação a alimentos GM comparativamente com a população europeia; estes são percebidos como algo mais útil para a sociedade, menos arriscado, moralmente mais aceitável, e existe um pouco mais de confiança na sua regulação. A maior resistência dos europeus para com alimentos GM poderá dever-se a fatores como a existência de anteriores crises alimentares na Europa, como a doença de *Creutzfeldt–Jakob*.

A criação de organismos transgênicos sempre foi objeto de dúvidas, medos, preocupações, e levou a debates intensos e divisivos a nível mundial sobre os seus potenciais riscos para a saúde humana, ambiente e sociedade. Estudos observaram que uma das principais questões em relação à aceitação da engenharia genética prende-se com a sua aplicação, e não com a tecnologia em si, existindo uma aceitação superior quando esta é aplicada com fins biomédicos, comparativamente com a sua aplicação em plantas e animais com fins alimentares; as aplicações médicas são percebidas como mais benéficas, menos arriscadas e eticamente mais corretas.

Para além disso, existem também evidências de que a aceitação da população depende do tipo de organismo a ser manipulado. A engenharia genética aplicada a microrganismos e plantas é associada a menos riscos do que quando aplicada a animais e, embora a maioria das aplicações relativas a produtos alimentares tenha sido encarada de forma negativa, a alteração genética de animais para fins alimentares recebe as maiores taxas de reprovação por parte da população.

Existem diversos fatores que moldam a opinião individual sobre os transgênicos, como a percepção de benefícios, riscos e considerações éticas e morais. A percepção de potenciais riscos associados à engenharia genética gera alguma apreensão junto da população, tais como uma má utilização da tecnologia e consequências imprevistas e prejudiciais para a saúde humana e ambiente. Contudo, poderá existir um nível de aceitação mais elevado quando os produtos proporcionam benefícios tangíveis e diretos ao consumidor e/ou ambiente, como preços mais acessíveis, alimentos mais nutritivos ou mais amigos do ambiente.

Existem opiniões que defendem que as decisões relativas aos transgênicos devem ser submetidas a processos que permitam uma ampla participação de várias partes interessadas, a um escrutínio público e a uma ampla consideração antes de serem postas em prática. Para além disso,

de forma a que possam ser efetuadas escolhas informadas, existe uma preferência generalizada a nível global pela rotulagem de alimentos GM.

As considerações éticas e morais possuem um papel essencial na formação de uma atitude para com a engenharia genética, sendo esta frequentemente vista como algo fundamentalmente antinatural. É muitas vezes encarada como algo eticamente reprovável devido a fatores como os malefícios que poderá trazer para a saúde e ambiente a longo prazo, por interferir com a evolução natural dos organismos, ou pelo monopólio criado pelas grandes empresas biotecnológicas que poderá ameaçar pequenos agricultores e afetar a economia de países em desenvolvimento. Para além destes, existem também fatores de carácter religioso – os quais poderão ser menos passíveis de sofrer alteração por parte de dados científicos – que defendem que esta se trata de uma intromissão humana no papel de Deus.

No entanto, a engenharia genética deverá ser encarada como mais um passo na evolução da tecnologia; um passo inevitável a dar na atual época científica e tecnológica. Todas as tecnologias que surgem trazem preocupações e possíveis consequências negativas, o que torna necessária a realização de avaliações completas, cuidadas e ponderadas, abrangendo o máximo de possibilidades e perspectivas possíveis, para que se tire partido da melhor forma da tecnologia em causa, e para que esta traga o maior número de benefícios possível, causando o menor número possível de malefícios. Por malefícios entende-se danos para a saúde humana e animal (como o menor sofrimento animal possível na manipulação genética destes organismos), ambiente, e prejuízos socioeconómicos (como aqueles que podem resultar para pequenos agricultores, ou para países em desenvolvimento que vejam os seus conhecimentos patenteados por entidades estrangeiras). A engenharia genética será correta desde que se garanta que a manipulação é estável para o próprio organismo e para o ambiente que o rodeia, sendo necessários estudos completos que garantam esta segurança.

A domesticação de animais e plantas, e a inerente seleção artificial de características mais vantajosas para o ser humano, representou um passo de viragem fundamental na sua história. Atualmente, o desenvolvimento de organismos com estas características – neste caso através de tecnologia transgénica – poderá também representar um fator decisivo no bem-estar da humanidade, contribuindo para enfrentar alguns dos desafios atuais e outros que surjam futuramente. Poderá constituir uma ferramenta indispensável para, por exemplo, superar o desafio de alimentar uma população mundial crescente, ao qual se soma a agravante da existência de alterações climáticas, que poderão dificultar as práticas agrícolas. Nesta situação, a engenharia genética poderá, de uma forma geral, passar a ser encarada mais positivamente e como sendo algo necessário para o bem-estar geral. Questões como a intromissão humana na natureza e a permuta de genes entre espécies poderão passar para segundo plano, face a necessidades desta natureza. A

existência deste fator de necessidade-aceitação é comprovada atualmente pela maior aceitação dos transgênicos quando aplicados em contextos biomédicos, como no desenvolvimento de modelos patológicos animais para o estudo de doenças como o cancro, que contribuem para uma maior qualidade de vida da população e que podem fazer a diferença entre um estado de morbidade e saúde.

O vasto número de informações a que o público tem acesso nos dias de hoje poderá resultar em confusão e receios. As percepções negativas da população em relação aos transgênicos poderão muitas vezes advir de fontes de informação que não são credíveis, baseando-se em dados que carecem de fundamento científico. Desta forma, será correto afirmar que muitos dos receios existentes sobre potenciais malefícios dos transgênicos poderão ser infundados. Foram realizadas diversas avaliações científicas que não verificaram quaisquer riscos para a saúde humana ou ambiente. Como exemplo, a empresa norte-americana Monsanto, criadora da linha transgênica de milho MON 810, levou a cabo avaliações desta natureza e não verificou quaisquer ameaças neste sentido. Poderá argumentar-se, porém, que esta companhia possui interesses económicos diretos na apresentação de dados indicadores de uma ausência de riscos e da sua livre comercialização. Contudo, entidades europeias como a EFSA efetuaram avaliações com conclusões idênticas. Para além disso, ainda não foram verificadas crises alimentares decorrentes de anos de cultivo de transgênicos pelo mundo que colocassem em perigo a saúde da população ou ambiente. É, no entanto, necessária uma atenção e monitorização constantes para garantir esta segurança. O surgimento de estudos que sugiram a existência de algum tipo de perigo para o ambiente ou saúde deverá levar à averiguação dessa possibilidade da forma mais completa possível. Esta monitorização constante garante a segurança dos transgênicos e, conseqüentemente, contribui para tranquilizar a população sobre o tema. Estas informações deverão ser transmitidas ao público por entidades governamentais de uma forma uniformizada, simples e de fácil compreensão, com ausência de linguagem técnica. Tal poderia contribuir para eliminar possíveis percepções erradas e incertezas, desmistificar a noção de OGM, e para a existência de uma atitude mais positiva em relação aos OGMs.

15. Bibliografia

- Ben Ali, M. *et al.* (2006) 'Thermostability enhancement and change in starch hydrolysis profile of the maltohexaose-forming amylase of *Bacillus stearothermophilus* US100 strain', *Biochemical Journal*, 394(1), pp. 51–56. doi: 10.1042/BJ20050726.
- Altenburg, E. (1933) 'The production of mutations by ultra-violet light', *Science*, 78(2034), p. 587. doi: 10.1016/S0140-6736(52)91250-6.
- Amin, L. (2009) 'Modern biotechnology: Ethical issues, ethical principles and guidelines', *Jurnal Pengajian Umum Asia Tenggara*, 10, pp. 1–16.
- Andersson, H. C. *et al.* (2009) 'Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms', *EFSA Journal*, 1149, 7(6), pp. 1–84. doi: 10.2903/j.efsa.2009.1149.
- Anklam, E. *et al.* (2002) 'Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products', *European Food Research and Technology*, 214(1), pp. 3–26. doi: 10.1007/s002170100415.
- Asfaw, A. and Assefa, A. (2019) 'Animal transgenesis technology: A review', *Cogent Food & Agriculture*. Cogent, 5(1), pp. 1–9. doi: 10.1080/23311932.2019.1686802.
- Auerbach, C. and Robson, J. M. (1946) 'Chemical production of mutations', *Nature*, 157(3984), p. 302. doi: 10.1038/157302a0.
- Azegami, T., Yuki, Y. and Kiyono, H. (2020) 'Plant-based mucosal vaccine delivery systems', in *Mucosal Vaccines*. Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-811924-2.00020-1.
- Balter, M. (2013) 'Farming Was So Nice, It Was Invented at Least Twice', *Science*. Available at: <https://www.sciencemag.org/news/2013/07/farming-was-so-nice-it-was-invented-least-twice>.
- Baltes, N. J., Gil, J. and Voytas, D. F. (2017) *Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Challenges*. 1st edn, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.011.
- Barampuram, S. and Zhang, Z. J. (2011) 'Recent Advances in Plant Transformation', in *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols*. 1st edn. New Delhi: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-61737-957-4.
- Becker, D. *et al.* (2001) 'Engineering of a glycosidase Family 7 cellobiohydrolase to more alkaline pH optimum: The pH behaviour of *Trichoderma reesei* Cel7A and its E223S/A224H/L225V/T226A/D262G mutant', *Biochemical Journal*, 356(1), pp. 19–30. doi: 10.1042/0264-6021:3560019.
- Bennett, A. B. *et al.* (2013) 'Agricultural biotechnology: Economics, environment, ethics, and the future', *Annual Review of Environment and Resources*, 38, pp. 249–279. doi: 10.1146/annurev-environ-050912-124612.
- Bertho, L. *et al.* (2020) 'Results from ten years of post-market environmental monitoring of genetically modified MON 810 maize in the European Union', *PLoS ONE*, 15(4), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0217272.
- Bevan, M. J. (2010) 'The Earliest Knockouts', *The Journal of Immunology*, 184(9), pp. 4585–4586. doi: 10.4049/jimmunol.1090023.
- Bevan, M. W., Flavell, R. B. and Chilton, M. D. (1983) 'A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation', *Nature*, 304(5922), pp. 184–187. doi: 10.1038/304184a0.
- Boccia, F. (2016) 'Consumer perception: an analysis on second generation genetically modified foods', *Nutrition and Food Science*, 46(5), pp. 637–646. doi: 10.1108/NFS-03-2016-0035.
- Bøhn, T., Primicerio, T. and Traavik, T. (2012) 'The German ban on GM maize MON810: Scientifically justified or unjustified?', *Environmental Sciences Europe*, 24(7), pp. 1–7. doi: 10.1186/2190-4715-24-22.

Bonfini, L. *et al.* (2001) *Review of GMO Detection and Quantification Techniques*, European Commission, Joint Research Centre. Ispra, Italy.

Bonfini, L. *et al.* (2012) 'GMO Methods: The european union database of reference methods for GMO analysis', *Journal of AOAC International*, 95(6), pp. 1713–1719. doi: 10.5740/jaoacint.12-050.

Breveglieri, G. *et al.* (2015) 'Generation and Characterization of a Transgenic Mouse Carrying a Functional Human β -Globin Gene with the IVSI-6 Thalassemia Mutation', *BioMed Research International*, p. 20. doi: 10.1155/2015/687635.

Brown, J. L. and Ping, Y. (2003) 'Consumer perception of risk associated with eating genetically engineered soybeans is less in the presence of a perceived consumer benefit', *Journal of the American Dietetic Association*, 103(2), pp. 208–214. doi: 10.1053/jada.2003.50029.

Burnett, M. and Burnett, A. (2020) 'Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities', *Plants, People, Planet*, 2(2), pp. 121–132. doi: 10.1002/ppp3.10073.

Butler, T. M. and Fletcher, G. L. (2009) 'Promoter analysis of a growth hormone transgene in Atlantic salmon', *Theriogenology*, 72(1), pp. 62–71. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.02.007.

Capurro, M. *et al.* (2000) 'Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in Plasmodium gallinaceum-infected Aedes aegypti', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(4), pp. 427–433. doi: 10.4269/ajtmh.2000.62.427.

Cavaco, A. and Nierstrasz, V. A. (2010) 'Design and engineering of novel enzymes for textile applications', in *Advances in Textile Biotechnology*. 1st edn. doi: 10.1533/9780857090232.

CBD (1993) *Convention on Biological Diversity*. Rio de Janeiro, Brazil, 1992 United Nations Conference on Environment and Development (UNCED)/Rio Earth Summit.

CBD (2020) *History of the Convention*, *Convention on Biological Diversity*. Available at: <https://www.cbd.int/history/> (Accessed: 12 December 2020).

CFR (2003) *Introduction of Organisms and Products Altered or Produced Through Genetic Engineering Which are Plant Pests or Which There is Reason to Believe are Plant Pests*. Code of Federal Regulations, United States of America, 7 CFR 340. Available at: <https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2003-title7-vol5/CFR-2003-title7-vol5-part340>.

CFR (2011) *Reporting Requirements and Review Processes for Microorganisms*. Code of Federal Regulations, United States of America, 40 CFR 725. Available at: <https://www.govinfo.gov/app/details/CFR-2011-title40-vol31/CFR-2011-title40-vol31-part725/summary>.

CFR (2019a) *Applications for biologics licenses; procedures for filing*. Code of Federal Regulations, United States of America, 21 CFR 601.2. Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfrcfr/cfrsearch.cfm?fr=601.2>.

CFR (2019b) *Applications for FDA Approval to Market a New Drug*. Code of Federal Regulations, United States of America, 21 CFR 314.50. Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfrcfr/cfrsearch.cfm?fr=314.50>.

Chang, A. C. and Cohen, S. N. (1974) 'Genome Construction Between Bacterial Species In Vitro: Replication and Expression of Staphylococcus Plasmid Genes in Escherichia coli', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), pp. 1030–1034.

Chen, Q. *et al.* (2020) 'The genetic architecture of the maize progenitor, teosinte, and how it was altered during maize domestication', *PLoS Genetics*, 16(5), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pgen.1008791.

Chrenek, P. *et al.* (2007) 'Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits', *Transgenic Research*, 16(3), pp. 353–361. doi: 10.1007/s11248-007-9070-6.

Cohen, S. N. *et al.* (1973) 'Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), pp. 3240–3244.

doi: 10.1073/pnas.70.11.3240.

Conceição, F. R., Moreira, Â. N. and Binsfeld, P. C. (2006) 'Detection and quantification of genetically modified organisms in food and food ingredients', *Ciencia Rural*, 36(1), pp. 315–324. doi: 10.1590/s0103-84782006000100053.

Cooper, G. (2019) *The Cell: A Molecular Approach*. 8th edn. Edited by G. M. Cooper. New York: Oxford University Press.

Costantini, F. and Lacy, E. (1981) 'Introduction of a rabbit b-globin gene into the mouse germ line', *Nature*, 294(5836), pp. 92–94.

Cott, K. E. Van *et al.* (2004) 'Haemophilic factors produced by transgenic livestock: abundance that can enable alternative therapies worldwide', *Haemophilia*, 10(4), pp. 70–76. doi: 10.1111/j.1365-2516.2004.00983.x.

Cronin, M. J. (1997) 'Pioneering recombinant growth hormone manufacturing: Pounds produced per mile of height', *Journal of Pediatrics*, 131(1 II SUPPL.), pp. 5–7. doi: 10.1016/s0022-3476(97)70002-7.

Crooy, P. (1991) 'Protection against hepatitis B using a rec-DNA vaccine', *Biotechnology Forum Europe*, 8, p. 247.

Daniell, H. *et al.* (2001) 'Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts', *Journal of Molecular Biology*, 311(5), pp. 1001–1009. doi: 10.1006/jmbi.2001.4921.

Dehnavi, E. *et al.* (2019) 'Improvement of *Selenomonas ruminantium* β -xylosidase thermal stability by replacing buried free cysteines via site directed mutagenesis', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 136, pp. 352–358. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.100.

DeMarini, D. M. (2020) 'The mutagenesis moonshot: The propitious beginnings of the environmental mutagenesis and genomics society', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(1), pp. 8–24. doi: 10.1002/em.22313.

Demerec, M. (1947) 'Mutations in *Drosophila* induced by a carcinogen', *Nature*, 159(604). doi: <https://doi.org/10.1038/159604a0>.

DGAV (2019) *Coexistência Entre Culturas Geneticamente Modificadas e Outros Modos de Produção Agrícola, Relatório de Acompanhamento 2018*. Portugal, Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Diamond, J. (2002) 'Evolution, consequences and future of plant and animal domestication', *Nature*, 418(6898), pp. 700–707. doi: 10.1038/nature01019.

Diamond, J. (2017) *Guns, Germs, and Steel: The Fates of Human Societies*. 20th anniv. New York: W. W. Norton & Company.

Dijck (1999) 'Chymosin and Phytase. Made by genetic engineering', *Journal of Biotechnology*, 67(10), pp. 77–80.

Dizon, F. *et al.* (2016) 'Genetically Modified (GM) Foods and Ethical Eating', *Journal of Food Science*, 81(2). doi: 10.1111/1750-3841.13191.

DRZE (2017) *GM corn MON810: national ban on cultivation since 2007 and the creation of an opt-out clause, German Reference Centre for Ethics in the Life Sciences (DRZE)*. Available at: <http://www.drze.de/in-focus/genetically-modified-foods/modules/gen-corn-mon-810> (Accessed: 1 December 2020).

Durland, J. and Moghadam, H. (2020) *Genetics: Mutagenesis, StatPearls*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/> (Accessed: 17 December 2020).

Dyson, A. and Harris, J. (1994) *Ethics and Biotechnology*. 1st edn. London: Routledge, Taylor & Francis Group.

Echelard, Y. and Meade, H. M. (2003) 'Protein production in transgenic animals', in *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Elsevier Science. doi: 10.1016/S0167-7306(03)38036-6.

EFSA (2008a) *Application EFSA-GMO-RX-MON810 (20.1a cultivation): Comments and opinions submitted by Member States during the three-month consultation period*. European Food Safety Authority.

EFSA (2008b) *Application EFSA-GMO-RX-MON810 8.1(a): Comments and opinions submitted by Member States during three-month consultation period*. European Food Safety Authority.

EFSA (2009) *Overall opinion of the European Food Safety Authority in accordance with Article 6 of Regulation (EC) No 1829/2003 on application EFSA-GMO-RX-MON810 for renewal of the authorisation of existing products produced from insect resistant genetically modified*. European Food Safety Authority, Scientific Report (2009) 311, 1-8.

EFSA (2012) 'Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals and on animal health and welfare aspects', *EFSA Journal*, 10(1), pp. 1–43. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2501.

EFSA (2013) 'Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals', *EFSA Journal*, 11(5), pp. 1–190. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3200.

EFSA (2019) *Special Eurobarometer Wave EB91.3: Food Safety in the EU*. European Food Safety Authority. doi: 10.2805/661752.

EFSA (2020) *Genetically modified animals, Science, GMO*. Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/genetically-modified-animals> (Accessed: 9 December 2020).

Ekser, B. *et al.* (2009) 'Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model', *Transplant Immunology*. Elsevier B.V., 21(2), pp. 87–92. doi: 10.1016/j.trim.2008.10.005.

El-Gewely, M. R. *et al.* (2005) 'Mutagenesis: Site-specific', *Encyclopedia of Life Sciences*. doi: 10.1038/npg.els.0003842.

Estell, D. A., Graycar, T. P. and Wells, J. A. (1985) 'Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation', *Journal of Biological Chemistry*, 260(11), pp. 6518–6521.

European Commission (2001) *Diretiva 2001/18/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Março de 2001*. European Union. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32001L0018>.

European Commission (2003a) *Regulamento (CE) N.o 1829/2003 Do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003*. European Union. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32003R1829>.

European Commission (2003b) *Regulamento (CE) N.o 1946/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Julho de 2003 relativo ao movimento transfronteiriço de organismos geneticamente modificados*. European Union. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=CELEX%3A32003R1946>.

European Commission (2010a) *Biotechnology: Special Eurobarometer 73.1*. TNS Opinion & Social; Brussels, Belgium. Available at: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/eurobarometers.

European Commission (2010b) *Commission Recommendation of 13 July 2010 on guidelines for the development of national co-existence measures to avoid the unintended presence of GMOs in conventional and organic crops*. European Union. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=OJ:C:2010:200:FULL&from=IT>.

European Commission (2016a) *Commission Implementing Decision (EU) 2016/321 of 3 March 2016 adjusting the geographical scope of the authorisation for cultivation of genetically modified maize (Zea mays L.) MON 810 (MON-ØØ81Ø-6)*, *Official Journal of the European Union*. EU.

European Commission (2016b) *GMOs*. Available at: <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/gmos> (Accessed: 21 February 2020).

European Commission (2017) *European Commission, Genetically Modified Organisms: MON-ØØ81Ø-6*. Available at: https://webgate.ec.europa.eu/dyna/gm_register/gm_register_auth.cfm?pr_id=11 (Accessed: 1 December 2020).

Falkner, E. and Maurer-Fogy, I. (1996) 'Recombinant interferon gamma for the therapy of immunological and oncological diseases', *Journal of Biotechnology*, 46(2), pp. 155–159. doi: 10.1016/0168-1656(96)80466-4.

Farias, P. and Chaves, A. (2008) 'Advances in Agrobacterium-mediated plant transformation with emphasis on soybean', *Scientia Agricola*, 65(1), pp. 95–106. doi: 10.1590/S0103-90162008000100014.

Farias, P., Chaves, A. and Lencina, C. L. (2011) 'Transgenic Plants for Enhanced Phytoremediation – Physiological Studies', in Alvarez, M. (ed.) *Genetic Transformation*. InTech. Available at: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.

Favor, A. H. *et al.* (2020) 'Optimizing bacteriophage engineering through an accelerated evolution platform', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-020-70841-1.

FDA (1992) *Statement of Policy: Foods Derived from New Plant Varieties, Biotechnology Guidance Documents*. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services.

FDA (1997) *Guidance on Consultation Procedures Foods Derived From New Plant Varieties*. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Available at: <https://www.fda.gov/food/ingredients-additives-gras-packaging-guidance-documents-regulatory-information/consultation-procedures-under-fdas-1992-statement-policy-foods-derived-new-plant-varieties>.

FDA (2019) *AquAdvantage Salmon*. Available at: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/animals-intentional-genomic-alterations/aquadvantage-salmon> (Accessed: 21 February 2020).

FDA (2020) *Questions and Answers on FDA's Approval of AquAdvantage Salmon, Animals with Intentional Genomic Alterations*. Available at: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/animals-intentional-genomic-alterations/questions-and-answers-fdas-approval-aquadvantage-salmon> (Accessed: 8 December 2020).

Feany, M. B. and Bender, W. W. (2000) 'A Drosophila model of Parkinson's disease', *Nature*, 404(6776), pp. 394–398. doi: 10.1038/35006074.

Fjæstad, B. *et al.* (1998) 'Biotechnology in the Public Sphere: A European Sourcebook', in Durant, J., Gaskell, M. W., and G., B. & (eds) *Biotechnology in the Public Sphere: A European Sourcebook*. 1st edn. London: Science Museum.

Fletcher, G. L. *et al.* (2004) 'Gene transfer: potential to enhance the genome of Atlantic salmon for aquaculture', *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44, pp. 1095–1100.

Flibotte, S. *et al.* (2010) 'Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*', *Genetics*, 185(2), pp. 431–441. doi: 10.1534/genetics.110.116616.

Forabosco, F. *et al.* (2013) 'Genetically modified farm animals and fish in agriculture: A review', *Livestock Science*, 153(1–3), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.livsci.2013.01.002.

Fosket, D. (1994) *Plant Growth and Development: A Molecular Approach*. 1st edn. San Diego, California: Academic Press.

Fraiture, M.-A. *et al.* (2015) 'Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions', *BioMed Research International*, 2015, p. 22. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/392872>.

Francis, M. S. *et al.* (2017) 'Site-directed mutagenesis and its application in studying the interactions of T3S components', *Methods in Molecular Biology*, 1531, pp. 11–31. doi: 10.1007/978-1-4939-6649-3_2.

Frewer, L. J., Howard, C. and Shepherd, R. (1996) 'The influence of realistic product exposure on attitudes towards genetic engineering of food', *Food Quality and Preference*, 7(1), pp. 61–67. doi: 10.1016/0950-3293(95)00017-8.

Gaskell, G. *et al.* (2006) 'Europeans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends - Eurobarometer 64.3', *European Commission*, pp. 1–85.

Gaskell, G. *et al.* (2010) *Europeans and Biotechnology in 2010 - Winds of change?*, *European Commission*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. doi: 10.2777/23393.

Giassetti, M. I. *et al.* (2013) 'Genetic Engineering and Cloning: Focus on Animal Biotechnology', in *Genetic Engineering*. InTech. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/56071>.

Glenn, L. (2013) *Ethical issues in genetic engineering and transgenics*, *Actionbioscience.org*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/311993919_Glenn_Linda_MacDonald_Ethical_issues_in_genetic_engineering_and_transgenics (Accessed: 2 December 2020).

Goeddel, D. *et al.* (1979) 'Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), pp. 106–110. doi: 10.1073/pnas.76.1.106.

Gordon, J. W. and Ruddle, F. H. (1981) 'Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei', *Science*, 214(4526), pp. 1244–1246. doi: 10.1126/science.6272397.

Gosal, S. S. and Wani, S. H. (2018) *Biotechnologies of Crop Improvement: Transgenic Approaches, Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 2: Transgenic Approaches*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-90650-8.

Gregorowius, D., Lindemann-Matthies, P. and Huppenbauer, M. (2012) 'Ethical discourse on the use of genetically modified crops: A review of academic publications in the fields of ecology and environmental ethics', *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 25(3), pp. 265–293. doi: 10.1007/s10806-011-9330-6.

Grunert, K. G. *et al.* (2001) 'Consumer perceptions of food products involving genetic modification - Results from a qualitative study in four Nordic countries', *Food Quality and Preference*, 12(8), pp. 527–542. doi: 10.1016/S0950-3293(01)00049-0.

Hammer, R. E. *et al.* (1985) 'Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection', *Nature*, 315(6021), pp. 680–683. doi: 10.1038/315680a0.

Han, H. *et al.* (2020) 'Site-directed mutagenesis to improve the thermostability of tyrosine phenolase', *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 310, pp. 6–12. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.01.005.

Han, L. (2004) 'Genetically Modified Microorganisms: Development and Applications', in Parekh, S. R. (ed.) *The GMO Handbook: Genetically Modified Animals, Microbes, and Plants in Biotechnology*. 1st edn. New Jersey: Humana Press, p. 40.

Hanahan, D., Wagner, E. F. and Palmiter, R. D. (2007) 'The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer', *Genes and Development*, 21(18), pp. 2258–2270. doi: 10.1101/gad.1583307.

Heller, K. J. (2006) *Genetically Engineered Food: Methods and Detection*. 2nd edn. Weinheim: WILEY-VCH.

Herrera, L., Simpson, J. and Trujillo, M. (2005) 'Transgenic Plants: An Historical Perspective', in *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. doi: 10.1002/9783527620999.ch16a.

Höhne, M., Rosa, C. and Meyer, R. (2000) *Proceedings The European Commission's Joint Research Centre (JRC) and International Life Science Institute (ILSI) Joint Workshop on Method Development in Relation to Regulatory Requirements for the Detection of GMOs in the Food Chain*, *Journal of AOAC International*, Brussels, Belgium.

Holban, A. and Grumezescu, A. (2018) *Handbook of Food Bioengineering: Genetically Engineered Foods*. Volume 6. Academic Press, Elsevier.

Hollaender, A. and Emmons, C. W. (1941) 'Wavelength Dependence of Mutation Production in the Ultraviolet With Special Emphasis on Fungi', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 9(0), pp. 179–186. doi: 10.1101/sqb.1941.009.01.021.

Houdebine, L. M. (2017) *Transgenic animal production, Biotechnology for Sustainable Agriculture: Emerging Approaches and Strategies*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-812160-3.00005-2.

Hoy, M. A. (2000) 'Transgenic arthropods for pest management programs: Risks and realities', *Experimental and Applied Acarology*, 24(5–6), pp. 463–495. doi: 10.1023/A:1006401225083.

Huang, J. *et al.* (2006) 'Awareness, acceptance of and willingness to buy genetically modified foods in Urban China', *Appetite*, 46(2), pp. 144–151. doi: 10.1016/j.appet.2005.11.005.

Hwang, H., Yu, M. and Lai, E. (2017) 'Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications', *The Arabidopsis Book*, 15. doi: 10.1199/tab.0186.

ISAAA (2017) 'Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years', *Brief 53*.

ISAAA (2019a) *ISAAA's GM Approval Database*. Available at: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/> (Accessed: 21 February 2020).

ISAAA (2019b) *ISAAA GM Approval Database, GM Crop Events List: MON810 Authorizations*. Available at: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=85> (Accessed: 1 December 2020).

Ito, J. *et al.* (2002) 'Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite', *Nature*, 417(6887), pp. 452–455. doi: 10.1038/417452a.

Jaenisch, R. and Mintz, B. (1974) 'Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), pp. 1250–1254. doi: 10.1073/pnas.71.4.1250.

Johnson, I. S. (1983) 'Human Insulin from Recombinant DNA Technology', *Science*, 219(4585), pp. 632–637.

Jones, B. and Quax, W. (1998) 'Brighter appearance to coloured textiles thanks to a new cellulase from an extremophilic bacterium', *Journal of Biotechnology*, 66, pp. 231–233.

JRC (2016) *Quantitative PCR method for detection of maize event MON810*. European Commission, Joint Research Center, GMO Methods: EU Database of Reference Methods. Available at: https://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=qt-eve-zm-020&q=id%3AQT-eve-zm*.

Kamle, M. *et al.* (2017) 'Current perspectives on genetically modified crops and detection methods', *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 7(3), pp. 1–15. doi: 10.1007/s13205-017-0809-3.

Kenward, K. D. *et al.* (1999) 'Type II fish antifreeze protein accumulation in transgenic tobacco does not confer frost resistance', *Transgenic Research*, 8(2), pp. 105–117. doi: 10.1023/A:1008886629825.

Khachatourians, G. *et al.* (2002) *Transgenic Plants and Crops*. 1st edn. Boca Raton: CRC Press.

Kole, C. *et al.* (2010) *Transgenic Crop Plants: Principles and Development*. Volume 1. Berlin: Springer Berlin Heidelberg.

Koornneef, M. and Meinke, D. (2010) 'The development of Arabidopsis as a model plant', *Plant Journal*, 61(6), pp. 909–921. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x.

Lakomý, M. *et al.* (2018) *Public attitudes to life sciences research in six European countries*. Stockholm.

Lefeber, R. (2012) 'The Legal Significance of the Nagoya-Kuala Lumpur Supplementary Protocol: The Result of a Paradigm Evolution', *SSRN Electronic Journal*. doi: 10.2139/ssrn.2151282.

Lefebvre, S., Cook, L. A. and Griffiths, M. A. (2019) 'Consumer perceptions of genetically modified

foods: a mixed-method approach', *Journal of Consumer Marketing*, 36(1), pp. 113–123. doi: 10.1108/JCM-12-2016-2043.

Ling, M. M. and Robinson, B. H. (1997) 'Approaches to DNA mutagenesis: An overview', *Analytical Biochemistry*, 254(2), pp. 157–178. doi: 10.1006/abio.1997.2428.

Lönnroth, M. (2003) 'The use of GM crops in comparison with previously ethically loaded issues in the relationship between man and nature', *Acta Agriculturae Scandinavica*, 53, pp. 68–72. doi: 10.1080/16519140310015067.

López, O. A. *et al.* (2016) 'Perceptions and attitudes of the Mexican urban population towards genetically modified organisms', *British Food Journal*, 118(12), pp. 2873–2892. doi: 10.1108/BFJ-06-2016-0247.

Loveless, A. (1959) 'The influence of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid synthesis and function studied in *Escherichia coli* / phage systems - III. Mutation of T 2 bacteriophage as a consequence of alkylation in vitro: the uniqueness of ethylation', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 150(941), pp. 497–508. doi: 10.1098/rspb.1959.0038.

Low, L.-Y. *et al.* (2018) 'Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method', in *New Visions in Plant Science*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.79369.

Ma, J. K. C., Drake, P. M. W. and Christou, P. (2003) 'The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants', *Nature Reviews Genetics*, 4(10), pp. 794–805. doi: 10.1038/nrg1177.

MADRP (2005) *Decreto-Lei n.º 160/2005 de 21 de Setembro*. Portugal, Diário da República, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Available at: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/148432/details/maximized>.

Mafra, I. (2011) 'Current methods for detecting genetically modified organisms in foods', *Current topics on food authentication*, pp. 211–236.

Magnusson, M. K. and Hursti, U. K. (2002) 'Consumer attitudes towards genetically modified foods', *Appetite*, 39(1), pp. 9–24. doi: 10.1006/appe.2002.0486.

Maksimenko, O. G. *et al.* (2013) 'Use of Transgenic Animals in Biotechnology: Prospects and Problems', *Acta Naturae*, 5(1), pp. 33–46. doi: 10.32607/20758251-2013-5-1-33-46.

Mandrigh, L. (2015) 'The "Evolution" of Mutagenesis', *Cloning & Transgenesis*, 04(03). doi: 10.4172/2168-9849.1000e121.

Marmioli, N. *et al.* (2008) 'Methods for detection of GMOs in food and feed', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(3), pp. 369–384. doi: 10.1007/s00216-008-2303-6.

Masih, S. *et al.* (2013) *Transgenic Animals and their Applications*, *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-416002-6.00022-5.

Mazzara, M. *et al.* (2009) *Report on the Verification of the Performance of a MON 810 Event-specific Method on Maize Line MON 810 Using Real-time PCR*. Validation Report and Protocol, JRC Scientific and Technical Reports. Available at: https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=qt-eve-zm-020&q=id%3AQT-eve-zm*.

McCarthy, A. (2011) 'Genetically modified salmon vying for a spot at the dinner table', *Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd, 18(1), pp. 1–2. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.01.008.

MCOTA (2003) *Decreto-Lei n.º 72/2003 de 10 de Abril*. Portugal, Diário da República, Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente.

MCOTA (2004) *Decreto-Lei n.º 168/2004 de 7 de Julho*. Portugal, Diário da República, Ministério das Cidades, Ordenamento do Território e Ambiente. Available at: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/517232/details/maximized>.

Miao, X. (2012) 'Recent Advances and Applications of Transgenic Animal Technology', in

Polymerase Chain Reaction. InTech. doi: 10.5772/38040.

Monsanto (1996) *Safety, Compositional and Nutritional Aspects of Insect-Protected Corn Lines MON 809 and 810: Conclusion Based on Studies and Information Evaluated According to FDA's Policy on Foods from New Plant Varieties*. Chesterfield, Missouri, The Agricultural Group of Monsanto Company. Available at: <https://www.cropsscience.bayer.com/who-we-are/transparency/safety-results-gm-crops>.

Monsanto (2002) *Safety Assessment of YieldGard Insect-Protected Corn Event MON 810*. St. Louis, MO, United States of America. Available at: <https://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14750>.

Monsanto (2007a) *Application for renewal of the authorisation for continued marketing of existing food additives, feed materials and feed additives produced from MON 810 maize: Labelling and Unique Identifier*. Monsanto Europe S.A, Brussels, Belgium.

Monsanto (2007b) *Application for renewal of the authorisation for continued marketing of existing MON 810 maize products: Labelling and Unique Identifier*. Monsanto Europe S.A, Brussels, Belgium.

Monsanto (2007c) *Application to Place on the Market Genetically Modified Higher Plants: Insect-Protected Maize (MON 810)*. Brussels, Belgium, Monsanto Europe S.A. representing Monsanto Company.

Monsanto (2019) *Annual monitoring report on the cultivation of MON 810 in 2018*. Brussels, Belgium, Bayer Agriculture BVBA.

Mucci, A. and Hough, G. (2004) 'Perceptions of genetically modified foods by consumers in Argentina', *Food Quality and Preference*, 15(1), pp. 43–51. doi: 10.1016/S0950-3293(03)00021-1.

Muller, H. J. (1927) 'Artificial transmutation of the gene', *Science*, pp. 84–87. doi: 10.1126/science.66.1699.84.

Nambisan, P. (2017) 'Recombinant DNA Technology and Genetically Modified Organisms', in *An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology*, pp. 83–126. doi: 10.1016/b978-0-12-809231-6.00004-1.

Newton, D. (2014) *GMO Food: A Reference Handbook*. 1st edn. California: ABC-CLIO, LLC.

Nicholl, D. (2008) *An introduction to genetic engineering*. 3rd edn. New York: Cambridge University Press.

Nishu, N. *et al.* (2020) 'Transgenic animals in research and industry', in *Animal Biotechnology*. Elsevier, pp. 463–480. doi: 10.1016/b978-0-12-811710-1.00021-5.

Onyinye, U. H. *et al.* (2019) 'The use of transgenic animals in clinical research: the pros and cons', *Pharmacologyonline*, 2, pp. 177–189.

Paarlberg, R. (2008) *Starved for Science: How Biotechnology is Being Kept Out of Africa*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press.

PAFL (2001) *Prospects for Xenotransplantation: Scientific Aspects and Ethical Considerations, Curia Romana, Pontifical Academy for Life*. Available at: http://www.vatican.va/roman_curia/pontifical_academies/acdlife/documents/rc_pa_acdlife_doc_20010926_xenotrapianti_en.html (Accessed: 21 December 2020).

Parekh, S. R. (2004) *The GMO Handbook: Genetically Modified Animals, Microbes, and Plants in Biotechnology*. 1st edn. Edited by S. R. Parekh. New Jersey: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-59259-801-4.

Peterson, M. J. and Sandler, R. (2008) 'Ethical Evaluation of New Technologies: Genetically Modified Organisms and Plants', *International Dimensions of Ethics Education in Science and Engineering*. Available at: www.umass.edu/sts/ethics.

Pew (2001) *Guide to U.S. Regulation of Genetically Modified Food and Agricultural Biotechnology Products*. Pew Initiative on Food and Biotechnology, Philadelphia.

Pinkert, C. A. (2014) *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*. 3rd edn. Elsevier.

doi: <https://doi.org/10.1016/C2012-0-07277-8>.

Plan, D. and Eede, G. Van Den (2010) *The EU Legislation on GMOs: An Overview, JRC Scientific and Technical Reports, Luxembourg: Publications Office of the European Union*. doi: 10.2788/71623.

Polkinghorne, J. C. (2000) 'Ethical issues in biotechnology', *Trends in Biotechnology*, 18(1), pp. 8–10. doi: 10.1016/S0167-7799(99)01392-X.

Popek, S. and Halagarda, M. (2017) 'Genetically modified foods – consumer awareness, opinions and attitudes in selected EU countries', *International Journal of Consumer Studies*, (41), pp. 325–332. doi: <https://doi.org/10.1111/ijcs.12345>.

Prati, G., Pietrantonio, L. and Zani, B. (2012) 'The prediction of intention to consume genetically modified food: Test of an integrated psychosocial model', *Food Quality and Preference*. Elsevier Ltd, 25(2), pp. 163–170. doi: 10.1016/j.foodqual.2012.02.011.

Pratiwi, R. and Surya, M. (2020) 'Agrobacterium-Mediated Transformation', in *Genetic Transformation in Crops*. InTech, p. 15. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91132>.

Purchase, I. F. H. (2002) 'Ethical issues for bioscientists in the new millennium', *Toxicology Letters*, 127(1–3), pp. 307–313. doi: 10.1016/S0378-4274(01)00513-6.

Querci, M. *et al.* (2020) *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms, session 4, extraction and purification of DNA, European Commission Joint Research Centre Technical Report*. Luxembourg. doi: 10.2760/5277.

Rajagopal, K. (2012) *Recombinant DNA technology and genetic engineering*. 1st edn. New Delhi: Tata McGraw Hill Education Private Limited. Available at: <https://b-ok.africa/book/5472551/1a0be6>.

Rangel, G. (2015) 'From Corgis to Corn: A Brief Look at the Long History of GMO Technology', *Signal to Noise Special Edition: GMOs and Our Food*. Available at: <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/from-corgis-to-corn-a-brief-look-at-the-long-history-of-gmo-technology/>.

Rani, J. and Usha, R. (2013) 'Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future', *Journal of Pharmacy Research*. Elsevier Ltd, 6(8), pp. 879–883. doi: 10.1016/j.jopr.2013.08.008.

Rapoport, I. (1946) 'Carbonyl compounds and the chemical mechanisms of mutations', *Proceedings of the USSR Academy of Sciences*, 54, pp. 65–67.

Rapoport, I. (1948) 'Effects of ethylene oxide, glycidol and glycols on gene mutations', *Proceedings of the USSR Academy of Sciences*, 60, pp. 469–472.

REA (2019) *Riscos Ambientais: Organismos Geneticamente Modificados, Relatório do Estado do Ambiente - Agência Portuguesa do Ambiente*. Available at: <https://rea.apambiente.pt/content/organismos-geneticamente-modificados> (Accessed: 29 March 2020).

Rehm, H. and Reed, G. (1995) *Biotechnology: Legal, Economic and Ethical Dimensions*. 2nd edn, *Engineering*. 2nd edn. Weinheim: VCH Publishers Inc.

Ribeiro, T. G., Barone, B. and Behrens, J. H. (2016) 'Genetically modified foods and their social representation', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 84, pp. 120–127. doi: 10.1016/j.foodres.2016.03.029.

Ricroch, A. E., Guillaume-Hofnung, M. and Kuntz, M. (2018) 'The ethical concerns about transgenic crops', *Biochemical Journal*, 475(4), pp. 803–811. doi: 10.1042/BCJ20170794.

Roberts, R. J. *et al.* (2003) 'A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes', *Nucleic Acids Research*, 31(7), pp. 1805–1812. doi: 10.1093/nar/gkg274.

Robinson, J. (1999) 'Ethics and transgenic crops: A review', *Electronic Journal of Biotechnology*, 2(2), pp. 71–81. doi: 10.2225/vol2-issue2-fulltext-3.

Roe, B. and Teisl, M. F. (2007) 'Genetically modified food labeling: The impacts of message and messenger on consumer perceptions of labels and products', *Food Policy*, 32(1), pp. 49–66. doi: 10.1016/j.foodpol.2005.12.006.

Rozin, P., Fischler, C. and Shields-argelès, C. (2012) 'European and American perspectives on the meaning of natural', *Appetite*. Elsevier Ltd, 59(2), pp. 448–455. doi: 10.1016/j.appet.2012.06.001.

Russell, W. L. *et al.* (1979) 'Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), pp. 5818–5819. doi: 10.1073/pnas.76.11.5818.

Rutledge, K. *et al.* (2011) *Domestication*, *National Geographic*. Available at: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/domestication/> (Accessed: 10 December 2020).

Saher, M., Lindeman, M. and Hursti, U. K. K. (2006) 'Attitudes towards genetically modified and organic foods', *Appetite*, 46(3), pp. 324–331. doi: 10.1016/j.appet.2006.01.015.

Sayler, G. S. and Ripp, S. (2001) 'Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes', *Current Opinion in Biotechnology*, 11, pp. 286–289.

SCBD (2000) *Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity*. Montreal, Secretariat of the Convention on Biological Diversity.

SCBD (2011) *Nagoya-Kuala Lumpur Supplementary Protocol on Liability and Redress to the Cartagena Protocol on Biosafety*. Montreal, Secretariat of the Convention on Biological Diversity.

Sherlock, R. and Morrey, J. D. (2000) 'Ethical issues in transgenics', *Cloning*, 2(3), pp. 137–144. doi: 10.1089/152045500750039842.

Shinde, S. A. *et al.* (2018) 'Recombinant DNA Technology and its Applications: A Review', *International Journal of MediPharm Research*, 4(2), pp. 79–88. doi: 10.5005/jp/books/10279_5.

Sola, I. *et al.* (1998) 'Transgenic Mice Secreting Coronavirus Neutralizing Antibodies into the Milk', *Journal of Virology*, 72(5), pp. 3762–3772. doi: 10.1128/jvi.72.5.3762-3772.1998.

Sosa, M. A. G., De Gasperi, R. and Elder, G. A. (2010) 'Animal transgenesis: An overview', *Brain Structure and Function*, 214(2–3), pp. 91–109. doi: 10.1007/s00429-009-0230-8.

Spence, A. and Townsend, E. (2006) 'Examining consumer behavior toward genetically modified (GM) food in Britain', *Risk Analysis*, 26(3), pp. 657–670. doi: 10.1111/j.1539-6924.2006.00777.x.

Sprangers, B., Waer, M. and Billiau, A. D. (2008) 'Xenotransplantation: Where are we in 2008?', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 74(1), pp. 14–21. doi: 10.1038/ki.2008.135.

Srivastava, S. (2013) *Genetics of bacteria*. New Delhi: Springer. doi: 10.1007/978-81-322-1090-0.

Stadler, L. (1928) 'Mutations in barley induced by X-rays and radium', *Science*, 68(1756), pp. 186–187.

Stadler, L. J. (1927) 'Genetic Effects of X-Rays in Maize', *Genetics*, 14, pp. 69–75. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1085350/pdf/pnas01813-0080.pdf>.

Stadler, L. and Sprague, G. (1936) 'Genetic effects of ultra-violet radiation in maize', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 22(10), pp. 584–591.

De Steur, H. *et al.* (2010) 'Willingness-to-accept and purchase genetically modified rice with high folate content in Shanxi Province, China', *Appetite*, 54(1), pp. 118–125. doi: 10.1016/j.appet.2009.09.017.

Sun, H., Chen, Q. and Lai, H. (2018) 'Development of antibody therapeutics against flaviviruses', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(54). doi: 10.3390/ijms19010054.

Tas, M. *et al.* (2015) 'Consumer awareness, perception and attitudes towards genetically modified foods in Turkey', *British Food Journal*, 117(5), pp. 1426–1439. doi: 10.1108/BFJ-01-2014-0047.

Tengerdy, R. P. and Szakács, G. (1998) 'Perspectives in agrobiotechnology', *Journal of Biotechnology*, 66(2–3), pp. 91–99. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00138-2.

Terré, J. *et al.* (1996) 'Eradication of rabies, using a ret-DNA vaccine', *Journal of Biotechnology*, 46(6), pp. 156–157.

Tharp, D. (2014) *Genetically Engineered Salmon: Background and Issues*. 1st edn. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Thomas, B., Deynze, A. and Bradford, K. (2002) 'Production of Therapeutic Proteins in Plants', *Agricultural Biotechnology in California Series*, 8078. doi: 10.3733/ucanr.8078.

Thomas, D. D. *et al.* (2000) 'Insect Population Control Using a Dominant, Repressible, Lethal Genetic System', *Science*, 287(March), pp. 2474–2476.

Till, R. (1998) 'GM-CSF: More than a growth factor', *Journal of Biotechnology*, 61(2), pp. 158–161. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00019-4.

USC (2000) *Plant Protection*. United States of America, United States Code 7 USC Ch. 104: Plant Protection. Available at: <https://uscode.house.gov/view.xhtml?path=/prelim@title7/chapter104&edition=prelim>.

USC (2012) *Insecticides and Environmental Pesticide Control*. United States of America, United States Code 7 USC 136. Available at: <https://www.govinfo.gov/app/details/USCODE-2011-title7/USCODE-2011-title7-chap6-subchapII-sec136/context>.

Vàzquez-Salat, N. *et al.* (2012) 'The current state of GMO governance: Are we ready for GM animals?', *Biotechnology Advances*. Elsevier B.V., 30(6), pp. 1336–1343. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.006.

Wall, R. (2002) 'New Gene Transfer Methods', *Theriogenology*, 57, pp. 189–201. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00666-5.

Wells, H. (2019) *Food Science and Food Biotechnology*. 1st edn. ED-TECH PRESS.

Wheeler, M. B. and Walters, E. M. (2001) 'Transgenic technology and applications in swine', *Theriogenology*, 56, pp. 1345–1369.

Wheeler, M. B., Walters, E. M. and Clark, S. G. (2003) 'Transgenic animals in biomedicine and agriculture: Outlook for the future', *Animal Reproduction Science*, 79(3–4), pp. 265–289. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00168-4.

Woźniak, E., Tyczewska, A. and Twardowski, T. (2020) 'A Shift Towards Biotechnology: Social Opinion in the EU', *Trends in Biotechnology*, pp. 1–4. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.08.001.

Yang, C. J. *et al.* (2019) 'The genetic architecture of teosinte catalyzed and constrained maize domestication', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(12), pp. 5643–5652. doi: 10.1073/pnas.1820997116.

Yaskowiak, E. S. *et al.* (2006) 'Characterization and multi-generational stability of the growth hormone transgene (EO-1 α) responsible for enhanced growth rates in Atlantic Salmon', *Transgenic Research*, 15(4), pp. 465–480. doi: 10.1007/s11248-006-0020-5.

Zhang, C., Wohlhueter, R. and Zhang, H. (2016) 'Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems', *Food Science and Human Wellness*. Beijing Academy of Food Sciences., 5(3), pp. 116–123. doi: 10.1016/j.fshw.2016.04.002.

Zhang, R. *et al.* (2012) 'Functional recombinant human anti-HBV antibody expressed in milk of transgenic mice', *Transgenic Research*, 21(5), pp. 1085–1091. doi: 10.1007/s11248-012-9589-z.

Zhou, H. *et al.* (2004) 'Transformation of the salt-tolerant gene of *Avicennia marina* into tobacco plants and cultivation of salt-tolerant lines', *Chinese Science Bulletin*, 49(5), pp. 456–461. doi: 10.1360/03wc0392.

Anexo – Proposta de Questionário para Inquérito a Estudantes da Universidade de Aveiro
sobre Organismos Geneticamente Modificados

Proposta de Questionário para Inquérito a Estudantes da Universidade de Aveiro sobre Organismos Geneticamente Modificados

Descrição do Planeamento do Inquérito

A presente proposta de questionário para inquérito, pertencente ao trabalho de mestrado “Transgénicos: Estado da Arte e Implicações Bioéticas”, tem como objetivo determinar as opiniões e perceções dos alunos da Universidade de Aveiro em relação a organismos geneticamente modificados.

Serão avaliados aspetos como a aceitabilidade do seu desenvolvimento em diferentes áreas de aplicação, incluindo o seu cultivo e consumo, assim como a perceção dos riscos que estes organismos representam para o ambiente e saúde humana.

A primeira fase do inquérito consistirá na sua distribuição e preenchimento pelos estudantes da Universidade de Aveiro. A segunda fase passará pela análise e interpretação dos dados obtidos.

A sua realização será *online*, sendo composto por 27 questões, para além dos dados do participante, e o seu tempo de preenchimento será de cerca de 10 minutos. Não existem respostas certas ou erradas.

A participação no inquérito será anónima e utilizada apenas para fins estatísticos. O registo das respostas ao inquérito não conterá qualquer informação sobre a identidade dos participantes.

Dados Individuais do Participante

1) Gênero:

Feminino _____

Masculino _____

2) Idade: _____

3) Curso frequentado: _____

4) Já ouviu falar sobre engenharia genética e organismos geneticamente modificados?

Sim _____

Não _____

5) Já pesquisou informações/notícias/desenvolvimentos na área da engenharia genética e organismos geneticamente modificados?

Sim _____

Não _____

6) Já discutiu o tema com alguém anteriormente?

Sim _____

Não _____

7) Alguma vez estudou ciências naturais, tecnologia ou engenharia (como biologia, química, física ou medicina), durante o ensino secundário ou superior?

Sim _____

Não _____

8) Alguém na sua família tem/teve um emprego, ou qualificação acadêmica superior, em ciências naturais, tecnologia ou engenharia (como biologia, química, física ou medicina)?

Sim _____

Não _____

9) Qual a sua religião?

Cristianismo _____

Islamismo _____

Hinduísmo _____

Budismo _____

Judaísmo _____

Outra _____ Qual? _____

Agnosticismo _____

Ateísmo _____

Prefiro não dizer _____

Questionário

	Questão	Concorda	Indiferente	Discorda	Não sabe
1	O desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas é prejudicial para o ambiente.				
2	O consumo de alimentos geneticamente modificados é prejudicial para a saúde.				
3	O desenvolvimento e consumo de alimentos geneticamente modificados são seguros para as gerações futuras.				
4	Os alimentos geneticamente modificados são fundamentalmente antinaturais, por consistirem numa interferência humana na natureza dos organismos.				
5	Consumiria um alimento geneticamente modificado.				
6	O consumo de alimentos geneticamente modificados deixa-o apreensivo.				
7	O consumo de alimentos geneticamente modificados iria contra os seus princípios.				
8	As suas crenças religiosas constituem um impedimento para o consumo de alimentos geneticamente modificados.				
9	Compraria um alimento geneticamente modificado se este fosse mais barato e nutricionalmente mais rico do que o seu equivalente convencional.				
10	A transferência de um gene de uma espécie de maçã para outra é mais aceitável do que a transferência de um gene de uma bactéria para uma maçã.				
11	Os alimentos geneticamente modificados são menos saudáveis do que os seus equivalentes convencionais.				
12	Os alimentos geneticamente modificados trazem benefícios para a população.				
13	Os alimentos geneticamente modificados beneficiam algumas pessoas mas colocam outras em risco.				
14	A produção de alimentos geneticamente modificados traz benefícios para países em desenvolvimento.				

15	O desenvolvimento de alimentos geneticamente modificados deve ser desencorajado.				
16	Ao comprar um alimento, a presença de ingredientes GM constitui uma preocupação para si.				
17	É necessária a existência de rotulagem em alimentos para indicar a presença de conteúdos geneticamente modificados.				
18	Sente confiança nas autoridades que regulam a produção de alimentos geneticamente modificados.				
19	A engenharia genética é mais aceitável para aplicações biomédicas do que alimentares.				
20	A engenharia genética é mais aceitável na produção de microrganismos geneticamente modificados do que de plantas ou animais geneticamente modificados.				
21	Para fins alimentares, plantas geneticamente modificadas são mais aceitáveis do que animais geneticamente modificados.				
22	Animais geneticamente modificados para aplicações biomédicas são mais aceitáveis do que para fins alimentares.				
23	O consumo de animais geneticamente modificados é seguro para a saúde humana.				
24	O consumo de animais geneticamente modificados é seguro para as gerações futuras.				
25	O consumo de animais geneticamente modificados deixa-o apreensivo.				
26	O desenvolvimento de animais geneticamente modificados para fins alimentares deve ser desencorajado.				
27	Independentemente dos benefícios que possa trazer, a engenharia genética é moralmente inaceitável.				