

A ENGENHARIA GENÉTICA APLICADA NO MELHORAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR: UMA NOVA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE SEGUNDA GERAÇÃO

GENETIC ENGINEERING IN APPLIED BREEDING OF SUGAR CANE: A NEW ALTERNATIVE FOR THE PRODUCTION OF BIODIESEL OF SECOND GENERATION

Elisângela Távora da Silva ¹

Eunice Parreira de Souza ²

Rodrigo da Silva Santos ³

Mônica Santiago Barbosa ⁴

1 – Bióloga. Departamento de Biologia do Centro Universitário de Goiás (Uni-ANHANGUERA).

2 - Bióloga. Departamento de Biologia do Centro Universitário de Goiás (Uni-ANHANGUERA).

3 – Professor Colaborador. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Campus Goiânia-GO.

4 – Professora Orientadora. Departamento de Biologia do Centro Universitário de Goiás (Uni-ANHANGUERA) e Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí-GO.

E-mail: santiagosant@gmail.com (Barbosa, MS).

Resumo: A biotecnologia têm proporcionado grandes avanços ao melhoramento genético. Neste sentido, objetivou-se abordar contextos atuais das dinâmicas institucional, organizacionais e tecnológicas nas quais os Organismos Geneticamente Modificados se inserem. A preocupação inicial foi relatar as tecnologias utilizadas para produção sustentável, e as modificações genéticas da cana-de-açúcar para a produção de biodiesel. Para isso, foi utilizada a tecnologia do DNA recombinante, que permite isolar, preparar, manipular e estudar pequenos segmentos de DNA, e têm sido amplamente usada para tornar resistentes aos herbicidas, certas culturas comercialmente importantes. A transformação gênica permite transferir o gene de interesse através de métodos naturais, como a *Agrobacterium tumefaciens*, ou métodos físicos e diretos como a eletroporação e a biobalística. A produção do biodiesel é uma opção alternativa que permitiria contornar a escassez de petróleo, pois é constituído de carbono neutro. No entanto, utilizar a biotecnologia para aperfeiçoar o processo de produção de biodiesel, requer atenção visando o controle de possíveis riscos para o ambiente e o equilíbrio biológico. Com base nessa revisão da literatura, podemos concluir que ainda existem

poucos estudos conclusivos, sobre o melhoramento genético da cana-de-açúcar na produção de biodiesel, e que estudos futuros são necessários para validar o processo.

Palavras-chave: Biotecnologia, cana de açúcar, biodiesel, transformação genética e conservação ambiental.

Abstract: The biotechnology have made great advances in genetic improvement. In this sense, aimed to address current contexts of dynamic institutional, organizational and technological in which genetically modified organisms are included. The initial concern was to describe the technologies for sustainable production and genetic modification of sugar cane for the production of biodiesel. For this, we used recombinant DNA technology, which allows you to isolate, prepare, manipulate and study small segments of DNA, and have been widely used to become resistant to herbicides, some commercially important crops. The gene transformation allows you to transfer the gene of interest through natural methods such as *Agrobacterium tumefaciens*, and direct physical methods such as electroporation and biolistic. The production of biodiesel is an alternative option that would circumvent the shortage of oil, because it is made carbon neutral. However, using biotechnology to improve the production process of biodiesel, requires attention for the control of possible risks to the environment and ecological balance. Based on this literature review, we conclude that there are still few conclusive studies on the genetic improvement of sugar cane in the production of biodiesel, and future studies are needed to validate the process.

Keywords: Biotechnology, sugar cane, biodiesel, genetic transformation, environmental conservation.

Introdução

O Genoma de uma bactéria contém aproximadamente 5.000 genes, o de plantas tem em torno de 40.000 a 60.000, enquanto que o genoma de seres humanos consiste na faixa de 100.000 genes. Independente do organismo e de sua complexidade, os genes são segmentos de um mesmo tipo de molécula: o ácido desoxirribonucléico (DNA). Esta característica é que permite que genes de um organismo sejam potencialmente funcionais em outro. O isolamento e a transferência do(s) gene(s) de interesse

geralmente envolvem técnicas do DNA recombinante (Junqueira & Carneiro, 2005).

Segundo Vieira (2004), os genomas dos diferentes seres vivos organizados durante a evolução da vida na terra, são eventualmente alterados por mutações, mas esse processo é lento e limitado por sistemas internos de proteção e por barreiras chamadas naturais entre as espécies. Nas últimas décadas, porém, os cientistas desenvolveram técnicas chamadas, em seu conjunto, de biotecnologia que permitem alterar o material genético e até transferir genes de uma espécie para outra.

Durante muitos séculos os agricultores têm selecionado semeado e colhido sementes para

produzir colheitas com objetivos de aumentar a produtividade de determinadas culturas pela seleção de variedades que apresentem resistência a doenças e pragas; resistência a encharcamentos e à seca; maior resposta ou independência a fertilizantes; tolerância a condições ambientais hostis, como solos ácidos e/ou salgados, etc. Além disso, agricultores visam aumentar o valor de culturas de interesse socioeconômico, selecionando características como maior conteúdo de óleo; maior valor nutritivo; maior facilidade de colheita e armazenagem; independência da proteção por produtos químicos (Gander & Marcellino, 1997).

Os métodos da biotecnologia permitem não somente reduzir o tempo da obtenção de variedades com novas características, mas também transmitir propriedades de espécies que, normalmente, são sexualmente incompatíveis. Essa introdução de genes exógenos em plantas pode ser feita através da *Agrobacterium tumefaciens* ou por métodos diretos como eletroporação, microinjeção e a biobalística (Grambow *et al*, 1972).

As primeiras canas de açúcar (*Saccharum spp*) transformadas foram obtidas através de biobalística. As plantas foram transformadas com gene *neo* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, que confere a resistência a antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina e a canamicina, e *uid-A* que codifica a B-glucuronidase, servindo como gene repórter,

permitindo, assim a visualização do sucesso da transformação (Bower & Birch, 1992, citado por Ulian, 2007).

A otimização das condições de bombardeamento tem demonstrado alta eficiência de co-transformação em cana-de-açúcar, transferindo dois genes. O bombardeamento é um sistema bastante eficiente para inserção de genes de variedades de cana-de-açúcar e isso pode gerar uma maior competitividade no mercado (Ulian, 2007). A transformação da cana-de-açúcar por bombardeamento está sendo amplamente estudada e, atualmente, existem plantas transgênicas para os mais variados caracteres. Entretanto, os métodos apresentam problemas quanto à complexidade de integração do transgene, pois um grande número de cópias do gene pode ser inserido em regiões nas quais não ocorre transcrição ativa. Assim, pesquisadores têm estudado a aplicação da transformação da cana-de-açúcar mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, técnica que promove a inserção de poucas cópias em sítios altamente expressos do genoma (Riva *et al*, 1998; Lima *et al*, 2001).

O isolamento de novos genes, envolvido na resistência a patógeno e pragas é um desafio que abre novas perspectivas na obtenção de plantas resistentes. Desde a liberação comercial da primeira cultura transgênica, em 1996 (algodão transgênico resistente ao *Bacillus thuringiensis (Bt)*), questionou-se o sucesso devido ao

aparecimento da quebra de resistência. Entretanto, através do uso de estratégias cuidadosas de cultivo, tais como, o cultivo combinado de culturas resistentes e não resistentes no campo, pode-se prolongar a durabilidade da resistência dessas plantas engenheiradas (Ito *et al*, 2005).

Diversos genes de interesse agrônômico já foram isolados, tais como o gene que codifica para uma proteína de alto valor nutricional, presente na castanha-do-pará. Este gene poderia ser usado para aumentar o valor nutricional de algumas culturas importantes, como, por exemplo, o feijão, soja, ervilha, etc. Outro tipo, são os genes bacterianos que codificam para proteínas com propriedades tóxicas para insetos. Nestes exemplos, trata-se de característica monogênicas, onde o fenótipo é determinado pela expressão de único gene. Mas é necessário salientar que, muitas vezes, certas características importantes são definidas por vários genes, tais como: a resistência à seca, salinidade ou acidez do solo (Gander & Marcellino, 1997).

Uma vez dominados a identificação e o isolamento de genes de interesse e a regeneração de plantas hospedeiras a partir de uma ou de um grupo de células transformadas, são incontáveis as possibilidades oferecidas por esta tecnologia em plantas transgênicas. E esta tecnologia vem sendo mais e mais utilizada. No ano de 1987, cinco tipos de plantas transgênicas foram testados no campo,

já em 1995, um total de 707 tipos de plantas transgênicas já foi para o campo. Entre as espécies geneticamente manipuladas encontram-se aquelas que são as mais importantes na alimentação humana e animal e na indústria de tecido, ou seja, milho, batata, tomate, soja, feijão, algodão e, como planta modelo em experimentos de pesquisa básica como o fumo. Além destas espécies, foram transformadas: melancia, couve, cenoura, alfafa, arroz, trigo, girassol, cana-de-açúcar, alface, maçã, amendoim, entre outras. De maneira geral, mais de 50% destas espécies foram transformadas com genes que conferem resistência a herbicidas, vírus e insetos. Em outros 30% dos casos, o objetivo da transformação genética era um aumento da qualidade dos produtos e o restante visou à obtenção de conhecimentos básicos na área de biologia molecular de plantas ou das interações entre patógenos e plantas (Candeias, 2001).

De fato a biotecnologia é uma ferramenta importante para programas de melhoramento genético. No entanto requer atenção visando o controle de possíveis riscos para o ambiente e o equilíbrio ecológico. Assim os procedimentos de biossegurança visam evitar e minimizar as conseqüências adversas dos OGMs (Organismos Geneticamente Modificados) e seus derivados para o homem e o meio ambiente (Ferreira, 2001).

A Biotecnologia e o Melhoramento Genético de Plantas

Os métodos modernos da biotecnologia permitem isolar e manipular genes específicos de interesse agrônomo, como os que conferem resistência a pragas, a doenças e a herbicidas, tolerância a condições ambientais hostis ou que determinam características de valor socioeconômico. Esses métodos permitem também transferir genes de espécies selvagens para espécies cultivadas, superando as barreiras de cruzamentos naturais existentes entre espécies e reduzindo o tempo de obtenção de variedades realmente novas, com características que não possuíam. As técnicas que compõem a biotecnologia são potencialmente aplicáveis à transferência de genes de qualquer organismo, seja ele vírus, bactéria, fungo, alga, animal, ou qualquer vegetal não relacionado, a uma grande variedade de espécies de plantas (Lehninger, 2011; Junqueira & Carneiro, 2005).

Nos últimos anos a transformação genética de plantas tem sido vantajosa quando se dispõe das seqüências de DNA a serem transferidas, isto é, quando os genes de interesse foram identificados e clonados em um vetor, permitindo a produção de plantas transgênicas. Entretanto, ainda são poucos os genes que se têm disponíveis, e muitos deles, embora já seqüenciados e mapeados, correspondem a DNAs de tamanho grande, o

que dificulta a sua clonagem e transferência. Por outro lado, avanços recentes em pesquisa sobre a regeneração de plantas a partir de protoplastos, têm possibilitado a introgressão de genes a partir da fusão de células somáticas (Ferreira, 2003).

A Tecnologia do DNA recombinante (rDNA)

Muitas descobertas fundamentais de processos genéticos em nível molecular têm sido realizadas mediante pesquisas com microrganismos. Os cientistas também têm analisado e diferenciado DNAs isolados de muitos organismos. Além disso, habilidades técnicas e o uso de novas enzimas têm sido desenvolvidos, por meio dos quais as moléculas de DNA podem ser “cortadas e emendadas” para incorporar um novo fragmento de DNA que confere ao microrganismo receptor uma nova capacidade bioquímica. Estas técnicas de transferência de um fragmento de DNA de um organismo para outro são chamadas de tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética (Michael *et al.*, 2005).

A tecnologia do rDNA envolve modificação direta do DNA, de forma a alterar características do organismo vivo ou introduzir novas características. O isolamento dos genes de interesse é conduzido por meio de técnicas de clonagem molecular que

consiste em induzir um organismo vivo a ampliar a seqüência de DNA de interesse, em sistemas que permitem uma fácil purificação e recuperação do referido fragmento de DNA. Para isso, são utilizados vetores de clonagem, nos quais a seqüência de DNA de interesse é inserida, utilizando a enzima DNA ligase. Quando necessário, o fragmento de DNA de interesse pode ser libertado do vetor por meio de enzimas de restrição. Uma vez isolado o gene de interesse, estes fragmentos de DNA são incorporados no genoma do organismo alvo, resultando em um organismo geneticamente modificado, cuja característica adquirida passa a ser hereditária (Lehninger, 2011; Ferraz & Rodrigues, 2007).

A Clonagem *in vitro* e a cultura de células vegetais

O termo “clonagem” significa a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células ou fragmentos de uma determinada matriz. Clone deriva etimologicamente do grego Klón, que quer dizer “broto” e pressupõe, portanto, a existência de um indivíduo gerador, e a ocorrência de reprodução assexuada (Kerbaury, 1997). A técnica da clonagem *in vitro* de plantas, também conhecida por micropropagação, devido ao emprego de porções de tecidos bastante pequenas, tem-se mostrado de enorme importância prática e

potencial nas áreas agrícola, florestal, horticultura, bem como na pesquisa básica em geral.

A necessidade de colocação rápida no mercado de plantas de ciclo de vida longo, geralmente arbóreas e arbustivas, selecionadas depois de prolongados períodos de melhoramento genético, faz da clonagem uma alternativa muito importante e indispensável nos dias atuais. O isolamento de pequenas porções de regiões meristemáticas (0,1 a 0,5mm) e a cultura desta em meios de cultura apropriados permite a obtenção em escala econômica de plantas clonadas livres de muitos patógenos (Kerbaury, 1997).

Os potenciais de regeneração dependem do tipo de planta, do órgão utilizado e do estágio de desenvolvimento deste. Órgãos jovens são mais suscetíveis à clonagem do que quando maduros, o que significa que, à medida que a especialização progride durante o desenvolvimento do órgão ou planta, a desprogramação gênica (desdiferenciação) torna-se mais difícil (Kerbaury, 1997).

As culturas podem ser estabelecidas a partir tanto de fragmentos de tecidos maduros (folhas, caules etc.), quanto de tecidos meristemáticos, constituídos por células em processo de divisão e localizados, geralmente, nos ápices dos caules e raízes em crescimento. O baixo grau de diferenciação de suas células, associado à maior estabilidade genética destas, faz dos ápices meristemáticos uma das

principais fontes de explantes. Após a necessária desinfestação das superfícies externas, os explantes são transferidos para os meios de cultura, uma mistura balanceada de macro e micronutrientes (sais minerais), aminoácidos, vitaminas etc., e, obviamente, de uma auxina e uma citocinina em proporções adequadas às finalidades desejadas. A geleificação do meio para efeito de sustentação das culturas é obtida através da adição de ágar. Gemas vegetativas e mesmo florais, raízes e embriões somáticos poderão se formar tanto diretamente do explante quanto indiretamente (via proliferações celulares, os chamados calos). De um modo geral, os balanços hormonais mais favoráveis às auxinas promovem a formação de embriões e primórdios de raízes e, quando favoráveis às citocininas, induzem a formação de gemas. Quando apenas gemas são formadas, torna-se necessária a transferência destas para meios indutores de raízes, obtendo-se então uma planta inteira e em condições de ser transferida para a casa de vegetação. Os calos, por serem massas celulares indiferenciadas, permitem também a regeneração *in vitro* com relativa facilidade. Todos os procedimentos necessários ao manuseio das culturas são realizados sob condições assépticas, fornecidas por equipamentos especiais (Kerbaui, 1997).

Métodos de transferência gênica

Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens é uma bactéria de extrema importância para a biotecnologia de plantas, uma vez que detém a habilidade natural de transferir genes presentes em suas células vegetais. Esta habilidade permitiu surgimento de boa parte das sementes geneticamente modificadas plantadas hoje em todo mundo (Guerrante, 2003).

Uma das técnicas para produção de plantas transgênicas com *Agrobacterium* baseia-se no uso de seções circulares de folhas, que posteriormente são incubadas com uma solução contendo uma suspensão de *Agrobacterium* contendo o vetor recombinante, baseado no plasmídeo *Ti*. As bordas injuriadas das seções foliares garantem a condição essencial para que ocorra infecção pela bactéria. As seções foliares infectadas são transferidas para placas contendo meio de cultura com células produtoras de fatores de crescimento, estimulando o início da divisão celular nas bordas. Em seguida, transfere-se para meio de cultura próprio para diferenciação da parte aérea e seleção de plântulas contendo o T-DNA recombinante. Assim, se o marcador for o gene para neomicina fosfotransferase II (NPT-II), as plantas contendo o vetor recombinante serão tolerantes ao antibiótico canamicina. Uma vez regenerada a parte aérea, a produção de raízes

é induzida, em meio apropriado, e após algumas semanas as plântulas podem ser transplantadas para vasos em casa-de-vegetação.

Biobalística

O processo de biobalística tem o objetivo de introduzir material genético no genoma nuclear de plantas superiores (Sanford *et al.*, 1987). A biobalística utiliza microprojéteis de ouro ou tungstênio acelerados a altas velocidades (Superiores a 1.500 km/h) para carrear e introduzir ácidos nucléicos e outras moléculas em células e tecidos *in vivo*. As micropartículas aceleradas penetram na parede e membrana celular de maneira não-letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Em seguida, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, ocorrendo o processo de biobalística que permite a introdução e expressão gênica em qualquer tipo celular. Assim, foi aberta a possibilidade de transformação *in situ* de células diferenciadas sem necessidade de regeneração de novo. Desta forma, vislumbrou-se a possibilidade de obtenção de plantas transgênicas através de transformação de células-mãe do meristema apical. A transformação destas células meristemáticas através do processo biobalístico tem-se mostrado bastante eficiente. As

micropartículas podem atingir as células das três camadas do meristema apical. A frequência de transformação, no entanto, pode ser significativamente aumentada através da indução de organogênese na região do meristema apical, isto é, através da indução de uma multibrotação (Aragão *et al.*, 1996).

Eletroporação de Protoplastos

Eletroporação de protoplasto é um método utilizado para introduzir macromoléculas em células vegetais. Protoplastos são células desprovidas de paredes celulares e, teoricamente, podem ser isolados de qualquer tecido vegetal. Em condições bem estabelecidas de cultura de tecidos, os protoplastos reconstituem suas paredes, dividem-se, formam colônias, calos e regeneram plantas, por embriogênese ou organogênese (Mehrlé *et al.*, 1985).

A obtenção de protoplasto requer a incubação do tecido vegetal em meio de digestão composto de enzimas pectocelulolíticas, i.e., enzimas que digerem a celulose, a hemicelulose e a pectina, principais componentes da parede celular e principais nutrientes do meio de cultivo. O pH deve favorecer a atividade enzimática sem comprometer a viabilidade das células, e a pressão osmótica deve ser adequada à estabilidade dos protoplastos recém-liberados. A composição do meio de digestão e o tempo

de permanência de diferentes tecidos nesse meio devem ser determinados para cada tecido e genótipo utilizado. O bom estado fisiológico da planta doadora é também essencial à obtenção de protoplastos íntegros e capazes de se dividir e formar colônias (Nishiguchi *et al.*, 1986).

A eletroporação consiste na indução de poros reversíveis em membranas celulares, resultando em fluxo de íons e moléculas através da membrana deformada (Dimitrov & Sowers, 1990). A eletroporação de protoplastos é realizada imediatamente após a purificação deles. Adiciona-se, à suspensão de protoplastos, o plasmídeo no qual estão clonados os genes de interesse e os genes marcadores, que facilitam a recuperação das células transformadas (Guerche *et al.*, 1987). No momento da eletroporação, um grande número de células encontra-se individualizado e homogêneo, o que favorece a obtenção de transformantes independentes e facilita a seleção. A seleção é feita no início da cultura, quando a maioria das células derivadas dos protoplastos está na segunda divisão. Essa seleção precoce é bastante eficiente, evita o aparecimento de falsos transformantes ou quimeras, o que é um problema em outras técnicas de transformação, nas quais a seleção é realizada em tecidos ou órgãos intactos. A eletroporação é utilizada também para introduzir RNA, proteínas, corantes e drogas em células animais e protoplastos vegetais (Okada *et al.*, 1986; Sowers & Lieber, 1986).

A maioria dos aparelhos de eletroporação, os eletroporadores, utiliza descargas de capacitores para produzir pulsos de alta voltagem. A intensidade do pulso é determinada pela voltagem aplicada e a condutividade do meio. Quando não se conhecem os parâmetros para a eletroporação de uma espécie ou tecido vegetal, é necessário otimizar a intensidade da voltagem e a capacitância, a duração do pulso, a condutividade do meio, a concentração dos protoplastos e a quantidade de DNA (plasmídeo e carreador), entre outros (Rech *et al.*, 1989).

A Cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é originária da Ásia Meridional, geralmente, cultivada em países tropicais e subtropicais para a obtenção do açúcar, do álcool e da aguardente (Guimarães, 2009). Para o Brasil foi trazida em 1530 pelos colonizadores portugueses, como sustentáculo econômico das capitânicas hereditárias (CENTEC, 2004).

O Brasil é hoje o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Seus produtos são largamente utilizados na produção de açúcar, álcool combustível e mais recentemente, biodiesel. A cana-de-açúcar é plantada em vários estados brasileiros, estimando-se em 5,5 milhões de hectares a área colhida em 2004 (BIODIESELBR, 2011).

Albino *et al.* (2006) ressalta que apesar da importância da cultura de cana-de-açúcar para o Brasil, o rendimento nacional é baixo, com média de 75 ton/ha, sendo que a principal estratégia para aumento de produtividade é o desenvolvimento de cultivares melhorados. Em todo o mundo, os programas de melhoramento genético buscam obter cultivares mais produtivos, exibindo tolerância a fatores bióticos e abióticos, de modo a se extrair o potencial máximo da cultura sob condições ambientais específicas.

As sementes dos cruzamentos são germinadas, e as plântulas obtidas são cultivadas em diversas estações experimentais, sendo submetidas à seleção em fase de colheita, quantificando-se parâmetros tecnológicos e biométricos relacionados à produção. Os clones resultantes das diversas fases de seleção são enviados para usinas cooperadas e avaliados quanto seu desempenho sob diversas condições edafoclimáticas. Portanto, o desenvolvimento de um cultivar de cana-de-açúcar é um processo que demanda muito tempo (em média 12 anos), trabalho e recursos (Albino *et al.*, 2006).

Segundo Albino *et al.* (2006) o genoma de cada indivíduo possui características (sequência de nucleotídeos) que o diferencia dos demais, a análise molecular permite detectar variabilidade genética como também determinar pontos de referência nos cromossomos, possibilitando assim, um

aumento da eficiência da seleção precoce e/ou indireta em cana-de-açúcar. O uso de marcadores moleculares possibilita otimizar a prática de seleção no melhoramento, uma vez que são capazes de revelar a variabilidade genética existente no DNA e não estarem sujeitos às influências de efeitos ambientais.

A facilidade com que os genótipos de cana-de-açúcar apresentam para serem transformados, junto com a identificação das seqüências de milhares de genes que esta planta expressa, abre a possibilidade de alterar a expressão de genes específicos da planta e identificar os efeitos que esta modificação apresenta no fenótipo da planta (Albino *et al.*, 2006; Ulian, 2007). As variedades transgênicas de cana-de-açúcar podem aumentar a produtividade canavieira através da mutação das características de resistência a herbicida e aumento da precocidade.

Os primeiros exemplos da expressão de genes heterólogos em plantas de cana-de-açúcar foram obtidos pela inserção de genes que conferem resistência a antibióticos e a herbicida (Gallo-Meagher e Irvine, 1996 citado em Albino *et al.*, 2006). Há muitos anos a transformação genética de cana-de-açúcar tem sido uma realidade em diferentes laboratórios de todo o mundo. A produção de plantas resistentes a herbicida é uma prática comum e o desempenho agrônomico e estudos da herdabilidade em plantas que contêm esta característica já foram executados no campo. As primeiras plantas de cana-de-açúcar

resistentes a inseto foram produzidas pela transformação com uma versão truncada do gene *cry* de *Bacillus thuringiensis* e as plantas resultantes produziram quantidades muito baixas de proteínas, apresentando alguma atividade larvicida. Guimarães (2009) e Vieira (2004), relataram a produção de um significativo número de eventos transgênicos resistentes à broca da cana-de-açúcar em duas variedades comerciais desta cultura. O gene usado era uma versão reconstituída do *cry* e as plantas apresentaram alta resistência sob condições de estufa e de campo. Mais recentemente, uma versão truncada do gene *cry* de *Bacillus thuringiensis* foi inserida em plantas de cana-de-açúcar, e níveis significativos da proteína e a resistência ao inseto utilizado para obter plantas de cana de açúcar (Ulian, 2007).

Outras estratégias já foram utilizadas para obter plantas de cana-de-açúcar resistentes a inseto, usando genes de várias fontes. Nutt *et al* (1999) e Nutt (2005) obtiveram plantas transgênicas de cana-de-açúcar que expressavam o inibidor de proteínas II da batata ou o gene da lectina de *Galanthus nivalis*, que conseguiram reduzir o peso das larvas de coleópteros de solo que se alimentam das raízes dessas plantas. Plantas de cana-de-açúcar contendo o gene da lectina de *Galanthus nivalis* também foram relatadas sem qualquer informação sobre estudos sobre a resistência ao inseto (Ulian, 2007).

A Produção do Biodiesel

A produção de combustíveis a partir da agricultura constitui uma estratégia, que vem despertando muito otimismo, por suas possibilidades de amenizar a crise de abastecimento de combustíveis. De fato, os biocombustíveis oferecem uma opção de fornecimento energético que permitiria contornar a escassez de petróleo e derivados, abrindo espaço para a continuidade do desenvolvimento econômico. Dentre as vantagens oferecidas do biodiesel, destaca-se: a energia renovável, por ser constituído de carbono neutro, sua obtenção e queima não contribuem para o aumento de CO₂ na atmosfera; promove o desenvolvimento social, contribuindo para a geração de empregos no setor primário; alta diversidade de plantas oleaginosas indicadas para a produção de biodiesel e facilidade de cultivo, apresentando espécies adaptadas para diversas condições climáticas. Há dezenas de espécies vegetais no Brasil das quais se podem produzir o biodiesel, tais como a cana-de-açúcar (Beltrão, 2005, Vieira, 2004).

A utilização de fontes alternativas de energia é uma das grandes prioridades atuais, que vem a contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico. A preocupação atual pela redução da poluição e a crise energética têm estimulado o mercado

mundial de biocombustíveis. A economia global mantém-se em crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (Beltrão, 2005, Bilgen *et al.*, 2006). Estima-se que com o incremento do volume de biodiesel, o glicerol co-produzido aumentará de 83 para 330 milhões L/ano até o ano 2010 (MME, 2007). Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário à busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção. Este subproduto, na forma pura, possui inúmeras aplicações industriais (aditivos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica). O glicerol obtido resultante da transesterificação de triglicerídios com álcool apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo custo (Ooi *et al.*, 2004). A rentabilidade de vários processos químicos depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Dessa forma, existe um grande interesse na purificação do glicerol ou no seu reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporcionará à viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis. Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e

troca de íons para a remoção principalmente de K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores (Ito *et al.* 2005). No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente os problemas e riscos ambientais.

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (Beltrão, 2005). Neste sentido, a biotecnologia moderna, com todo seu avanço trará grandes contribuições e permitirá a obtenção de biomoléculas e produtos com importantes propriedades.

O biodiesel é um combustível composto pela adição de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos de qualquer triglicerídeo (óleos vegetais ou gorduras animais) com um álcool de cadeia curta como metanol ou etanol (Miragaya, 2005).

Os óleos vegetais apresentam maior viscosidade em relação ao óleo diesel sendo necessário submetê-los à reação de transesterificação, que é definida quimicamente como catálise homogênea, isto é, a reação de um triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, catalisada

por ácidos, bases ou enzimas. Por terem um custo comercial mais baixo, contribuirão para a diminuição da acidez do óleo vegetal, os catalisadores recomendados são o NaOH e o KOH, respectivamente hidróxidos de sódio e potássio. Pode também se utilizar a catálise heterogênea através de centrífugas, porém não é um método viável para grande produção de óleo vegetal (Teixeira, 2005).

No ano de 2003, o governo brasileiro concretizou a criação do Pró-Diesel, denominando-o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) que ampara política e economicamente a produção de oleaginosas por pequenos e médios produtores rurais, a comercialização do óleo e o uso na frota nacional (Câmara, 2006). Em 2005 ficou estabelecido o uso comercial obrigatório de 2% de biodiesel (B2) adicionado ao diesel de petróleo. A obrigatoriedade do biodiesel adicionado ao diesel conferiu a Agência Nacional do Petróleo (ANP), órgão do Governo Federal responsável pelo controle das atividades energéticas, a competência de regular e fiscalizar a produção de matéria-prima, a qualidade, a distribuição, a revenda e a comercialização do biodiesel no país (ANP, 2011).

Em 01 de Julho de 2008, o percentual obrigatório de adição de biodiesel aumentou de 2 para 3%, ou seja, B3 (ANP, 2011). Para atender essa determinação será necessária à produção anual de um bilhão e quatrocentos

milhões de litros de óleo vegetal por ano, apenas para consumo da frota nacional, considerando a extensão territorial do Brasil, apenas um milhão e quinhentos mil hectares dos cento e cinquenta milhões disponíveis para agricultura no país, são destinados para o cultivo de oleaginosas com finalidade energética, para suprir a meta nacional do biodiesel é preciso um cultivo intensivo de cana-de-açúcar que sejam altamente produtivas e com baixo custo de produção (Miragaya, 2005).

O Brasil é o país com maior potencial para produzir biodiesel, pois possui mais de 20% da área agricultável do mundo, e mais de duzentas espécies de oleaginosas que podem ser cultivadas em todo o território brasileiro (Beltrão, 2005).

Biossegurança

Quando o Brasil entendeu a importância da tecnologia do DNA recombinante para seu desenvolvimento científico e tecnológico, também simultaneamente entendeu a importância de que esta tecnologia teria que ser controlada e avaliada criteriosamente para que não houvesse riscos para o homem e o meio ambiente (Ferreira, 2003).

A lei nº 8.974, de 05/01/97, conhecida como lei de biossegurança, estabelece uma série de normas e procedimentos que devem

ser rigorosamente cumpridas para o desenvolvimento, importação, uso e comercialização de Organismos Geneticamente Modificados (OGM). É importante ressaltar que todos os membros devem ter um perfil técnico, pois a comissão avalia tecnicamente cada OGM. Assim a CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) foi desenvolvida de forma ética e responsável para assim, contribuir para a superação dos desafios da humanidade e promover o bem-estar-social (Ferreira, 2003).

Conclusão

Pôde-se constatar que a biotecnologia e seus respectivos métodos, proporcionaram grandes avanços na agricultura, contribuindo com o controle e eliminação de algumas doenças de plantas, reduzindo o uso de agrotóxicos. Além de permitir a transferência de propriedades de espécies sexualmente incompatíveis.

Sabe-se que a engenharia genética é a manipulação direta do material genético envolvendo a transferência de gene de um organismo para o outro, utilizando a tecnologia do DNA recombinante. A transformação gênica envolve a escolha de um doador com um gene desejável, a clonagem do gene e a seleção de um vetor, ou técnicas de transferência de gene e de um receptor. Verificou-se que a transferência de gene da

cana-de-açúcar foi obtida pela inserção de genes que conferem resistência a antibióticos e a herbicidas, e trouxe grandes avanços para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar para produzir biodiesel, que é um combustível alternativo constituído de carvão neutro, onde sua obtenção ou queima não contribui para o aumento do CO₂ na atmosfera.

No entanto, todos os países são obrigados a possuir uma unidade competente para avaliar o cumprimento das normas de segurança biológica relacionada aos OGMs no meio ambiente. A existência de uma legislação específica possibilitou ainda a criação de uma comissão para o assunto de biossegurança nacional no Brasil, a CTNBio, que regulamenta a criação de um código de ética para as manipulações genéticas que estabelece normas e regulamentos para todas as atividades que envolvam a utilização de OGMs. Sendo assim, o presente levantamento bibliográfico deixa evidenciado o quanto são importantes essas novas tecnologias genéticas tanto para a produção sustentável, quanto para as modificações da cana-de-açúcar no processo de produção de biodiesel.

Referências

ALBINO, JC.; Mapeamento genético em cana-de-açúcar. **Dissertação (mestrado)** – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. 2006.

- ARAGÃO, F. J. L.; SÁ, M. F. G. de; ALMEIDA, E.R.; GANDER, E. S.; RECH, E. L. Particle bombardment expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology*, v. 20, p. 357-359, 1992.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 21. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>>. 2011.
- BELTRÃO, N. E. M. Agronegócio das oleaginosas no Brasil. *Informe agropecuário*. Belo Horizonte, v.26, n.229, p.14-17, 2005.
- BIODIESELBR. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/energia/residuo/residuo-setor-sucroalcooleiro.htm>. 2011
- BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. *Renew. Sust. Energ.Rev.* 2006.
- BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. C. **Glossário de biotecnologia**. Editora Folha de Viçosa. 126p. 2005.
- CANDEIAS, J. A. N. A Engenharia Genética. *Rev. Saúde Pública*. São Paulo, vol. 25, n. 1, Fev. 1991.
- CÂMARA, G. M. de S. Biodiesel Brasil – Estado Atual da Arte. *Conselho de Informações sobre Biotecnologia*. São Paulo. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel_brasil>. 2006.
- CENTEC. Instituto Centro de Ensino Tecnológico. Produtor de cana-de-açúcar. *Cadernos Tecnológicos*. Ministério da Ciência e Tecnologia. Fortaleza, 2004.
- DIMITROV, D. S.; SOWERS, A. E. Membrane electroporation: fast molecular exchange by electro osmosis. *Biochimica et Biophysics Acta; Biomembranes*, v.1022, p. 381-392, 1990.
- FERRAZ, A. I.; RODRIGUES, A. S. **Introdução à biotecnologia**. Portugal, ano 1, s1. Disponível em <<http://www.ci.esapl.pt>>, 2007.
- FERREIRA, L. T. Melhoramento de plantas. *Biotecnologia Ciência & Tecnologia*. V. I. Novembro/dezembro. 2001.
- FERREIRA, L. T. Melhoramento de plantas. *Biotecnologia Ciência & Tecnologia*. V. II. Novembro/dezembro. 2003.
- GANDER, E. S.; MARCELLINO, L. H. Plantas transgênicas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Brasília – DF. Vol. 1. N.1, p.34- 37. 1997.
- GRAMBOW, H. J.; KAO, K. N.; MILLER, R. A.; GAMBORG, O.L. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. *Plant*, v.103, p. 348-355, 1972.
- GUERCHE, P.; CHARBONNIER, M.; JOANIN, L.; TOURNEUR, C.; PASZKOWSKI, J.; PELLETIER, G. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. *Plant Science*, v. 52, p.111-116, 1987.
- GUERRANTE, Rafaela Di Sabato. Transgênicos: Uma Visão Estratégica. 1. ed. Rio de Janeiro: *Interciência*, 2003.
- GUIMARÃES, C. T.; Mapeamento comparativo e detecção de QTLs em cana-de-açúcar utilizando marcadores moleculares. 70f. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. 2009.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 264-265. 2005.
- KERBAUY, G. B.; Clonagem de plantas “*IN VITRO*”. *Biotecnologia Ciência & Tecnologia*. V.1. N. 1. Maio. p. 30-33. 1997.

- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Princípios de Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2011.
- LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agents seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 73-77, 2001.
- MEHRLE, W.; ZIMMERMANN, U.; HAMPP, R. Evidence for asymmetrical uptake of fluorescent dyes through electropermeabilized membranes of *Avena mesophyll* protoplasts. **FEBS Letters**, v. 185, p. 89-94, 1985.
- MICHAEL, J.; PELCZAR, JR., CHAN, E. C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Volume 2. ed. São Paulo: Mackron Books. p. 18-405. 2005.
- MING R, LIU SC, MOORE PH, IRVINE JE, PATERSON AH. QTL analysis in a complex autoploid genetic control of sugar content in sugarcane. **Genome Research** (11). 2075-2084. 2001.
- MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe agropecuário**. Belo Horizonte, v.26, n.229, p.7-13, 2005.
- MME. MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/>. 2007.
- NISHIGUCHI, M.; LANGRIDGE, W.H.R.; SZALAY, A. A.; ZAITLIN, M. Electroporation mediated infection of tobacco leaf protoplasts with tobacco mosaic virus RNA and cucumber mosaic virus RNA. **Plant Cell Reports**, v. 8, p.57-60, 1986.
- NUTT, K.A., ALLSOPP, P.G., MCGHIE, T.K., SHEPHERD, K.M., JOYCE, P.A., TAYLOR, G.O. MCQUALTER, R.B. AND SMITH, G.R. **Transgenic sugarcane with increased resistance to canegrubs** Proceedings of the 1999 Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, Townsville, Queensland, Australia, 1999.
- NUTT, KA. **Characterization of proteinase inhibitors from canegrubs for possible application to genetically engineer pest-derived resistance into sugarcane**. PhD: Queensland University of Technology, Brisbane, Australia. 2005
- OOI, T.L.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; **J. Oleo Science**. 53, 2004.
- OKADA, K.; NAGATA, T.; TAKEBE, I. Introduction of functional RNA into plant protoplasts by electroporation. **Plant Cell Physiology**, v.27, p. 619-626, 1986.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **J. Biosci. Bioeng**. 2005.
- RECH, E.L.; ALVES, E. S.; DAVERY, M.R. Electroporation: a circuit diagram and computer program for assessment of physical parameters on eucariotic cells. **Technique**, v. 1, p. 125-129, 1989.
- RIVA, G. A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.; ARAPARDO, C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1. 1998.
- SANFORD, J. C.; KLEIN, T.M.; WORLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particle Science Technology**, v.5, p. 27-37, 1987.
- SOWERS, A. E.; LIEBER, M.R. Electropore diameters, lifetimes, numbers, and locations in individual erythrocyte ghosts. **FEBS Letters**, v. 205, p. 179-184, 1986.

TEIXEIRA, L. C. Produção de biodiesel.
Informe agropecuário. Belo Horizonte, v.26,
n.229, p.79-86, 2005.

ULIAN, E. C. **Desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas visando tolerância ao estresse híbrido**. In: V Workshop de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Cana-de-Açúcar, 2007.

VIEIRA, L. G. E. Organismos Geneticamente Modificados: Uma tecnologia controversa.
Ciência Hoje, Paraná, 2004.