

André Felipe Lohn

**METABOLOMA PARCIAL DE MILHO CRIOULO SUBMETIDO
A DIFERENTES GRAUS DE FLUXO GÊNICO POR
CULTIVARES GENETICAMENTE MODIFICADAS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr.^a Juliana Bernardi
Ogliari

Florianópolis - SC
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lohn, André Felipe
Metaboloma parcial de milho crioulo submetido a
diferentes graus de fluxo gênico por cultivares
geneticamente modificadas / André Felipe Lohn ;
orientadora, Juliana Bernardi Ogliari - Florianópolis, SC,
2014.
191 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. DRIFTS. 3. Grupos
Funcionais. 4. OGM. 5. Rosado-Rajado. I. Bernardi Ogliari,
Juliana. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, alegria, paz e muita paciência durante o desenvolvimento dessa dissertação.

À população brasileira, que por meio do dinheiro público, e através da Universidade Federal de Santa Catarina e o Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, possibilitou um ensino gratuito e de qualidade.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Juliana Bernardi Ogliari pela confiança e orientação nesse estudo. Obrigado pelos ensinamentos para o meu crescimento científico e pessoal durante os nossos 7 anos de entendimento.

À minha co-orientadora Shirley Kunhen pela presença constante e ensinamentos valiosos para o bom desenvolvimento desse projeto.

À minha família, Leo, Marlene, Francielli e Gabrielli, pela força, incentivo, dedicação e reconhecimento de meus estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelo convívio e aprendizado. Agradecimentos especiais aos professores: Rubens Onofre Nodari, Miguel Pedro Guerra, Maurício Sedrez dos Reis, Rosete Pescador e Nivaldo Peroni.

Aos agricultores Jair Coser e Miriam Della Vechia do município de Anchieta-SC, que por intermédio do Engenheiro Agrônomo e Extensionista da EPAGRI Ivan José Canci, gentilmente doaram as sementes da variedade crioula Rosado-Rajado para a realização desse projeto.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade pela presença, risadas, conversas calorosas e ensinamentos. Agradecimentos especiais para: Natália Carolina de Almeida Silva, Rafael Vidal e Samuel Kamphorst.

À amiga Kelly Justin da Silva por dividir comigo a possibilidade e responsabilidade de realizar esse projeto. Você foi sem dúvida muito importante com seus conselhos e olhares cuidadosos para o bom andamento desse experimento em conjunto.

À amiga Aline Martins Cardozo pela colaboração durante todo o desenvolvimento deste projeto. Agradeço pela sua responsabilidade nas suas atividades exercidas, que contribuíram para o projeto como um todo.

À Mayara Zanatta pela colaboração no trabalho da retirada de inúmeros embriões dos grãos de milho. Muito obrigado!

Aos funcionários da Fazenda da Ressacada, Otávio e Nuno, pela dedicação durante o experimento de campo.

Ao Dr. Luciano Campestrini (UFPR) que realizou as leituras em infravermelho das amostras.

Ao Prof. Dr. Pedro Barbetta pela ajuda final na realização das estatísticas (MANOVA).

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin pelas dúvidas sanadas, conversas e conselhos adquiridos ao longo do surgimento dos resultados desse trabalho. Sempre grato!

As amigas, Monique dos Santos e Vivian Almeida pelo companheirismo, paciência, auxílio, conselhos e risadas durante o curso. Vocês já moram em meu coração.

À minha grande amiga mineira Flaviane Malaquias Costa pelo companheirismo de todas as horas. Você é muito especial para mim!

Aos amigos do Salão de Dança, que durante o mestrado também estiveram presentes nos meus momentos de lazer e descanso.

À secretária Bernadete Ribas do Programa de Pós-Graduação pela presença constante e desabafos. Obrigado por me aturar.

A CAPES e a FAPESC pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas, que de uma forma ou outra, com pensamentos positivos, contribuíram para a conclusão deste estudo.

“As populações se diferenciam gradualmente, de geração em geração, até que as espécies que seguiram por um “galho” da árvore da vida não mais pertençam à mesma espécie do “tronco” e de outros “galhos”.”
(Charles Darwin)

LOHN, ANDRÉ FELIPE. **Metaboloma parcial de milho crioulo submetido a diferentes graus de fluxo gênico por cultivares geneticamente modificadas**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

RESUMO

As variedades de milho crioulo são cultivadas e conservadas principalmente por pequenos agricultores, possuindo características intrínsecas que as distinguem das demais variedades. Os riscos são para as variedades crioulas que estão coexistindo com híbridos Geneticamente Modificados (GMs) e não GMs, e mesmo sabendo que não há barreiras biológicas para o fluxo gênico entre as diferentes variedades de milho (híbridas/GMs e crioulas), estas podem existir nas proximidades, e, portanto, ocorrer o fluxo gênico. O objetivo desta dissertação foi estudar os efeitos da presença de transgenes (eventos TC1507 e TC1507 + NK603) por meio de um *screening* inicial dos principais grupos funcionais de grãos inteiros e suas partes (degerminados e embriões), em híbridos isogênicos de milho transgênicos (GM) e não transgênicos (NGM) isolados e associados a populações portadoras de diferentes proporções de *background* genético de variedade crioula Rosado-Rajado (RS). Estas últimas foram geradas para simular contaminações gradativas e recorrentes, proporcionadas pelo pólen dos híbridos sobre a variedade RS por fluxo gênico. Para tanto, foram geradas populações com distintos *backgrounds* genéticos (25, 50 e 75%) entre o milho GM e a sua versão não GM sobre a variedade crioula RS. Inicialmente, foram realizadas confirmações de ausências prévias de fluxo gênico de híbridos GMs sobre a variedade crioula RS, confirmações das identidades dos híbridos GMs e a efetividade dos cruzamentos realizados. Foram comparados os perfis metabólicos de grãos inteiros, degerminados e embriões dos híbridos isogênicos GMs e não GM, da variedade crioula RS e das progênes portadoras de 25%, 50% e 75% de genes de RS, em combinação com cada um dos três híbridos isogênicos, por meio da análise de infravermelho médio com transformada de Fourier por reflectância difusa (DRIFTS) e de estatística multivariada (PCA e agrupamento). As análises dos grupos funcionais carboidratos, proteínas, lipídios e poli(fenóis) formaram agrupamentos dissimilares, dependendo do tecido vegetal analisado e do híbrido isogênico envolvido. Nas análises de carboidratos e proteínas de grãos inteiros, observou-se um efeito gradativo de

distanciamento entre tratamentos, ou seja, as populações com proporção média de genes 25% RS e 50% RS estiveram mais próximas ao genitor GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), nessa ordem, assim como apenas a população 75% RS agrupou-se ao genitor RS. Nas análises de grãos degerminados, os grupos funcionais constituídos pelos carboidratos, proteínas e lipídios não foram bons indicadores para detectar efeito da presença de transgenes, a partir da análise de híbridos isogênicos. Estes grupos funcionais também não foram adequados para acompanhar às mudanças decorrentes das contaminações recorrentes da variedade crioula por pólen de milhos GMs. Os grupos funcionais constituídos pelas proteínas e lipídios em embriões foram satisfatórios para detectar o efeito da presença de transgenes, diferenciando híbridos isogênicos com e sem transgenes, assim como estes em relação à variedade crioula RS. Procedimentos metabolômicos, combinado com análise multivariada, possibilitou um *screening* inicial rápido de milhos GMs e suas contrapartes convencionais, incluindo variedades crioulas contaminadas com pólen GM por fluxo gênico.

Palavras-chave: DRIFTS, grupos funcionais, OGM, Rosado-Rajado, *Zea mays* L.

LOHN, ANDRÉ FELIPE. **Metabolome partial landrace maize submitted to different degrees of gene flow from genetically modified cultivars.** Dissertation (Master of Science) – Program Postgraduate Diploma in Plant Genetic Resources, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, 2014.

ABSTRACT

Maize landrace varieties are grown and maintained mainly by small-scale farmers and possess intrinsic characteristics that distinguish them from other varieties. The risks are that the landraces are coexisting with hybrid genetically modified (GM) and non-GM, and even though there is no biological barriers to gene flow between the different varieties of maize (hybrid / GMs and landraces), these may exist in nearby, and therefore gene flow occur. This work aimed to study the effects of the presence of transgenes (events TC1507 and TC1507 + NK603) through an initial screening of the major functional groups of whole grains and its parts thereof (degerminated and embryos) from isolated isogenic hybrids (GM and non-GM) and associated with populations that carry different proportions of genetic background of the landrace Rosado-Rajado (RS). Thus, populations with different genetic *backgrounds* were generated (25%, 50% and 75% RS genes) through intercrossing the GM hybrids and its non-GM version with the variety RS. Previous absences of gene flow from GM hybrids on the variety RS were performed as well as the identities of GM hybrids and the effectiveness of the performed populations. The metabolic profiles of whole grains, degerminated and embryos of the isogenic hybrids GM and non-GM, variety RS and progenies carrying 25%, 50% and 75% RS genes were compared with each of the three isogenic hybrids through mid-infrared Fourier transform analysis by diffuse reflectance (DRIFTS) and multivariate analysis (PCA and cluster). The analyses of functional groups - carbohydrates, proteins, lipids and poly(phenols) - formed dissimilar groups depending on the analyzed plant tissue and isogenic hybrid. In the analysis of carbohydrates and proteins in whole grain, it was observed a gradual effect of distancing between treatments; thus, populations carrying genes of RS - mean proportion of 25% and 50% - were closer to the parent GMHR (genetically modified – event TC1507 + NK603), as well as only the population 75% RS grouped with the RS parent. In degerminated grain analyses, carbohydrates, proteins and lipids were not good indicators to

detect effect of the presence of transgenes, based on analysis isogenic hybrids. These functional groups also were not proper to follow the changes resulting from recurrent contamination promoted through GM pollen on RS variety. On the other hand, proteins and lipids in embryos were satisfactory functional groups to detect the effect of the presence of transgenes, differentiating isogenic hybrids, as well as these in relation to RS variety. Metabolomic procedures, combined with multivariate analysis enabled a rapid initial screening of GM maize and their conventional counterparts, including landraces, which were contaminated with GM pollen by gene flow.

Keywords: DRIFTS, functional groups, GMO, Rosado-Rajado, *Zea mays* L.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais metabólitos presentes nos grãos de milho com suas respectivas bandas características por infravermelho.....	55
Tabela 2: Tratamentos do experimento no esquema parcelas subdivididas.....	72
Tabela 3: Iniciadores utilizados na detecção dos cruzamentos.....	73
Tabela 4: MANOVA dos blocos com valores da estatística de <i>Pillai</i> e probabilidade do teste F.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia do grão de milho e suas partes.....	46
Figura 2: Vetor - Plasmídeo PHP8999 - do evento TC1507.....	50
Figura 3: Vetor - Plasmídeo PV-ZMGT32 - do evento NK603.....	51
Figura 4: Esquema do espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier.....	53
Figura 5: Gel de agarose (2%) corado com SYBR Green para a confirmação dos cruzamentos envolvendo o evento TC1507 (alvo <i>Pat</i>) - que amplifica banda de 279 pb.....	76
Figura 6: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm^{-1}) de farinhas de grãos inteiros de milho de todos os genótipos.....	79
Figura 7: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de todos os genótipos. RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507), GMHR (Geneticamente modificada – evento TC 1507 + NK 603), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS), T9 (25% GMH + 75% RS), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	80
Figura 8: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de todos os genótipos. Coeficiente de correlação cofenética = 0,79.....	81
Figura 9: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica	

não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK 603). 82

Figura 10: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9891. 83

Figura 11: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). 84

Figura 12: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8335. 85

Figura 13: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). 86

Figura 14: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC 1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,71. 87

Figura 15: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). 88

Figura 16: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR

(Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9472. 89

Figura 17: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). 91

Figura 18: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9554. 92

Figura 19: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). 93

Figura 20: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,71. 94

Figura 21: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). 95

Figura 22: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7486. 96

Figura 23: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica

geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). 97

Figura 24: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9797. 98

Figura 25: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). 100

Figura 26: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9554. 101

Figura 27: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). 102

Figura 28: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7055. 103

Figura 29: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). 104

Figura 30: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-

Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9613.	105
Figura 31: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	106
Figura 32: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9573.	107
Figura 33: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).	109
Figura 34: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8135.	110
Figura 35: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).	111
Figura 36: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9505.	112

Figura 37: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).	113
Figura 38: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8747.....	114
Figura 39: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 +NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	115
Figura 40: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9135.....	116
Figura 41: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm ⁻¹) de farinhas de grãos degerminados de milho de todos os genótipos.	117
Figura 42: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm ⁻¹) de farinhas de grãos degerminados de milho de todos os genótipos. RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507), GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK 603), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS), T9 (25% GMH + 75% RS), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	118
Figura 43: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de todos os genótipos. Coeficiente de correlação cofenética = 0,78.	119

Figura 44: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).....	120
Figura 45: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8385.	121
Figura 46: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).	122
Figura 47: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9341.....	123
Figura 48: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).124	
Figura 49: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9124.	125
Figura 50: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).....	126

Figura 51: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7787.....	127
Figura 52: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).....	128
Figura 53: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507+ NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9757.	129
Figura 54: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).	130
Figura 55: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9641.	131
Figura 56: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).132	132
Figura 57: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75%	

GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,727.	133
Figura 58: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	134
Figura 59: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 +NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,985.	135
Figura 60: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).	136
Figura 61: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,63.	137
Figura 62: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).	138
Figura 63: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,64.	139
Figura 64: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹)	

de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).	140
Figura 65: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9323.	141
Figura 66: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	142
Figura 67: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento (TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9224.	143
Figura 68: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm ⁻¹) de farinhas de embriões de milho de todos os genótipos.	144
Figura 69: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de todos os genótipos. RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507), GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS), T9 (25% GMH + 75% RS), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	145
Figura 70: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de todos os genótipos. Coeficiente de correlação cofenética = 0,82.	146

Figura 71: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).....	147
Figura 72: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7911.	148
Figura 73: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).	149
Figura 74: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9542.....	150
Figura 75: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).151	151
Figura 76: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,80.	152
Figura 77: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	153

- Figura 78:** Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8613..... 154
- Figura 79:** Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603)..... 155
- Figura 80:** Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7394. 156
- Figura 81:** Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS)..... 157
- Figura 82:** Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9482. 158
- Figura 83:** Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS)..... 159
- Figura 84:** Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH

+ 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7708.....	160
Figura 85: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).	161
Figura 86: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm ⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8324...	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl – microlitro
 μM – micromolar
 ηg – nanograma
ASCOOPER – Associação das Cooperativas e Associação dos Produtores Rurais do Oeste Catarinense
ASSO – Associação dos Pequenos Agricultores Produtores de Milho Crioulo Orgânico e Derivados
Bt – *Bacillus thuringiensis*
CCA – Centro de Ciências Agrárias
 cm^{-1} – centímetro inverso
COOPERAL – Cooperativa dos Agricultores Familiares de Novo Horizonte
CTAB – Brometo de Cetil Trimetil Amônio
CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNTPs – Nucleotídeos (A, C, G, T)
DRIFTS – Infravermelho Médio com Transformada de Fourier por Reflectância Difusa
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
F – Foward
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
g – giros
g – grama (s)
GM – Geneticamente Modificado
GMH – Variedade Geneticamente modificada – evento TC 1507
GMHR – Variedade Geneticamente modificada – evento TC 1507 + NK 603
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INGM – Variedade Isogênica não geneticamente modificada
 MgCl_2 – Cloreto de Magnésio
mL – mililitro
mM – milimolar
MANOVA – Análise de Variância Multivariada
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPA – Movimento dos Pequenos Agricultores
NaCl – Cloreto de Sódio
NeaBio – Núcleo de Estudos em Agrobiodiversidade
OGM – Organismo Geneticamente Modificado

OMS – Organização Mundial da Saúde
pb – pares de base
PCA – Análise de Componentes Principais
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
R – Reverse
RNA – Ácido Ribonucleico
RNase – Ribonuclease
RS – Variedade crioula Rosado-Rajado
SINTRAF - Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar de Anchieta
Taq – Enzima Taq Polimerase
TAE – Tris, Acetato e EDTA
TIRFAA – Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura
Tris – tris (hidroximetil) aminometano
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UPGMA - Médias aritméticas não ponderadas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
Origem e diversidade do milho.....	43
Importância econômica.....	44
Composição química do grão de milho.....	45
Coexistência entre milho GM e não GM.....	47
Evento TC1507.....	49
Evento NK603.....	50
Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier por reflectância difusa - (DRIFTS).....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
OBJETIVOS	65
Objetivo geral	65
Objetivos específicos	65
Introdução	67
Material e Métodos	69
Material vegetal.....	69
Campo experimental.....	70
Detecção dos cruzamentos.....	72
Extração de DNA.....	73
Condições da PCR.....	74
Preparo das amostras para análise do metaboloma.....	74
Pré-tratamento dos espectros e análises estatísticas.....	75
MANOVA (Análise de variância multivariada).....	76
Resultados e discussão	76

Detecção dos cruzamentos.....	76
MANOVA (Análise de variância multivariada).....	77
Análise de grãos inteiros.....	78
Perfil espectral (3200-500 ondas.cm ⁻¹).....	79
Carboidratos (1200-800 ondas.cm ⁻¹).....	81
Proteínas (1650 – 1400 ondas. cm ⁻¹).....	90
Lipídios (3000 - 2800 e 1750-1700 ondas. cm ⁻¹).....	99
Poli(fenóis) (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹).....	108
Análise de grãos degerminados.....	117
Perfil espectral (3200-500 ondas.cm ⁻¹).....	117
Carboidratos (1200-800 ondas.cm ⁻¹).....	119
Proteínas (1650 – 1400 ondas. cm ⁻¹).....	128
Poli(fenóis) (2000-1700 e 700-500 ondas.cm ⁻¹).....	135
Análise de embriões.....	144
Perfil espectral (3200 - 500 ondas.cm ⁻¹).....	144
Lipídios (3000 - 2800 e 1750-1700 ondas. cm ⁻¹).....	146
Proteínas (1650 – 1400 ondas. cm ⁻¹).....	154
CONCLUSÕES.....	173
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	175
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176
ANEXOS.....	184

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A conservação dos recursos genéticos, incluindo a conservação *on farm* de variedades crioulas e sua utilização sustentável, está no âmbito de fóruns internacionais e nacionais, como na Convenção da Diversidade Biológica de 1992, no Plano de Ação Global elaborado durante a IV Conferência Técnica Internacional para Recursos Genéticos de Plantas em Leipzig-Alemanha, na III Conferência das Partes para a Convenção da Diversidade Biológica, realizada na Argentina, ambas em 1996, e no Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura (TIRFAA), aprovado em Roma em 2001.

De acordo o artigo 8, item g, da Convenção da Diversidade Biológica, deve-se “*estabelecer ou manter meios para regulamentar, administrar ou controlar os riscos associados à utilização e liberação de organismos vivos modificados resultantes, da biotecnologia que provavelmente provoquem impacto ambiental negativo que possa afetar a conservação e a utilização sustentável da diversidade biológica, levando também em conta os riscos para a saúde humana*” (BRASIL, 1994).

A III Conferência das Partes também aprovou a decisão III/11, que reconhece a relação estreita entre agricultura e biodiversidade, bem como a necessidade de desenvolver ações que pudessem mitigar impactos e apontar para o seu uso sustentável (CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 1996), sendo posteriormente detalhada na V Conferência das Partes, realizada em Nairóbi, em 2000, no programa de trabalho específico sobre a agrobiodiversidade (CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2000).

Segundo o TIRFAA, os artigos 4º, 5º e 9º dispõem promover a conservação, prospecção, coleta, caracterização, avaliação e documentação de recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura; a promoção do uso sustentável desses recursos; e sobre o direito dos agricultores sobre esses recursos fitogenéticos, respectivamente (BRASIL, 2008).

Com o objetivo de assegurar a biotecnologia internacionalmente, em 29 de janeiro de 2000, é firmado na cidade de Montreal, Canadá, o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança da Convenção sobre Diversidade Biológica, começando a vigorar, em âmbito internacional, em 11 de setembro de 2003, e nacional, em 22 de fevereiro de 2004. Atualmente, 167 países fazem parte do protocolo (CONVENTION ON

BIOLOGICAL DIVERSITY, 2014) que tem como objetivo geral “assegurar um nível adequado de proteção no campo da transferência, da manipulação e do uso seguro dos organismos vivos modificados (OVMs), resultantes da engenharia genética, que possam vir a ter implicações na conservação e no uso sustentável da diversidade biológica, considerando os riscos à saúde humana e os movimentos transfronteiriços” (BRASIL, 2006).

Conforme o princípio da precaução da Convenção da Diversidade Biológica (BRASIL, 2000), quando houver ameaça de danos graves ou irreversíveis, a ausência de certeza científica absoluta não será utilizada como razão para o adiamento de medidas economicamente viáveis para prevenir a degradação ambiental.

De acordo com a Política Nacional de Biodiversidade, implantado em 2002, com o objetivo da utilização sustentável dos componentes da biodiversidade, deve-se “promover mecanismos e instrumentos que envolvam todos os setores governamentais e não-governamentais, públicos e privados, que atuam na utilização de componentes da biodiversidade, visando que toda utilização de componentes da biodiversidade seja sustentável e considerando não apenas seu valor econômico, mas também os valores ambientais, sociais e culturais da biodiversidade” (BRASIL, 2002).

No âmbito federal, por intermédio da Secretaria da Agricultura Familiar do Ministério do Desenvolvimento Agrário, também tem sido oferecido apoio ao uso, manejo e conservação de variedades crioulas (BRASIL, 2003). Por meio do Cadastro Nacional de Cultivares Tradicionais e Crioulas é possível garantir legalmente a oportunidade de acesso às políticas públicas da agricultura familiar a todos que utilizam sementes crioulas (BRASIL, 2007). Além disso, através do governo brasileiro, em 2012, em conjunto com parceiros nacionais e estaduais, é dado o apoio à organização de bancos comunitários de sementes crioulas, contribuindo, deste modo, para a conservação de recursos genéticos da agrobiodiversidade (MAPA, 2012).

Por outro lado, contrariamente às políticas mencionadas anteriormente, o Brasil concede autorizações para cultivos comerciais de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). O surgimento de OGMs, ou também chamados de transgênicos, ocorreu com a aplicação da tecnologia do DNA recombinante e/ou engenharia genética ao melhoramento de diversas espécies com diferentes propósitos. Essas técnicas permitem o rompimento da barreira sexual entre espécies, e através da utilização de enzimas de restrição e enzimas ligases, recombina-se *in vitro* fragmentos de DNA de espécies diferentes, o que

por meio natural jamais seria possível (COHEN *et al.*, 1973). Portanto, OGMs são definidos como organismos que foram transformados pela introdução e integração de um ou mais genes exógenos pela técnica de engenharia genética, tendo como exemplos de cultivos modificados o milho, a soja, algodão, entre outros. Estas espécies quase que exclusivamente foram desenvolvidas em vários países do mundo para serem resistentes a insetos e tolerantes a herbicidas.

Os cultivos GMs para a alimentação estão liberados no mundo a cerca de 20 anos, mas experimentos e dados concretos com humanos que mostrem seus efeitos prejudiciais à saúde são muito escassos.

Pela grande difusão e adoção dos cultivos geneticamente modificados pelos agricultores, os cultivos de milho não GM (Não Geneticamente Modificado), incluindo variedades crioulas e locais, estão obrigados a coexistir. De acordo com a Resolução Normativa Brasileira nº 4, de 16/08/2007 há distâncias mínimas visando à coexistência entre os diferentes sistemas de produção, que são de 100 de metros entre cultivos ou de 20 metros mais 10 fileiras de milho não GM (BRASIL, 2007). Segundo a própria CTNBio, por meio do Parecer Técnico nº 1.100/2007, admitiu que sob ventos baixos a moderados, estima-se que cerca de 2% do pólen são encontrados a 60 metros, 1,1% a 200 metros, e 0,75-0,5% a 500 metros de distância (BRASIL, 2007).

O isolamento espacial se deve ao fato de o milho ser uma espécie que realiza preferencialmente polinização cruzada, podendo o pólen ser deslocado, principalmente pelo vento, a grandes distâncias (HENRY *et al.*, 2003; SANVIDO *et al.*, 2008; GALEANO *et al.*, 2010). Portanto, as normas de distância mínima de isolamento não garantem a coexistência entre cultivos sem a contaminação do milho não GM.

Na prática, estabelecer limites visando à coexistência entre os diferentes cultivos de milho no Brasil, com a crescente área de cultivo com GM, gera muitos conflitos, pois por lei fica ameaçado o direito dos agricultores em escolher qual o sistema de produção querem adotar. O Brasil possui a segunda maior área cultivada, quando se considera a adoção da tecnologia GM, sendo que está previsto na safra 2013/2014, que o cultivo de milho GM seja plantado em 12,55 milhões de hectares. (JAMES, 2012; CÉLERES, 2013).

Comparando a legislação brasileira e a europeia para os produtos alimentícios orgânicos quanto à tolerância de contaminação por OGMs estas se mostram divergentes. Na Europa o limite de contaminação é de 0,9%, e no Brasil esta tolerância é nula, o que acaba impossibilitando a coexistência no Brasil de cultivos orgânicos e GMs de milho (FERMENT *et al.*, 2009).

Com o avanço do desenvolvimento de alimentos geneticamente modificados, autoridades reguladoras lançam o conceito da equivalência substancial. Ou seja, se um alimento ou ingrediente alimentar derivado dos recentes avanços em biotecnologia for considerado substancialmente equivalente a um alimento ou ingrediente alimentar convencional, aquele alimento poderá ser considerado tão seguro quanto esse. Portanto, para se estabelecer a equivalência substancial, os alimentos derivados dos recentes avanços em biotecnologia devem ser comparados com as espécies ou com os alimentos derivados destas espécies os mais próximos possíveis (FAO/OMS, 1996).

Segundo o artigo 2º, do decreto 4.680, de 24 de abril de 2003 (BRASIL, 2003), o consumidor tem o direito à informação, quando alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal contenham concentrações acima de 1% do produto ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. Nos casos positivos, o produto deverá ser embalado e, no seu rótulo, deverá estar especificado que sua origem é geneticamente modificada.

Visto a existência desta diferença de limites de contaminações para cultivos de milho convencional (até 1%) e orgânico (0%) por GMs, deve-se mencionar que os impactos econômicos decorrentes da contaminação em cultivos convencionais não são menos importantes do que em cultivos orgânicos, não justificando essa distinção entre os limites, tendo esses grãos como matéria-prima base das cadeias produtivas da avicultura e suinocultura.

Variedades crioulas e locais foram desenvolvidas, adaptadas ou produzidas por agricultores familiares, assentados da reforma agrária ou indígenas, possuindo características fenotípicas bem determinadas e reconhecidas pelas respectivas comunidades e que, a critério do MAPA, considerando também os descritores socioculturais e ambientais, não se caracterizam como substancialmente semelhantes às cultivares comerciais (BRASIL, 2003). São variedades de grande importância para a agricultura familiar catarinense e agricultura orgânica pelos seus valores de uso, cultivo e adaptativo, que foram construídos ao longo de gerações como resultado do manejo e uso dos agricultores, bem como das pressões de seleção conferidas pelo ecossistema agrícola dessa região (FERMENT *et al.*, 2009).

Há uma considerável riqueza de variedades crioulas conservadas por agricultores do Oeste de SC (COSTA, 2013; OGLIARI *et al.*, 2007; OGLIARI *et al.*, 2013; VIDAL *et al.*, 2012); em contrapartida, há um desconhecimento do seu valor real e potencial. Isso justifica a preocupação da comunidade científica com os impactos decorrentes da

contaminação por GM, sobretudo dos efeitos que resultam na perda de agrobiodiversidade e da diversidade das variedades crioulas e de seus valores adaptativos, de cultivo, e de uso na alimentação humana.

Os OGMs são cultivados legalmente em escala comercial no Brasil desde 2003, e, em 2008, o milho (FERMENT *et al.*, 2009). Mas a ausência de medidas que assegurem a coexistência das plantas GMs com os cultivos convencionais e orgânicos sem contaminação, embora as normas de biossegurança já estivessem asseguradas por lei desde 2005 (BRASIL, 2005), coloca em risco a integridade da diversidade conservada *in situ - on farm*, desconsiderando o direito dos agricultores de conservarem suas sementes crioulas, excluindo qualquer outra opção tecnológica diferente da transgenia.

A hipótese desta dissertação é que o fluxo gênico recorrente em variedades crioulas por milho GM possa provocar alterações não intencionais devido à presença do transgene no *background* genético crioulo, e assim, o metaboloma dos grãos estaria em risco com a perda de sua identidade.

Com os cultivos GMs, os possíveis efeitos inesperados podem estar relacionados às alterações em genes não alvos, ou a alterações metabólicas dos produtos de transcrição dos transgenes, podendo interagir regulando outros genes ou outras rotas bioquímicas (CELLINI *et al.*, 2004; RICHROCH *et al.*, 2011).

O metaboloma é o conjunto de todos os metabólitos que são produzidos e/ou modificados por um organismo (VILLA-BÔAS & GOMBERT, 2006). Caracterizar o metaboloma dos grãos das variedades crioulas de milho do Oeste de SC é de suma importância pela sua riqueza de diversidade, sobretudo pela falta de estudos comparativos do metaboloma entre plantas NGMs e GMs, que não sejam financiadas pelas empresas biotecnológicas. Além disso, também são inexistentes estudos que envolvem comparações com variedades crioulas simulando contaminações recorrentes que ocorrem por fluxo gênico entre NGMs e GM. Ambos os argumentos justificam a realização de uma abordagem de análise inicial do efeito do *background* genético na expressão dos transgenes inseridos em variedades crioulas, apresentando uma possível ameaça ao princípio da equivalência substancial.

A presente dissertação está estruturada da seguinte maneira: (i) uma primeira parte que contém uma revisão bibliográfica acerca do assunto, como as premissas relevantes para um completo entendimento e posterior discussão; (ii) uma segunda parte que contém um capítulo dedicado à análise dos perfis espectrais de infravermelho médio com transformada de Fourier por reflectância difusa (DRIFTS) de grãos

inteiros, degerminados e embriões oriundos de populações de milho produzidas com o intuito de simular a contaminação em variedade crioula por transgenes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL: Casa Civil - **Decreto nº 4.680, de 24/04/2003**, 2003.

BRASIL: Casa Civil – **Lei de Biossegurança nº 11.105, de 24/03/2005**, 2005.

BRASIL: Casa Civil - **Lei nº 10.831, de 23/12/2003**, 2003.

BRASIL: MAPA. **Lei nº 10.711, de 05/08/2003**, 2003.

BRASIL: MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Parecer Técnico nº1.100**, 2007.

BRASIL: MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Resolução Normativa nº 4, de 16/08/2007**, 2007.

BRASIL: MCTI - **Decreto Legislativo nº 2, de 03.02.1994**, 1994.

BRASIL: MDA. **Portaria nº 51, de 03/10/2007**, 2007.

BRASIL: MMA - **A Convenção sobre Diversidade Biológica – CDB**, 2000.

BRASIL: MMA. **Decreto nº 4.339, de 22/08/2002**, 2002.

BRASIL: MRE - **Decreto nº 5.705, de 16/02/2006**, 2006.

BRASIL: MRE - **Decreto nº 6.476, de 05/06/2008**, 2008.

CÉLERES: **Informativo biotecnologia**. 2013. Disponível em: <<http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf>>. Acesso em: 20/03/2014.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chemistry Toxicology**, v. 42, p. 1089- 1125, 2004.

COHEN, N.C.; CHANG, C.Y.; BOYER, H.W.; et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc. Nat. Acad. Sci USA**, v.70, n.11, p. 3240-3244, 1973.

CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA. **COP III Decision III/11: Conservation and sustainable use of agricultural biological diversity**. 1996. Disponível em: <<http://www.cbd.int/decision/cop/default.shtml?id=7107>>. Acesso em: 01/09/2014.

CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA. **COP V Decision V/5: Agricultural biological diversity: review of phase I of the programme of work and adoption of a multi-year work programme**. 2000. Disponível em: <<http://www.cbd.int/decision/cop/default.shtml?id=7147>>. Acesso em: 01/09/2014.

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY: **Party to the Cartagena Protocol on Biosafety**. 2014. Disponível em: <<http://bch.cbd.int/protocol/e-doc/?pressRelease=97912>>. Acesso em: 25/08/2014.

COSTA, F. M. Diversidade genética e distribuição geográfica: uma abordagem para a conservação *on farm* e *ex situ* e o uso sustentável dos recursos genéticos de milho do Oeste de Santa Catarina. **Dissertação**. Recursos Genéticos Vegetais. UFSC. 2013.

FAO/OMS: Biotechnology and food safety. In: Report FAO/OMS, **FAO Food Nutrition Paper**, 61. Roma. 31p., 1996.

FERMENT, G.; ZANONI, M.; BRACK, P.; et al. **Proposta de Revisão da Resolução Normativa nº4 da CTNBio**. Brasília: MDA, 2009.

GALEANO, P.; DEBAT, C. M.; RUIBAL, F.; et al. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. **Environ. Biosafety Res.**, v. 9, p. 147-154, 2010.

HENRY, C.; MORGAN D.; WEEKES R.; et al. (2003). Farm scale evaluations of GM crops: monitoring gene flow from GM crops to non-GM equivalent crops in the vicinity: part I: forage maize. **DEFRA report EPG 1/5/138**. Disponível em: < <http://cib.org.br/wp->

content/uploads/2011/10/estudos_cientificos_ambiental_14.pdf>.
Acesso em: 04/02/2014.

JAMES, CLIVE. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. **ISAAA Brief**. nº 44. ISAAA: Ithaca, NY.

MAPA: **Sementes crioulas promovem a agrobiodiversidade**. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2012/08/sementes-crioulas-promovem-a-agrobiodiversidade>>. Acesso em: 01/09/2014.

OGLIARI, J. B.; ALVES, A. C.; KIST, V.; et al. Análise da diversidade genética de variedades locais de milho. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, p. 191-195, 2007.

OGLIARI, J. B.; KIST, V.; CANCI, A. The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil. In: DE BOEF, W.; PERONI, N.; SUBEDI, A.; et al. (Org.). **Community Biodiversity Management. Promoting Resilience and the Conservation of Plant Genetic Resources**. 1ª ed., Abingdon: Routledge, p. 265-271, 2013.

RICROCH, A. E.; BERGÉ, J. B.; KUNTZ, M. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. **Plant Physiology**, v. 155, nº 4, p. 1752-1761, 2011.

SANVIDO O.; WIDMER F.; WINZELER M.; et al. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. **Transgenic Res.**, v. 17, p. 317-335, 2008.

VIDAL, R. SILVA, N. C. A.; COSTA, F. M.; et al. Análise da diversidade genética e conservação de variedades de milho crioulo no Oeste de Santa Catarina. **Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**. Belém/Pará, 2012.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biociência**, v. 16, nº 36, p. 36-41, 2006.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Origem e diversidade do milho

O milho é uma gramínea da família *Poaceae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*, ssp. *mays*. É monóica anual cultivada em diversos países para ração animal, silagem, alimentação humana, xarope, óleo vegetal, entre outros usos (PATERNIANI & CAMPOS, 2005; FORNASIERI FILHO, 2007).

O genoma do gênero *Zea* encontra-se organizado em 20 cromossomos ($2n=20$), sendo alotetraplóide com regiões de cópias duplicadas (PATERNIANI & CAMPOS, 2005; CANDELA & HAKE, 2008).

O centro de origem do milho é o México, uma vez que, nessa região, foi encontrado um maior número e diversidade das espécies ancestrais, teosinte e *Tripsacum*, e há indícios de que sua domesticação tenha ocorrido há 8000 anos. As antigas civilizações dessa região, e em países vizinhos, já utilizavam o milho na alimentação, desenvolvendo inúmeras raças e variedades com ampla diversidade de cores, tamanhos e formas de grãos e espigas, adaptando-se há distintos ecossistemas (MACHADO & PATERNIANI, 1998).

Com a grande diversidade de raças e variedades, no mundo, estima-se 150 espécies e 300 raças de milho (BROWN & GOODMAN, 1976). Todavia, o Brasil conta com boa parte dessa diversidade, cujas raças são descritas por Paterniani & Goodman (1977).

O Oeste de Santa Catarina é conhecido pela riqueza de variedades crioulas de milho, conservadas por agricultores, em suas unidades de produção familiares (OGLIARI *et al.*, 2007; OGLIARI *et al.*, 2013).

Os municípios de Anchieta e Guaraciaba/SC apresentam uma importante diversidade genética de milho comum, tanto por características fenotípicas, quanto com base nos nomes atribuídos pelos agricultores. Uma análise realizada nos municípios de Anchieta e Guaraciaba/SC permitiu identificar com base no nome, 55 variedades crioulas diferentes de milho comum, sendo que 37 foram classificadas quanto ao número de indicações de cultivo como raras e 18 como amplas (VIDAL *et al.*, 2012). No trabalho de Costa (2013), foram identificadas 155 variedades crioulas de milho comum, situadas em 100 propriedades agrícolas e distribuídas em 23 comunidades rurais do município de Anchieta/SC. No total, foram verificadas 224 preferências de usos, tendo maior citação dentro das categorias Agronômica, Gastronômica, Adaptativa e Econômica. A soma destas

categorias foi de 90,54% dos usos, e 36,77% das variedades identificadas como ‘multiusos’.

Segundo Ogliari *et al.* (2007), 23 variedades locais de milho, procedentes dos municípios catarinenses de Anchieta e Palma Sola, foram analisadas para um total de 19 variáveis, onde 17 apresentaram diferenças significativas, indicando a presença de diversidade fenotípica desses recursos genéticos.

Segundo a legislação brasileira, a cultivar local, tradicional ou crioula é a variedade desenvolvida, adaptada ou produzida por agricultores familiares, assentados da reforma agrária ou indígenas, com possuem características fenotípicas bem determinadas e reconhecidas pelas respectivas comunidades e que, a critério do MAPA, considerando também os descritores socioculturais e ambientais, não se caracterizam como substancialmente semelhantes às cultivares comerciais (BRASIL, 2003).

Importância econômica

O milho (*Zea mays* L.) constitui, junto com o arroz e o trigo, um dos três cereais principais do mundo, no que se refere à área plantada e à produção, e é caracterizado pelas diversas formas de utilização, desde a alimentação animal, até a indústria de alta tecnologia (FAO, 2013; DUARTE, 2012).

No mundo, safra de 2012/2013, o cultivo do milho foi em uma área de 177,58 milhões de hectares, com uma produção total de 868,61 milhões de toneladas e uma produtividade média de 4,89 t ha⁻¹. Nessa mesma safra, o Brasil continua ocupando o terceiro lugar em área plantada, com 15,8 milhões de hectares, ficando atrás dos Estados Unidos e China, com uma produção total de 81,5 milhões de toneladas e produtividade média de 5,16 t ha⁻¹. Na safra 2013/2014, a previsão é que o país tenha cultivado milho geneticamente modificado em 12,55 milhões de hectares, ou 81,5% da área total (CÉLERES, 2013; USDA, 2014).

Segundo estimativa de Céleres (2013), Santa Catarina foi o quinto estado da federação que mais produziu milho na safra de verão 2013/2014, com 3,45 milhões de toneladas, numa área de 500 mil hectares, com produtividade média de 6,9 t ha⁻¹. Desse total produzido, a área cultivada com milho geneticamente modificado foi de 440 mil hectares. Portanto, cerca de 88% do milho produzido em Santa Catarina, na safra 2013/2014, foram oriundos de cultivos geneticamente

modificados. Segundo Costa (2013), um Censo da Diversidade realizado no município de Anchieta/SC demonstrou que a área cultivada por milho GM correspondeu a 33,41% da área total cultivada por milho no município. No município de Guaraciaba/SC, do número total dos campos que cultivam milho, 31,21% é de milho GM (SILVA, *dados não publicados*), estando esses municípios muito aquém das publicações oficiais para o estado de SC.

O estado catarinense é caracterizado pela agricultura familiar, que de acordo o último Censo Agropecuário do IBGE (IBGE, 2006), 88% dos estabelecimentos catarinenses que produzem milho são de agricultura familiar e representam 76% de toda a produção estadual. Trata-se de uma cultura agrícola de fundamental importância para a economia do estado, interferindo diretamente na cadeia produtiva da avicultura, suinocultura e pecuária de leite e corte (ASCOLI & ORLOWSKI, 2008).

No município de Anchieta/SC, o milho produzido com as sementes crioulas é voltado quase que exclusivamente para atender às necessidades na propriedade, através da alimentação da família, animal e ao consumo de milho verde. Entretanto, algumas variedades são utilizadas especificamente para o consumo humano, na forma de farinha, canjica e milho verde, e outras com relação ao seu valor adaptativo de resistência a pragas e doenças. Há também algumas variedades que são destinadas a comercialização de grãos e sementes, e para a doação ou troca (COSTA, 2013). A Associação dos Pequenos Agricultores Produtores de Milho Crioulo Orgânico e Derivados (ASSO) possui um moinho de pedra para processar o milho e comercializar localmente e regionalmente a farinha sob a marca *Tradição Crioula*, havendo também a possibilidade da fabricação de bolachas e biscoitos orgânicos e canjica. Alguns agricultores vendem sementes de milho diretamente ao Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar de Anchieta (SINTRAF/Anchieta), que atua como importante fonte primária de sementes crioulas para os agricultores do município e região (VOGT *et al.*, 2007).

Composição química do grão de milho

O grão de milho é formado por quatro principais estruturas: endosperma, gérmen, pericarpo e ponta, diferenciando entre si na composição química e organizacional dentro do grão (Figura 1). O

endosperma corresponde à maior parte do grão, e é composto basicamente de amido (amilose e amilopectina), proteínas de reserva (zeínas), e localizados na camada de aleurona e endosperma vítreo os carotenóides (zeaxantina, alfa e beta carotenos, luteína e criptoxantina). O gérmen (embrião) é a parte viva dos grãos, sendo composto basicamente de lipídios, minerais, proteínas e açúcares. O pericarpo tem como função básica de proteção, com polissacarídeos do tipo hemicelulose e celulose. A ponta é responsável pela conexão do grão com o sabugo, e é composta de material lignocelulósico. (PAES, 2006; ABIMILHO, 2014).

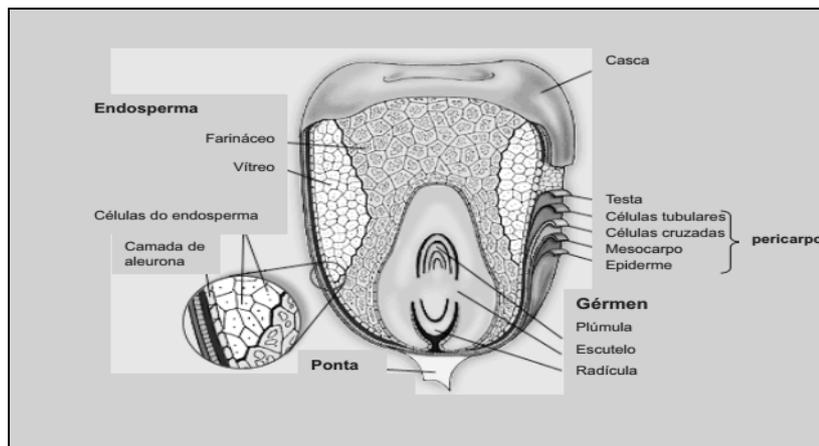


Figura 1: Anatomia do grão de milho e suas partes. Fonte: Adaptado de Britannica (2006), citado por Paes (2006).

A composição média dos grãos de milho é 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% fibra e 4% de óleo. Entretanto, existem no mercado milhos com alto teor de óleo (6 a 7,5%), alto teor de proteína (>12%), melhor qualidade protéica e altos teores de amilose, ácido graxo oléico e aminoácidos (PAES, 2006).

As composições químicas dos grãos podem variar de acordo com a genética do material, tipo de solo cultivado, adubação, condições climáticas durante o desenvolvimento da cultura.

Segundo Kuhnen (2007), 26 variedades crioulas e locais de milho de Anchieta/SC analisadas obtiveram uma variação no total das frações de amilose e amilopectina de $66,1\text{g}\cdot 100^{-1}$ a $41,1\text{g}\cdot 100^{-1}$, sendo tais valores superiores aos das cultivares comerciais analisadas. No teor total

de proteínas, houve diversidade entre as variedades, com destaque em valor nutricional o Pixurum 6, Pixurum 5 e MPA1.

De acordo com o trabalho de Marsaro Júnior *et al.* (2007), os teores de cinzas, lipídios e proteínas de grãos de milho foram menores na ausência de adubação. Entretanto, teores de carboidratos foram maiores neste sistema, e combinando adubação orgânica e mineral o teor de proteínas nos grãos foi maior.

A aplicação de *Pseudomonas fluorescens* via inoculação incrementou os teores de P e K dos grãos de milho, independentemente dos níveis de adubação. Os teores dos nutrientes, de proteína e de cinzas dos grãos de milho não foram influenciados pelos níveis de adubação mineral, com exceção do Cu, que aumentou com a elevação dos níveis de adubação (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Segundo Puga *et al.* (2013), solos tropicais, em geral, apresentam baixa quantidade de zinco (Zn), e sua deficiência é reconhecida com um problema nutricional mundial na produção de grãos. O zinco aplicado no solo pelo método de “sulco na semeadura” promoveu maiores teores de total de hidratos de carbono, amido e proteína nas culturas do milho e sorgo.

Na cultura do milho, quando a temperatura é superior a 35°C, ocorre diminuição da atividade da redutase do nitrato, podendo alterar o rendimento e a composição protéica dos grãos (LANDAU *et al.*, 2009).

Como visto anteriormente na literatura citada, há diversas fontes de variação na composição química dos grãos. Entretanto, no que se refere à presença de transgenes, os pareceres técnicos das empresas biotecnológicas anunciam que há equivalência de composição entre a linhagem geneticamente modificada e a convencional, ou seja, a planta modificada exibe a mesma composição, em macro e micronutrientes, apresentada pelo vegetal que não apresenta o transgene (COCKBURN, 2002).

Coexistência entre milho GM e não GM

As fontes de contaminações de sementes e de lavouras não geneticamente modificadas podem ocorrer por vias biológicas (pólen e dispersão de sementes), físicas (mistura de sementes em máquinas, caminhões, durante o transporte, armazenamento e troca de sementes entre agricultores) e por meio do mercado (dificuldades e falhas de

identificação e segregação de cargas). Todavia, os agricultores têm a possibilidade e o direito de escolherem entre o modo de produção a adotar (convencional ou orgânico), assim como os consumidores tem o direito de escolherem alimentos livres de contaminação por OGMs. Deste modo, as normas de coexistência editada na Resolução Normativa nº 4 da CTNBio, de 16 de agosto de 2007, deveriam impedir as contaminações genéticas de híbridos, variedades convencionais de polinização aberta ou variedades crioulas, tradicionais e locais destinadas às cadeias convencionais, orgânicas ou agroecológicas (FERMENT *et al.*, 2009).

Segundo Ferment *et al.* (2009), a liberação de cultivares transgênicas ao meio ambiente acarretará contaminações genéticas por fluxo de pólen, sementes ou mistura de sementes, sendo que a maioria dos cultivos não geneticamente modificados (GMs) será contaminada, num certo índice, por genes de cultivos de plantas transgênicas vizinhas, à medida que os cultivos com variedades biotecnológicas se expandirem.

Como já abordado, as normas de distância mínima de isolamento para cultivos geneticamente modificados são 100 metros sem bordadura, ou 20 metros com bordadura. Segundo a própria CTNBio, por meio do Parecer Técnico nº 1.100/2007, admitiu que sob ventos baixos a moderados, estima-se que cerca de 2% do pólen são encontrados a 60 metros, 1,1% a 200 metros, e 0,75-0,5% a 500 metros de distância. Portanto, as normas de distância mínima de isolamento não garantem a coexistência entre cultivos.

O fluxo gênico por hibridação é a transferência de material genético entre organismos da mesma espécie, que será influenciado pelo período e tempo de florescimento das plantas; distância entre o doador e o receptor de pólen; tamanho das populações dos doadores e receptores; a localização e a disposição das fontes de pólen; as condições climáticas; presença de insetos polinizadores; tamanho, o peso e a viabilidade do pólen; genótipos e a compatibilidade do sistema reprodutor das plantas geneticamente modificadas e variedades locais e crioulas; as taxas de sobrevivência e a eficiência reprodutiva dos híbridos e das progênies obtidas por retrocruzamentos e recombinações cromossômicas após fecundação (FERMENT, 2010; EASTHAM & SWEET, 2002; CHÉVRE *et al.*, 1999). Segundo Holst-Jensen *et al.* (2006), vários são os ciclos de retrocruzamentos necessários para a incorporação do gene exógeno em variedades locais.

Inúmeros são os estudos que apontam, que a dispersão do pólen do milho, vai além do limite de isolamento preconizado pela CTNBio e

que a dispersão de aproximadamente 1,5% do pólen total emitido por um pé de milho a uma distância de até 200 metros (EASTHAN & SWEET, 2002; STEVENS *et al.*, 2004; LUNA *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2004).

De acordo com um diagnóstico preliminar realizado por Cordeiro *et al.* (2008), em Anchieta/SC, revelou-se que não há possibilidade de coexistência entre os sistemas de cultivo de milho GM e não GM na região.

Galeano *et al.* (2010) detectou contaminações a distâncias de mais de 330 metros do cultivo geneticamente modificado, onde em um dos casos, a distância era de 100 metros, com uma barreira de eucalipto de 30 metros.

No Brasil, no estado do Paraná, Riesemberg & Silva (2009) detectaram contaminação em lavouras convencionais por cultivos geneticamente modificados.

No México, centro de origem do milho, e onde o milho transgênico não foi liberado, registrou-se contaminações em variedades locais cultivadas por pequenos produtores (ORTIZ-GARCIA *et al.*, 2005; QUIST & CHAPELA, 2001, 2002).

Segundo Bitocchi *et al.* (2009), os resultados das análises da estrutura da população, da diversidade e do desequilíbrio de ligação indicaram nível variável e quantidade significativa de introgressão de variedades híbridas modernas em variedades crioulas recentes da Itália.

Evento TC1507

O evento TC1507, tecnologia *Herculex*[®] I, desenvolvido pela empresa Dow AgroSciences, em conjunto com a Mycogen & Pioneer, está presente na cultivar BG7060H. A cultivar BG7060HR, além de possuir o evento TC1507, também possui o evento NK603, tecnologia *Roundup Ready*[®] 2, desenvolvido pela Companhia Monsanto. As cultivares híbridas BG7060H e BG7060HR, bem como sua versão isogênica não geneticamente modificada (BG7060), foram todas desenvolvidas pela Biogene-Pioneer e são alvo de estudo nesse projeto (CERA, 2010).

As linhagens modificadas pelo evento TC1507 são resultado da introdução dos genes *CryIF* e *Pat* ao milho parental “*Hi-II*”, os quais conferem resistência a insetos lepidópteros (*Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda*) e tolerância ao Glufosinato de Amônio, respectivamente. O gene *CryIF* foi isolado de uma bactéria comum do

solo (*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*). Este gene expressa a proteína *CryIF*, uma delta-endotoxina, que após se ligar ao intestino médio dos insetos, poros são formados interrompendo o fluxo de íons, provocando a paralisia e morte do intestino devido a septicemia bacteriana. O gene *Pat* foi isolado do fungo *Streptomyces viridochromogenes*. Este gene codifica a produção da enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (Pat), a qual é responsável pela tolerância de plantas ao herbicida Glufosinato (ingrediente ativo fosfinotricina), utilizado no controle de plantas espontâneas na cultura do milho. A enzima Pat converte a L-fosfinotricina, em uma forma inativa, e que, na sua ausência, inibe a enzima glutamina sintetase, que resulta na redução da produção do aminoácido glutamina e acúmulo de níveis letais de amônia em plantas suscetíveis (CERA, 2010).

Para a introdução do evento TC1507, foi utilizado o método de transformação de aceleração de micropartículas com o plasmídeo PHP8999. Nesse evento, há apenas uma cópia do gene *Pat*, utilizando-se do promotor 35S como regulador da transcrição (CERA, 2010).

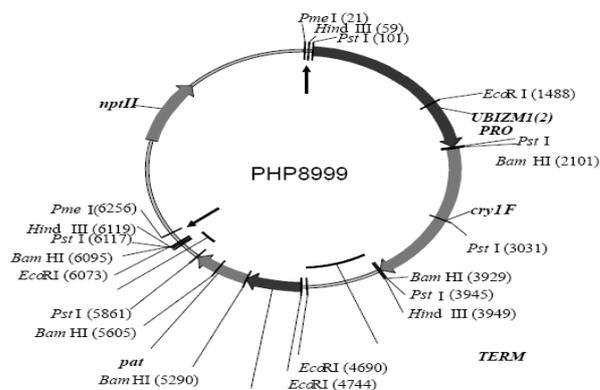


Figura 2: Vetor - Plasmídeo PHP8999 - do evento TC1507 (DONG *et al.*, 2008).

Evento NK603

O evento NK603, tecnologia *Roundup Ready*®, desenvolvido pela Companhia Monsanto, foi liberado pela primeira vez para plantio e comercialização nos Estados Unidos, no ano de 2000, e hoje sua

comercialização é permitida, em muitos países. O milho NK603 expressa a proteína CP4 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS), tolerante ao glifosato, sendo uma das muitas proteínas EPSPS encontradas na natureza, as quais são produzidas por plantas, bactérias e fungos, mas não por animais, uma vez que estes não possuem a via metabólica para a sua síntese. O organismo doador do gene, *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4, é uma bactéria comumente encontrada no solo, causadora de galhas em plantas suscetíveis (BRASIL, 2008; CERA, 2010).

O gene *cp4 epsps*, que codifica uma forma tolerante ao glifosato da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), foi isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 e inserido no genoma do milho através do método de aceleração de partículas (biobalística). O modo de ação do glifosato, causando a morte de plantas, acontece devido a sua capacidade de bloquear a atividade da enzima alvo (EPSPS), pertencente à via biossintética dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano. Assim, as células de plantas que expressam a proteína CP4 EPSPS continuam produzindo os aminoácidos aromáticos essenciais ao seu metabolismo mesmo na presença do glifosato (BRASIL, 2008).

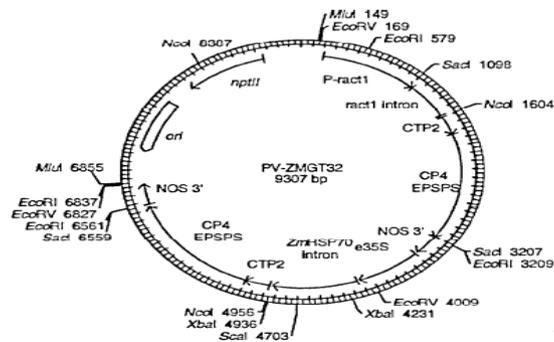


Figura 3: Vetor - Plasmídeo PV-ZMGT32 - do evento NK603 (DONG *et al.*, 2008).

Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier por reflectância difusa - (DRIFTS)

A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade para o químico orgânico está situada no infravermelho médio, entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , onde a radiação infravermelha converte-se, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de vibração molecular. O processo também é quantizado, porém o espectro vibracional aparece como uma série de bandas em vez de linhas, pois cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

As intensidades das bandas podem ser expressas como transmitância (T) ou absorbância (A). A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorbância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância, ou seja, $A = \log_{10}(1/T)$. Os químicos orgânicos costumam usar termos semiquantitativos (F = forte, m = médio, f = fraco) para indicar as intensidades (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

A espectroscopia de infravermelho é o estudo da interação de luz infravermelha com a matéria. Quando um feixe de luz infravermelha é dirigido para uma amostra, os comprimentos de onda absorvidos são dependentes das vibrações moleculares da substância. Assim, com base na absorvência de infravermelhos de uma amostra, pode-se determinar quimicamente e estruturalmente uma amostra (GLASSFORD *et al.*, 2013).

Os espectrômetros de infravermelho modernos são geralmente os espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), onde os sinais do detector destes espectrômetros estão relacionados com uma transformação de Fourier do espectro medido. O coração de um espectrômetro FTIR é um interferômetro, como o interferômetro Michelson ilustrado na figura 4, havendo um espelho fixo e outro móvel. Este último gera uma diferença do trajeto óptico variável entre duas vigas, que dá um sinal de detector, que contém a informação espectral. A luz emitida a partir da fonte de luz é dividida por um divisor de feixe, sendo cerca de metade do que é refletida para o espelho fixo é refletida de volta para o separador de feixe, onde cerca de 50% passa a alcançar o detector (setas pretas da fig. 4). A outra metade da intensidade de luz inicial que passa o divisor de feixe no seu primeiro

momento é refletida pelo espelho móvel de volta para o separador de feixe, onde 50% são refletidos em direção ao detector (setas cinza da fig. 4). Quando os dois feixes recombinam eles interferem e haverá interferência construtiva ou destrutiva, dependendo da diferença de trajeto óptico d . O instrumento mede a intensidade da luz em relação à posição do espelho móvel e este é chamado de interferograma, ou seja, é a transformada de Fourier do espectro. Todavia, uma segunda transformada de Fourier realizada por um computador converte os dados medidos em volta de um espectro. Assim, no total, com a FTIR há duas transformações de Fourier: um pelo interferômetro, e outra por um computador (BARTH, 2007).

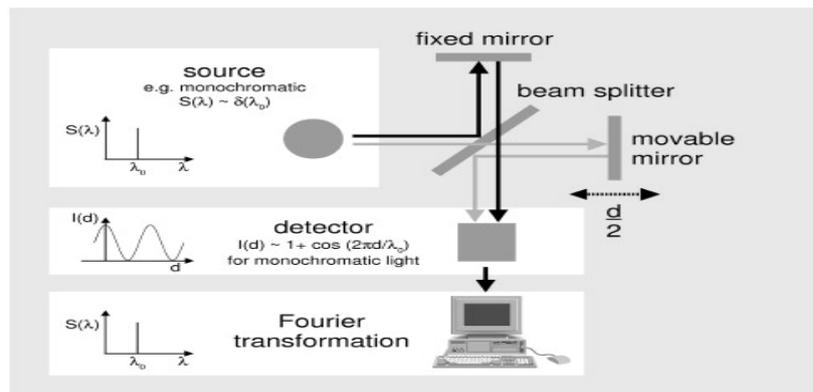


Figura 4: Esquema do espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier. Fonte: Barth (2006) citado por Barth (2007).

Os recentes avanços na instrumentação FT-IR (*Fourier transform infrared spectroscopy*), juntamente com o desenvolvimento de análise multivariada de dados resultou em um aumento de aplicações da espectroscopia do infravermelho médio nos estudos de segurança alimentar, com o controle de qualidade do produto final, processo e autenticidade (KAROUI *et al.*, 2010).

A FT-IR é uma técnica espectroscópica vibracional que permite o estudo da composição química e estrutura molecular de alimentos heterogêneos e materiais biológicos (HOLSE *et al.*, 2011). Este método exige quantidades pequenas de amostra (mg), secas ou molhadas, sendo não destrutivo (MAURÍCIO-IGLESAIS *et al.*, 2009).

A espectroscopia de reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier - DRIFTS (*Difuse Reflection Infrared Fourier*

Transform Spectroscopy) - é um modo efetivo de se obter espectros infravermelhos diretamente de amostras pulverizadas com um mínimo de preparação da amostra. Além de economizar tempo na preparação da amostra, permite a aquisição de dados convencionais de infravermelho em amostras que não foram alteradas significativamente em relação à sua forma original (SKOOG *et al.*, 2002).

Na técnica de reflectância difusa, a energia que penetra em uma partícula ou em um aglomerado de partículas é refletida em todas as direções, sendo aplicada principalmente para superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (moído). Assim, a reflectância difusa mede a razão entre a intensidade da luz refletida a partir da amostra, ou seja, a porção de radiação que penetra na superfície da amostra e não é absorvida, mas refletida, e a intensidade da luz incidente. O mecanismo de funcionamento da energia radiante ocorre com a penetração do feixe de luz e interação com as substâncias da amostra e, após absorção parcial e múltiplos espalhamentos, esta energia retorna à superfície. É importante salientar que a energia em reflectância difusa é atenuada após entrar em contato diversas vezes com as partículas da amostra, fornecendo muitas informações analíticas (CORDEIRO, 2006).

Na tabela 1 estão apresentados os principais metabólitos presentes nos grãos de milho com suas respectivas bandas características por infravermelho, baseados nos citados trabalhos científicos.

Tabela 1: Principais metabólitos presentes nos grãos de milho com suas respectivas bandas características por infravermelho.

Metabólitos	Compostos	Banda (onda.cm ⁻¹)	Grupos funcionais	Referências
Carboidratos	Amido Amilose/ Amilopectina Amilose Amilopectina	1200 - 800	Polissacarídeos	CERNÁ <i>et al.</i> (2003); SIVAM <i>et al.</i> (2013)
		1200 - 950	C-O-C de polissacarídeos	GIORDANO <i>et al.</i> (2001); KUHNEN (2007)
		1190 - 761	Hidratos de carbono	SANTONI & PIZZO (2013)
		1020-1010	C-C; C-O	SIVAM <i>et al.</i> (2013)
		1150-1080		SCHULZ & BARANSKA (2007)
		941; 868; 477		UARROTA (2011)
		~994		KUHNEN (2007)
1018				
997				
Lipídios		3000-2800	C-H em cadeias de acilo	PISTORIUS <i>et al.</i> (2009); HERRERO <i>et al.</i> (2012)
		~1740	Éster C=O	PISTORIUS <i>et al.</i> (2009); SIVAM <i>et al.</i> (2013)
Proteínas		~ 1650	Amida I (along C=O)	CARBONARO <i>et al.</i> (2008); PISTORIUS <i>et al.</i> (2009); HERRERO <i>et al.</i> (2012)
		1680 - 1630		SUBIRADE <i>et al.</i> (1998); BONWELL & WETZEL (2009); SANTONI & PIZZO (2013)
		~1530	Amida II (flexão N-H)	PISTORIUS <i>et al.</i> (2009)
		1650 - 1500	Amida I e II	CARBONARO <i>et al.</i> (2008); SANTONI & PIZZO (2013)
		1231	Amida III (flexão oposta N-H)	BARTH (2007)
Fenólicos	Flavonóides	2000-1700 e 900-690; 633	Anéis aromáticos	SILVERSTEIN (1994); LAMBERT (2001); XU <i>et al.</i> (2005); KUHNEN (2007)
		900-500		SCHULZ & BARANSKA (2007)
Terpenos	β-caroteno Luteína	~1524; 1157; 1004		SCHULZ & BARANSKA (2007)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO – **Associação Brasileira das Indústrias do Milho**. 2014. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/milho>>. Acesso em: 20/03/2014.

ASCOLI, L.; ORLOWSKI, R. F. O déficit entre a produção e consumo de milho em Santa Catarina com ênfase na região oeste catarinense a partir da década de 90. **II Encontro de Economia Catarinense**. Chapecó/SC, 2008.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, p. 1073–1101, 2007.

BITOCCHI, E.; NANNI, L.; ROSSI, M.; et al. Introgression from modern hybrid varieties into landrace populations of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) in central Italy. **Molecular Ecology**. v.18, nº 4, p. 603-621, 2009.

BONWELL, E.; WETZEL, D. Innovative FT-IR imaging of protein film secondary structure before and after heat treatment. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 10067–10072, 2009.

BRASIL: MAPA. **Lei nº 10.711, de 05/08/2003**, 2003.

BRASIL: MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Parecer Técnico nº1596**, 2008.

BRASIL: MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Resolução Normativa nº 4, de 16/08/2007**, 2007.

BROWN, W. L.; GOODMAN, M. M. Races of Corn. In: **Corn and corn Improvement**. Amer. Soc. Agron. USA, p. 49-88, 1976.

CANDELA, H.; HAKE, S. The art and design of genetic screens: Maize. **Nature Reviews Genetics**, v.9, n.3, p. 192-203, 2008.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; DORE, P.; et al. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. **Food Chem.**, v. 108, p. 361–368, 2008.

CÉLERES: **Informativo biotecnologia**. 2013. Disponível em: <<http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf>>. Acesso em: 20/03/2014.

CERA: **GM Crop Database**. Center for Environmental Risk Assessment (CERA) 2010, ILSI Research Foundation, Washington D.C. Disponível em: <http://ceragmc.org/index.php?action=gm_crop_database>. Acesso em: 10/04/2014.

CERNÁ, M.; BARROS, A.S.; NUNES, A.; et al. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 383–389, 2003.

CHÈVRE, A. M.; EBER, F.; RENARD, M. Gene flow from oilseed rape to weeds. In: Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops. British Crop Protection Council. **Symposium Proceedings**, v. 72, p. 125-130, 1999.

COCKBURN, A. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. **Journal of Biotechnology**, v. 98, p. 79-106, 2002.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – CTNBio: **Parecer Técnico nº 1.100/2007**. Disponível em: <<http://ceragmc.org/docs/decdocs/08-179-002.pdf>>. Acesso em: 25/05/2011.

CORDEIRO, A.; ALVES, A. C.; OGLIARI, J. B. Challenges for co-existence in small-scale farming: the case of maize in Brazil. In: BRECKLING, B.; REUTER, H.; VERHOEVEN, R. **Implications of GM-Crop Cultivation at Large Spatial Scales**. Theorie in der Ökologie 14. Frankfurt, Peter Lang. 2008.

CORDEIRO, G. A. Desenvolvimento de Metodologias Espectroscópicas Multivariadas para a Quantificação de Fármacos em Formas Farmacêuticas. **Dissertação**. Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná – Paraná, Brasil. 2006.

COSTA, F. M. Diversidade genética e distribuição geográfica: uma abordagem para a conservação *on farm* e *ex situ* e o uso sustentável dos

recursos genéticos de milho do Oeste de Santa Catarina. **Dissertação**. Recursos Genéticos Vegetais. UFSC. 2013.

DONG, W.; YANG, L.; SHEN, K.; et al. GMDD: a database of GMO detection methods. **BMC Bioinformatics**, p. 9-260, 2008.

DUARTE, J. D. EMBRAPA: **Importância econômica**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/Cultivo/Milho/importancia.htm>>. Acesso em: 20/08/2012.

EASTHAM, K.; SWEET, J. Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer. European Environmental Agency (EEA). **Environmental issue report**, v. 28, 2002.

FAO: **FAO Statistical yearbook**. Roma. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 15/06/2014.

FERMENT, G.; ZANONI, M.; BRACK, P.; et al. **Proposta de Revisão da Resolução Normativa nº4 da CTNBio**. Brasília: MDA, 2009.

FERMENT, G. Impactos Ecológicos das Plantas Transgênicas. In: FERNADES, G.; FERMENT, G.; AVANCI, J. **Seminário sobre proteção da agrobiodiversidade e direito dos agricultores: Propostas para enfrentar a contaminação transgênica do milho**. Brasília: MDA, 2010.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, p. 574, 2007.

GALEANO, P.; DEBAT, C. M.; RUIBAL, F.; et al. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. **Environ. Biosafety Res.**, v. 9, nº 3, 2010.

GIORDANO, M.; KANSIZ, M.; HERAUD, P.; et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). **J. Phycol.**, v. 37, p. 271–279, 2001.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, ed. 12, p. 2849–2858, 2013.

HERRERO, A. M.; CARMONA, P.; PINTADO, T.; et al. Lipid and protein structure analysis of frankfurters formulated with olive oil-in-water emulsion as animal fat replacer. **Food Chemistry**, v. 135, Issue 1, p. 133–139, 2012.

HOLSE, M.; LARSEN, F. H.; HANSEN, Å.; et al. Characterization of maramba bean (*Tylosema esculentum*) by comparative spectroscopy: NMR, FT-Raman, FT-IR and NIR. **Food Research International**, v. 44 (1), p. 373–384, 2011.

HOLST-JENSEN, A.; DE LOOSE, M.; VAN DEN EEDE, G. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 19, p. 2799–2809, 2006.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro, pag. 1-267. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/agri_familiar_2006/familia_censoagro2006.pdf >. Acesso em: 05/07/2012.

KAROUI, R.; DOWNEY, G.; BLECKER, C. Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: A tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships – A review. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 6144–6168, 2010.

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea Mays* L.). **Tese**. Recursos Genéticos Vegetais. UFSC. 2007.

LAMBERT, J.B.; SHURVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; et al. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 568 p., 2001.

LANDAU, E. C.; SANS, L. M. A.; SANTANA, D. P. **CULTIVO DO MILHO: Clima e Solo**. Embrapa Milho e Sorgo, Sistemas de Produção 2, 5ª edição, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/climaesolo.htm>. Acesso em: 01/04/2014.

LUNA, S. V.; FIGUEROA, J. M.; BALTAZAR, B. M.; et al. Maize Pollen Longevity and Distance Isolation Requirements for Effective Pollen Control. **Crop Science**, v. 41, p. 1551-1557, 2001.

MA, B. L.; SUBEDI, K. D.; REID, L. M. Extent of Cross-Fertilization in Maize by Pollen from Neighboring Transgenic Hybrids. **Crop Science**, v. 44, p.1273-1282. 2004.

MACHADO, C. T. T.; PATERNIANI, M. L. S. Origem, domesticação e difusão do milho In: SOARES, A. C. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, p. 185, 1998.

MARSARO JR, A. L.; LAZZARI, S. M. N.; SOUZA, J. L.; et al. Influência de diferentes sistemas de adubação na composição nutricional do milho *Zea mays* L. (Poaceae) e seus efeitos no ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) no produto armazenado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 51-64, 2007.

MAURICIO-IGLESAIS, M.; GUILLARD, V.; GONTARD, N.; et al. Application of FTIR and Raman microscopy to the study of food/packaging interactions. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, p. 1515–1523, 2009.

OGLIARI, J. B.; ALVES, A. C.; KIST, V.; et al. Análise da diversidade genética de variedades locais de milho. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, p. 191-195, 2007.

OGLIARI, J. B.; KIST, V.; CANCI, A. The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil. In: DE BOEF, W.; PERONI, N.; SUBEDI, A.; et al. (Org.). **Community Biodiversity Management. Promoting Resilience and the Conservation of Plant Genetic Resources**. 1ª ed., Abingdon: Routledge, p. 265-271, 2013.

OLIVEIRA, M. A.; ZUCARELI, C.; SPOLAOR, L. T.; et al. Composição química dos grãos de milho em resposta à adubação mineral e inoculação com rizobactérias. **Rev. Ceres**. v. 59, n.5, p. 709-715, 2012.

ORTIZ-GARCIA, S.; EZCURRA, E.; SCHOET, B.; et al. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). **PNAS**, v. 102, nº 35, 2005.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. **EMBRAPA: Circular Técnica 75**. Sete Lagoas/MG, 2006.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento de milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, p. 969, 2005.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M. M. **Races of maize in Brazil and adjacent areas**. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Mays y Trigo), México, D. F, 1977.

PISTORIUS, A. M.; DEGRIP, W. J.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T. A. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. **Biotechnol. Bioeng.** v. 103, p. 123–129, 2009.

PUGA, A. L.; PRADO, R. M.; MATTIUZ, B.; et al. Chemical composition of corn and sorghum grains cultivated in Oxisol with different application methods and doses of zinc. **Cien. Inv. Agr.**, v. 40, nº1, p. 97-108, 2013.

QUIST, D.; CHAPELA, I. H. Maize transgene results in Mexico are artefacts. **Nature**, v. 416, p. 602–603, 2002.

QUIST, D.; CHAPELA, I. H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, v. 414, p. 541–543, 2001.

RIESEMBERG, A.; SILVA, M. Crônica de uma contaminação anunciada. In: FERMENT, G.; FERNADES, G.; AVANCI, J. **Seminário sobre proteção da agrobiodiversidade e direito dos**

agricultores: Propostas para enfrentar a contaminação transgênica do milho. Brasília: MDA, 2010.

SANTONI, I.; PIZZO, B. Evaluation of alternative vegetable proteins as wood adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 148–154, 2013.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational spectroscopy**, v. 43, 13-25, 2007.

SILVA, N. C. A. Diversidade de Milho Crioulo e Distribuição de Parentes Silvestres no Oeste de Santa Catarina: impactos potenciais do milho geneticamente modificado na conservação *in situ-on farm*. **Qualificação de Doutorado** - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. *no prelo*.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro (RJ): LTC, 2007. xiv, 490p.

SIVAM, A. S.; SUN-WATERHOUSE, D.; PERERA, C. O.; et al. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. **Food Research International**, v. 50, Issue 2, p. 574–585, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMANN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman. 2002.

STEVENS, W. E.; BERBERICH, S. A.; SHECKELL, P. A. et al. Optimizing Pollen Confinement in Maize Grown for Regulated Products. **Crop Science**, v. 44, p. 2146-2153, 2004.

SUBIRADE, M.; KELLY, I.; GUÉGUEN, J.; et al. Molecular basis of film formation from a soybean protein: comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 23, p. 241–249, 1998.

TANG, M.; HE, X.; LUO, Y.; et al. Nutritional assessment of transgenic lysine-rich maize compared with conventional quality protein maize. **J. Sci. Food Agric**. v. 93, p. 1049–1054, 2013.

UARROTA, V. G. Perfil metabólico primário (proteínas, amido e lipídeos) e secundário [carotenóides, antocianinas e ácidos (poli)fenólicos] de grãos de oito variedades crioulas de milho. **Dissertação**. Biotecnologia e Biociências. UFSC. 2011.

USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. **World Agricultural Production**. Date Created: March 2014. Disponível em: < <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> >. Acesso em: 20/03/2014.

VIDAL, R. SILVA, N. C. A.; COSTA, F. M.; et al. Análise da diversidade genética e conservação de variedades de milho crioulo no Oeste de Santa Catarina. **Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos**. Belém/Pará, 2012.

VOGT, G. A. A Dinâmica Do Uso E Manejo De Variedades Locais De Milho Em Propriedades Agrícolas Familiares. **Tese**. Recursos Genéticos Vegetais. 2005.

VOGT, G. A.; CANCI, I. J.; CANCI, A. Uso e manejo de variedades locais de milho em Anchieta (SC). **Agriculturas**, v. 4, nº 3, 2007.

XU, F.; SUN, R.C.; SUN, J.X.; et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 207–217, 2005.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar os efeitos da presença de transgenes (eventos TC1507 e TC1507 + NK603) por meio de um *screening* inicial dos principais grupos funcionais de grãos inteiros e suas partes (degerminados e embriões), em híbridos isogênicos de milho transgênicos e não transgênicos, isolados e associados a populações com diferentes proporções de *background* genético de variedade crioula, desenvolvidas para simular contaminações gradativas e recorrentes por fluxo gênico.

Objetivos específicos

Desenvolver populações com distintos *backgrounds* genéticos entre três cultivares isogênicas de milho (duas transgênicas: BG7060H e BG7060HR e uma não transgênica: BG7060) e a variedade crioula Rosado-Rajado (RS) do Oeste de SC, para simular diferentes percentuais de fluxo gênico das cultivares híbridas sobre a crioula;

Confirmar a ausência prévia de fluxo gênico de cultivares transgênicas sobre a variedade crioula Rosado-Rajado (RS) e a identidade não transgênica da cultivar híbrida isogênica BG7060;

Confirmar a identidade das cultivares híbridas isogênicas (BG7060H e BG7060HR) e a efetividade dos cruzamentos envolvendo as cultivares híbridas portadoras do evento TC1507 comum aos dois híbridos transgênicos (BG7060H e HR);

Comparar o perfil metabólico (metaboloma parcial) de grãos inteiros, degerminados e embriões dos híbridos isogênicos transgênicos (BG7060H e BG7060HR) e não transgênico (BG7060), da variedade crioula Rosado-Rajado (RS) e das progênes portadoras de 25%, 50% e 75% de genes de RS, em combinação com cada um dos três híbridos isogênicos.

Análise do perfil espectral por infravermelho médio (DRIFTS) de grãos inteiros, degerminados e embriões de distintos *backgrounds* genéticos de milho crioulo com cultivares híbridas geneticamente modificadas e não modificadas

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) constitui, junto com o arroz e o trigo, um dos três cereais principais do mundo, no que se refere à área plantada e à produção (FAO, 2013). Em face disso, trata-se de uma cultura de grande importância agrícola, sendo à base da alimentação de muitas famílias.

A projeção é que o cultivo do milho no mundo, safra de 2013/2014, é de 177 milhões de hectares; no Brasil 15,4 milhões de hectares; e em Santa Catarina 500 mil hectares (CÉLERES, 2013; USDA, 2014). Desse total, o Brasil possui a segunda maior área cultivada quando se considera a adoção da tecnologia geneticamente modificada, sendo que foi previsto na mesma safra que o cultivo de milho geneticamente modificado (GM) foi plantado em 12,55 milhões de hectares, ou 81,5% da área total (JAMES, 2012; CÉLERES, 2013). O restante dos cultivos é não GM, e incluem variedades crioulas e locais. Estima-se que no mundo há mais de 300 raças, com centenas ou milhares de variedades de milho (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Nesse sentido, a grande difusão e adoção dos cultivos geneticamente modificados pelos agricultores, os cultivos de milho não GM, incluindo variedades crioulas e locais, estão obrigados a coexistir com cultivos GMs. De acordo com a Resolução Normativa Brasileira nº 4, de 16/08/2007, há distâncias mínimas visando à coexistência entre os diferentes sistemas de produção, que são de 100 metros entre cultivos ou de 20 metros mais 10 fileiras de milho não GM (BRASIL, 2007).

Na literatura científica, já é bem documentado que essa norma de coexistência é ineficaz (HENRY *et al.*, 2003; SANVIDO *et al.*, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2008; GALEANO *et al.*, 2010), e que o problema do fluxo gênico vai mais além, com troca de sementes de origem desconhecida entre agricultores, com equívocos em máquinas, transporte e armazenamento (FERMENT *et al.*, 2009). Por conseguinte, não há barreiras biológicas para o fluxo gênico entre as diferentes variedades de milho (*i.e.*: híbridos, variedades de polinização aberta e crioulas); e que ambos agrossistemas (*i.e.*: escala industrial e pequena) podem existir nas proximidades. Portanto, é esperado que o fluxo gênico entre estas variedades ocorra regularmente, com possíveis efeitos pleiotrópicos não

intencionais em variedades crioulas e locais, tornando-se assim, uma ameaça a riqueza do material genético do milho, conservada pelas unidades de produção familiares (*on farm*).

A introdução de sequências de DNA exógeno no genoma de uma planta com o objetivo de conferir novas características é um ramo cada vez mais difundido na pesquisa científica. Os produtos da transcrição do(s) transgene(s) introduzido(s) e, possivelmente, os caminhos bioquímicos modificados com base nelas, pode interagir com a regulação de outros genes e/ou vias bioquímicas. Assim, uma das principais preocupações dessa tecnologia é a possibilidade de ocorrência de efeitos indesejados (efeitos pleiotrópicos) causados, por exemplo, pelo local de integração do transgene, resultando no metabolismo modificado (CELLINI *et al.*, 2004; RICROCH *et al.*, 2011).

Assim sendo, com a finalidade de avaliar a segurança dos alimentos geneticamente modificados, os comitês reguladores seguem o conceito da “equivalência substancial”, criado em 1993 pela OECD (*Organisation de coopération et de développement économiques*) e que, em 1996, é incorporado pela FAO e OMS. Assim, um alimento ou ingrediente alimentar desenvolvido pela aplicação da biotecnologia moderna para ser considerado substancialmente equivalente, estes devem ser analisados a produtos alimentares análogos. (FAO/OMS, 1996). De acordo com Millstone *et al.* (1999), trata-se de um conceito somente comercial, mal elaborado e que deveria ser reestruturado, incluindo testes toxicológicos, biológicos e imunológicos.

Em relação à avaliação de segurança alimentar de OGMs, as ferramentas metodológicas são baseadas em análises de transcriptoma, metaboloma, proteoma e perfil toxicológico (RICROCH *et al.*, 2011). Segundo Asiago *et al.* (2012), a metabolômica é útil para a análise de segurança de OGMs, devido ao fato de que as concentrações dos metabólitos são frequentemente alteradas de forma mais significativa em comparação com a expressão do gene ou níveis de proteína, tornando a detecção de metabólitos uma medida sensível da capacidade de resposta do estado biológico. Os metabólitos são também "mais próximos" para o produto final de atividades biológicas, assim presumivelmente, mais reflexivas no fenótipo da planta, havendo uma maior importância nas avaliações de equivalência substancial das variedades GMs.

A variedade que foi utilizada como representante do material vegetal crioulo, denominada Rosado-Rajado, demonstra potencial de composição química interessante. Segundo Kuhnen *et al.* (2012), essa variedade apresenta nos “cabelos” (estigmas e estiletos) da espiga, comparado a outros materiais crioulos, considerável quantidade de

carotenóides, como a luteína, trans- β -caroteno e α -caroteno. Todavia, analisando os grãos, a variedade Rosado-Rajado apresenta também interessante composição de proteínas (11,33g/100g), lipídios (5,39g/100g), cinzas (1,58 g/100g), fibra total (11,43g/100g), amido (69,81g/100g) e rica fonte de ácidos graxos poliinsaturados (STEINMACHER, 2005).

Dentro deste contexto, o objetivo desse estudo foi comparar grãos inteiros, degerminados e embriões obtidos das cultivares híbridas e isogênicas de milho BG7060H (GM), BG7060HR (GM) e BG7060 (não GM), da variedade crioula Rosado-Rajado(RS) e das progênes portadoras de diferentes *backgrounds* genéticos (com 25%, 50% e 75% de genes de RS), utilizando-se do método de análise de metaboloma DRIFTS (*Difuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), e da análise estatística multivariada (PCA e agrupamento).

Material e Métodos

Material vegetal

As sementes da variedade de milho Rosado-Rajado, utilizada nesse experimento como representante da categoria de material vegetal crioulo, foram doadas pelos agricultores Jair Coser e Miriam Della Vechia do município de Anchieta-SC, por intermédio do Engenheiro Agrônomo e Extensionista da EPAGRI Ivan José Canci. Trata-se de uma variedade rara, resultante do cruzamento entre as variedades crioulas Roxo, Amarelo e Rajado, que nas safras 2002/03 e 2003/04, no município de Canoinhas/SC, produziu 5,22 e 6,65 t/ha⁻¹, respectivamente (OGLIARI *et al.*, 2013).

As cultivares híbridas isogênicas utilizadas são da Biogene (Empresa Pioneer[®]) e foram doadas pela Cooperativa Oestebio do Oeste de Santa Catarina. Tratam-se de três híbridos triplos isogênicos de ciclo precoce, recomendados para a produção de grãos e silagem, na região Sul do Brasil. Uma das cultivares isogênicas é a forma convencional sem transgene (BG7060) e as outras duas são as cultivares híbridas geneticamente modificadas BG7060H, que contém a tecnologia *Herculex[®] I* (evento TC1507), e BG7060HR, que além da *Herculex[®] I*, também contém a tecnologia *Roundup Ready[®] 2* (eventos TC1507 e NK603 combinados).

Para facilitar a identificação desse material, a variedade crioula Rosado-Rajado passou a ser codificada como RS; a cultivar isogênica

não geneticamente modificada BG7060 como INGM; a cultivar geneticamente modificada BG7060H, portadora do evento *Herculex*[®] 1, como GMH e; a cultivar geneticamente modificada BG7060HR, contendo os eventos *Herculex 1 + Roundup Ready*[®] 2, como GMHR. Para a obtenção dos tratamentos foram realizadas polinizações manuais entre as três cultivares híbridas e a variedade crioula de milho RS, visando simular situações de contaminação reincidentes por fluxo gênico ao longo das gerações de cultivo, em sistemas de conservação *on farm*. Estes foram realizados com o objetivo de garantir a pureza dos tratamentos, pois não seria possível controlar a polinização aberta num mesmo local de plantio. Na safra 2011/2012, na área experimental do Centro de Ciências Agrárias - CCA/UFSC, Florianópolis/SC, as progênies da geração F1, resultantes do cruzamento entre RS e as cultivares híbridas INGM, GMH e GMHR, separadamente, foram desenvolvidas pela doutoranda Kelly Justin da Silva do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Na safra 2012/2013, na Fazenda Experimental da Ressacada - UFSC, Florianópolis/SC, foram desenvolvidas as progênies RC1F1, resultantes dos cruzamentos das três progênies F1 com seus respectivos genitores. As porcentagens 25%RS/75% híbrido foram geradas pelos retrocruzamentos dos F1's produzidos a partir das combinações RS/GMH, RS/GMHR e RS/INGM com o parental recorrente GMH, GMHR e INGM, respectivamente; as proporções 50%RS/50% híbrido foram constituídas pela geração F2 das combinações RS/GMH, RS/GMHR e RS/INGM, respectivamente; as proporções 75%RS/25% híbrido foram geradas pelos retrocruzamentos dos F1's produzidos a partir das combinações RS/GMH, RS/GMHR e RS/INGM com o parental recorrente RS. Dessa forma, os tratamentos avaliados nessa pesquisa foram 100% RS, 100% GMH, 100% GMHR e 100% INGM, bem como as combinações RS/GMH, RS/GMHR e RS/INGM, nas proporções 50%RS/50% híbrido, 25%RS/75% híbrido e 75%RS/25% híbrido, respectivamente, segundo o percentual de genes vindos de RS e de seus respectivos híbridos isogênicos (Tabela 2).

Campo experimental

O material vegetal (grãos inteiros, degerminados e embriões) usado nas análises foi obtido a partir de experimento conduzido em conjunto com a doutoranda Kelly Justin da Silva do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. O experimento foi

realizado na safra 2012/2013, na Fazenda Experimental da Ressacada – UFSC, localizada a 27°41'06''S e 48° 32'39''O, em Florianópolis, SC, em área cujo solo é classificado como Neossolo Quartzarênico Hidromórfico Típico (SANTOS *et al.*, 2006), e clima *Cfa*, subtropical úmido com verão quente, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger.

O experimento teve sua implantação no dia 23 de março, com a colheita dos grãos finalizada no dia 01 de outubro de 2013. As plantas de cada tratamento foram polinizadas manualmente com uma mistura de pólen das plantas do próprio tratamento, para garantir que o endosperma e embriões dos grãos produzidos fossem resultantes da dupla fertilização entre gametas de suas respectivas populações. Com o objetivo temporal de haver pólen suficiente para as polinizações subsequentes, uma linha de cada tratamento foi semeada no dia 01 de abril. A variedade crioula Rosado-Rajado completou seu ciclo com 176 dias e os demais tratamentos com 174 e 182 dias. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, no esquema de parcela subdividida (desbalanceado) com três repetições e 15 tratamentos, considerando a presença triplicada da variedade 100% RS em cada repetição, ou seja, uma vez por subparcela (Tabela 2). O fator 1 foi representado pelos híbridos isogênicos INGM, GMH e GMHR e o fator 2 pelos diferentes *backgrounds* genéticos gerados a partir das combinações dos três híbridos com RS (0/100, 25/75, 50/50, 75/25, 100/0) (Tabela 2) (Anexo 1). As parcelas foram constituídas por 4 fileiras de 5 metros lineares, espaçadas 1 metro entre si e uma densidade de plantas de 40.000 plantas ha⁻¹, com área útil da parcela e da bordadura de 10 m² cada, totalizando 40 plantas na parcela útil.

As temperaturas registradas em Florianópolis/SC durante os meses do desenvolvimento da cultura variaram entre 2,1°C e 31,1°C, com média de 18,9°C, e uma pluviosidade acumulada de 852 mm (EPAGRI/CIRAM, 2013).

Com o objetivo de homogeneizar a área para a implantação, a adubação foi realizada com base na análise química do solo (Anexo 2), sendo que no plantio o bloco 1 recebeu 80 kg/ha de nitrogênio, 85 kg/ha de fósforo e 110 kg/ha de potássio; os blocos 2 e 3 receberam cada um 80 kg/ha de nitrogênio, 125 kg/ha de fósforo e 85kg/ha de potássio. A adubação de cobertura consistiu em 80 kg/ha de nitrogênio em cada bloco (WIETHÖLTER *et al.*, 2004).

A irrigação foi realizada conforme a necessidade da cultura. Não foi realizado controle de pragas, doenças e plantas daninhas por meio de inseticidas, fungicidas e herbicidas, respectivamente.

O campo experimental da presente dissertação foi realizado em conjunto com a tese da doutoranda Kelly Justin da Silva do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Tabela 2: Tratamentos do experimento no esquema parcelas subdivididas.

Fator 1	Fator 2 % RS	Percentuais de <i>background</i> genético		
		INGM ¹	GMH ²	GMHR ³
INGM	0	100	-	-
INGM	25	75	-	-
INGM	50	50	-	-
INGM	75	25	-	-
INGM	100	-	-	-
GMH	0	-	100	-
GMH	25	-	75	-
GMH	50	-	50	-
GMH	75	-	25	-
GMH	100	-	-	-
GMHR	0	-	-	100
GMHR	25	-	-	75
GMHR	50	-	-	50
GMHR	75	-	-	25
GMHR	100	-	-	-

⁽¹⁾INGM: isogênica não geneticamente modificada; ⁽²⁾GMH: geneticamente modificada com o evento *Herculex*[®] I; ⁽³⁾GMHR: geneticamente modificada com os eventos *Herculex*[®] I + *Roundup Ready*[®] 2. Traços correspondem a percentagem zero.

Detecção dos cruzamentos

A confirmação dos cruzamentos entre a variedade RS e híbridos isogênicos transgênicos foi realizada por meio da detecção da presença do gene *Pat* (eventos TC1507 e TC1507+NK603), presente em ambos os híbridos (Tabela 3).

Tabela 3: Iniciador utilizado na detecção dos cruzamentos.

Alvo	Sequência	(pb)	Referência
<i>Pat</i>	f* CTTGTGGTGTGGCTCT	279	Li <i>et al.</i> , 2009
	r* TGGCTCCTTCGTATGT		

* f = forward, sequência senso; r = reverse, sequência antisenso.

Como se trata de um experimento com o desenvolvimento prévio de populações com seus distintos *backgrounds* genéticos, houve um acompanhamento da efetividade dos cruzamentos, bem como da ausência de contaminações antecedentes do material crioulo com cultivares transgênicas, seja via detecção da proteína com tiras de Imunoensaio de Fluxo Lateral para as proteínas específicas *CryIAb* e *CryIF*, ou via DNA recombinante com iniciador específico do gene *Pat*.

Extração de DNA

A extração de DNA foi efetuada a partir de uma “amostra composta” de folhas obtidas de dez diferentes plantas por tratamento. Uma mistura equitativa de folhas de cada tratamento foi macerada com auxílio de almofariz e pilão de porcelana em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino. Foram utilizados entre 50 e 100mg de tecido, acondicionados em tubo com capacidade de 1,5 mL, adicionando-se 650 µL da solução tampão de extração, constituída por CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio–CTAB); 1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM de EDTA, pH 8,0; 0,2 % de betamercaptoetanol. Os tubos foram agitados manualmente e incubados em banho-maria a 65 °C por 50 minutos, agitando suavemente a cada 10 min. Foram adicionados 650 µL de clorofórmio:álcoolisoamílico (24:1, v:v) e agitados manualmente até formar uma emulsão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 g para separação do sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo, onde foi adicionado 2,5 volumes de etanol gelado para precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados novamente por 5 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com etanol 70% por 5 min, e uma vez com etanol 100% por 3 min. Os tubos

com DNA foram invertidos em papel toalha por 5 minutos (para evaporar o etanol), ressolubilizados em 50 μL de água ultrapura autoclavada e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DOYLE & DOYLE, 1990, com modificações).

A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de eletroforese horizontal com 1% de agarose e corada com SYBR Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), utilizando-se o tampão TAE 0,5x (Tris-Acetato-EDTA), por uma hora a 60 V. A quantificação e a pureza do DNA foi efetuada em espectrofotômetro ThermoScientificNanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

Condições da PCR

As Reações de Polimerização em Cadeia (PCR) para a confirmação dos cruzamentos foram realizadas com os pares dos iniciadores para a detecção do gene *Pat*. As condições foram: 10 μL de volume total da reação; 0,2 mM dNTPs, 1,5mM MgCl_2 , 1 U Taq DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 0,4 μM de cada iniciador e 100 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ de DNA extraído. As condições de amplificação foram as seguintes: 95 $^{\circ}\text{C}$ por 8 min; 35 ciclos a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s, a 58 $^{\circ}\text{C}$ por 40 s, a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s, e uma extensão final a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 8 min (LI *et al.*, 2009, com modificações). Os produtos de reação foram submetidos à eletroforese com concentração de gel de agarose de 2%, corado com SYBR Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), cerca de 1 hora a 100 V.

Preparo das amostras para análise do metaboloma

Para o preparo das amostras em farinha, cada tratamento, por bloco, contribuiu em média com onze espigas, fornecendo igualmente a mesma quantidade de grãos, totalizando cerca de 100g (peso seco) por tratamento. Desse total, metade foi destinada para o preparo de farinha de grãos inteiros (endosperma e embrião), e a outra metade para farinha de grãos degerminados (endosperma), com posterior utilização dos embriões provenientes. Para o preparo das farinhas dos grãos degerminados, e subsequentemente dos embriões, por falta de grãos, duas repetições foram criadas, ao contrário das farinhas de grãos inteiros que foram três repetições. O processo de degerminação dos grãos foi realizado deixando os grãos embebidos em água destilada por 1 hora,

sendo degerminados manualmente com o auxílio de lâminas de estilete (via “cortador de remédios”) e palitos de madeira. As amostras de grãos inteiros e degerminados foram trituradas em moinho de laboratório (IKA[®] - modelo A 11 basic), e os embriões com auxílio de almofariz e pilão de porcelana em nitrogênio líquido, utilizando-se de peneira de 0,42 mm. Em seguida, as amostras de grãos inteiros, degerminados e embriões foram embaladas em sacos e tubos plásticos, sob vácuo, e mantidas sob refrigeração para posteriores análises.

Separaram-se as análises em DRIFTS de grãos inteiros, degerminados e embriões para que houvesse uma melhor caracterização de cada metabólito (carboidratos, proteínas, lipídios e compostos fenólicos) presente em cada tecido específico do grão.

Pré-tratamento dos espectros e análises estatísticas

Os espectros obtidos das amostras de farinhas de grãos inteiros, degerminados e embriões de milho por espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier utilizaram o equipamento *Vertex 70*, marca *Bruker*, *software OPUS[®] 6.5*, em sistema de reflexão difusa, em janela espectral de 400 a 4000 ondas.cm^{-1} , com resolução de 64 ondas.cm^{-1} , e 64 scans por espectro. As leituras das amostras por DRIFTS foram realizadas na Universidade Federal do Paraná, por intermédio do Dr. Luciano Henrique Campestrini. O processamento dos espectros foi realizado com o auxílio do *software OPUS[®] (Bruker Optik 5.0)*, onde se considerou a delimitação da janela espectral de interesse de 3200-500 ondas.cm^{-1} , a correção da linha de base, a exclusão da região do CO_2 (2260-2400 ondas.cm^{-1}), a normalização e a diminuição da relação sinal/ruído (*smoothing*). Em seguida, o conjunto dos dados médios dos espectros processados foi submetido à análise estatística multivariada, através da aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs) e análises de agrupamento considerando como medida de dissimilaridade a distância euclidiana e os métodos de agrupamentos (ligação simples e UPGMA) com auxílio do *software PAST[®]* (HAMMER *et al.*, 2001a). Nas análises de agrupamento, considerou-se o ponto de corte dos dendogramas na metade da maior distância existente entre os grupos.

MANOVA (Análise de variância multivariada)

Com o objetivo de analisar a variância entre os blocos, realizou-se uma MANOVA, onde as variáveis foram os valores correspondentes de cada repetição nos Componentes Principais 1 e 2 (PC1 e PC2). Para tal, utilizou-se a Linguagem R (2011), a estatística de *Pillai*, probabilidade do teste F, com nível de 0,05% de significância.

Resultados e discussão

Detecção dos cruzamentos

Na figura 5, está apresentado o gel que confirma os cruzamentos e os duplos retrocruzamentos resultantes das combinações dos híbridos isogênicos portadores do evento TC1507 (GMH e GMHR) com a variedade crioula Rajado-Rosado (RS).

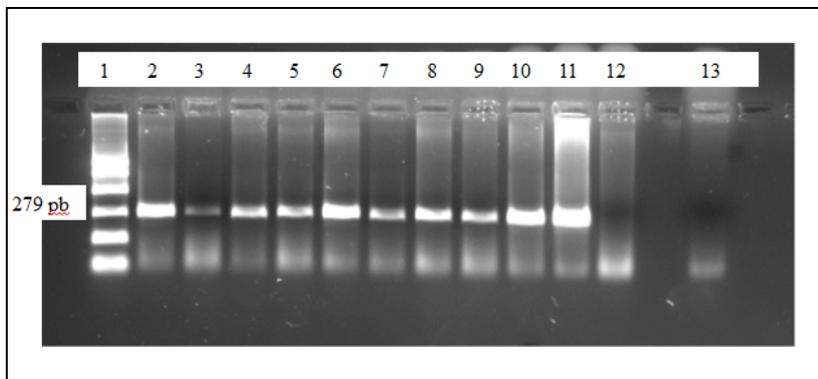


Figura 5: Gel de agarose (2%) corado com SYBR Green para a confirmação dos cruzamentos envolvendo o evento TC1507 (alvo *Pat*) - que amplifica banda de 279 pb.

1: Ladder; 2: GMH; 3: 75% GMH + 25% RS; 4: 50% GMH + 50% RS; 5: 75% RS + 25% GMH; 6: GMH; 7: 75% GMHR + 25% RS; 8: 50% GMHR + 50% RS; 9: 75% RS + 25% GMHR; 10: GMH; 11: GMHR; 12: RS; 13: Água.

De acordo com o gel da figura 5, o par de iniciador específico foi eficiente na detecção do evento TC1507, pois todos os cruzamentos envolvidos, ou seja, de 25 a 75% no grau de fluxo gênico do transgene, foram amplificados em 279 pb. A não amplificação na variedade Rosado-Rajado (12) demonstra a inexistência de contaminações anteriores desse tratamento por cultivares portadoras desse evento.

Segundo Stewart *et al.* (2003), o que ocorreu nesse experimento, utilizando milho geneticamente modificado e variedade crioula, foi a simulação de hibridização, cruzamentos ou fluxo gênico que ocorrem em lavouras de milho. Para que ocorra a introgressão de transgenes na variedade crioula, repetidos retrocruzamentos e a estabilização do transgene têm que ocorrer no genoma do hospedeiro. Portanto, a introgressão de um transgene é um processo dinâmico, que pode levar anos e gerações para que seja fixado no *background* genético.

MANOVA (Análise de variância multivariada)

Na tabela 4 está representada a MANOVA dos blocos com valores da estatística de *Pillai* e a probabilidade do teste F.

Tabela 4: MANOVA dos blocos com valores da estatística de *Pillai* e probabilidade do teste F.

Material Vegetal	Região	<i>Pillai</i>	Prob. F
Grãos inteiros	Perfil espectral	0,0419	0,5494
	Carboidratos	0,0416	0,5515
	Proteínas	0,0412	0,5548
	Lipídios	0,1468	0,1084
	Poli(fenóis)	0,1122	0,1890
Grãos degerminados	Perfil espectral	0,1229	0,4264
	Carboidratos	0,2233	0,1935
	Proteínas	0,3876	0,0413*
	Poli(fenóis)	0,1837	0,2673
Embriões	Perfil espectral	0,2245	0,1915
	Proteínas	0,0234	0,8572
	Lipídios	0,2022	0,2303

* Significativo ao nível de 0,05% de significância

Analisando a tabela 4, a variância entre os blocos somente foi significativa a 0,05% de significância considerando a região *fingerprinting* de proteínas em grãos degerminados. As demais regiões espectrais em diferentes tecidos vegetais não foram significativas, o que proporciona estatisticamente realizar as análises multivariadas a partir do conjunto dos dados médios dos espectros processados.

Análise de grãos inteiros

O perfil espectral das farinhas de grãos inteiros de milho por DRIFTS está na figura 6.

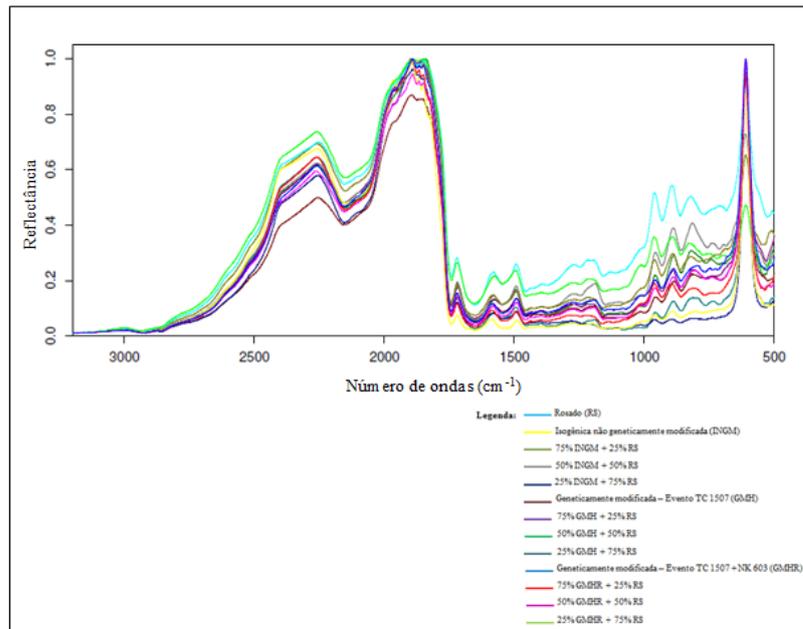


Figura 6: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm⁻¹) de farinhas de grãos inteiros de milho de todos os genótipos.

Perfil espectral (3200-500 ondas.cm⁻¹)

A partir do cálculo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2), conforme demonstrado na figura 7, a maioria da variabilidade dos dados é explicada por PC1 (83,49%), comparativamente ao PC2 (10,87%). Contudo, ambos expressaram 94,36% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS para a análise do perfil espectral de grãos inteiros, sendo que os genótipos não tiveram um nítido agrupamento ao longo do PC1 e PC2.

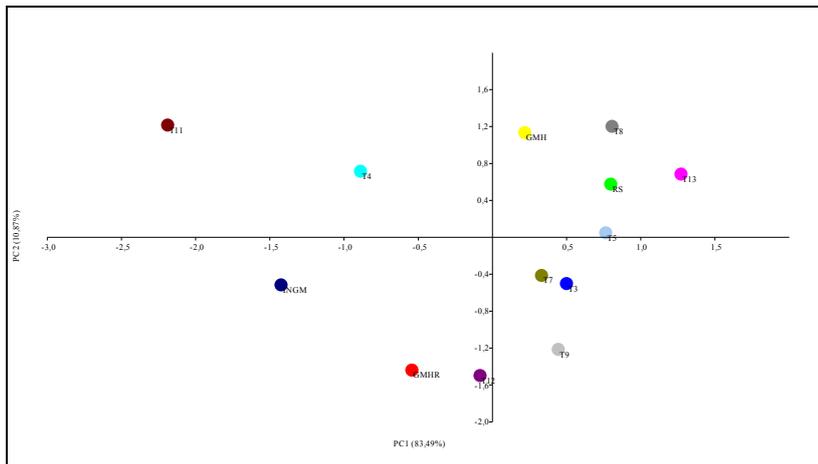


Figura 7: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de todos os genótipos. RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507), GMHR (Geneticamente modificada – evento TC 1507 + NK 603), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS), T9 (25% GMH + 75% RS), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

A análise de agrupamento entre todos os genótipos está demonstrada na figura 8. Com linha de corte entre as distâncias de 0,5 e 1,0, houve a formação de um grupo com os genótipos RS (Rosado-Rajado), T3 (75% INGM + 25% RS), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS) e T8 (50% GMH + 50% RS) e os demais genótipos formaram grupos independentes entre si.

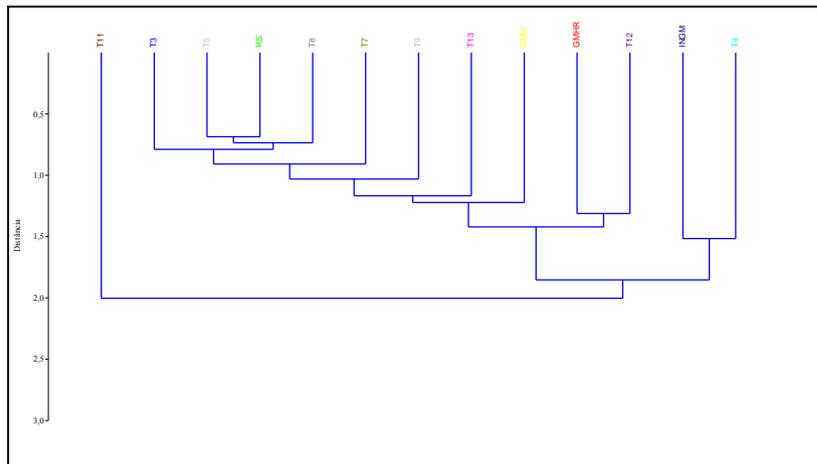


Figura 8: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de todos os genótipos. Coeficiente de correlação cofenética = 0,79.

Carboidratos (1200-800 ondas.cm⁻¹)

No geral, os carboidratos são identificados com valores de absorvância na faixa espectral de infravermelho entre 1200–800 ondas.cm⁻¹ (CERNÁ *et al.*, 2003; SIVAM *et al.*, 2013). Entretanto, outros autores indicam que a presença de hidratos de carbono ocorrem mais amplamente entre 1190-761 ondas.cm⁻¹ (SANTONI & PIZZO, 2013).

A aplicação da Análise de Componentes Principais (PCA), com o objetivo de análise do perfil metabólico primário (*fingerprinting*) de carboidratos, permitiu uma separação entre as variedades crioula (RS) e os híbridos isogênicos (INGM, GMH e GMHR), a partir do cálculo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2), conforme demonstrado na figura 9. A maioria da variabilidade dos dados é explicada por PC1 (99,16%), comparativamente ao PC2 (0,63%). Contudo, ambos expressaram 99,79% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a híbrida geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH) agruparam-se em PC1 positivo, contrariamente ao observado para as variedades isogênicas não geneticamente modificada (INGM) e a geneticamente

modificada – evento TC1507 + NK603 (GMHR), localizaram-se em PC1 negativo.

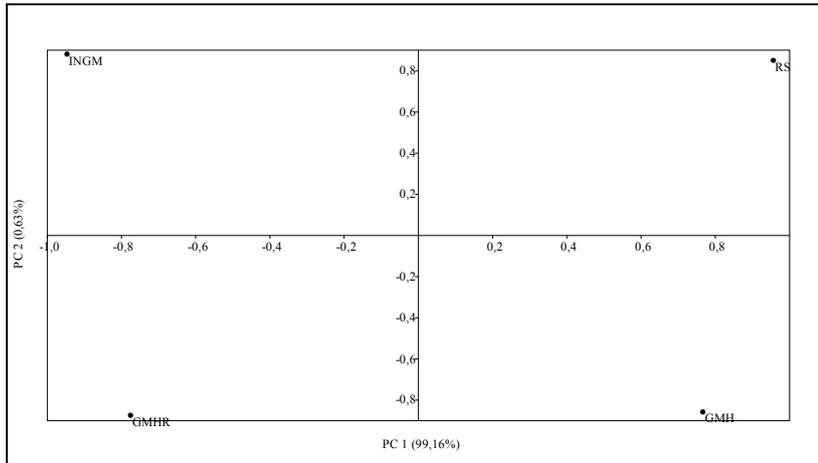


Figura 9: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK 603).

Considerando a análise de agrupamento entre os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, de fato, como mencionado com a PCA, houve a formação de dois grupos distintos como demonstrado no dendograma da figura 10. Ou seja, houve a formação de um grupo com os genótipos RS e GMH, e outro com os genótipos INGM e GMHR. O dendograma revela que para carboidratos em grãos inteiros não é a presença do(s) evento(s) que está (ão) separando os tratamentos, assim, não define os agrupamentos.

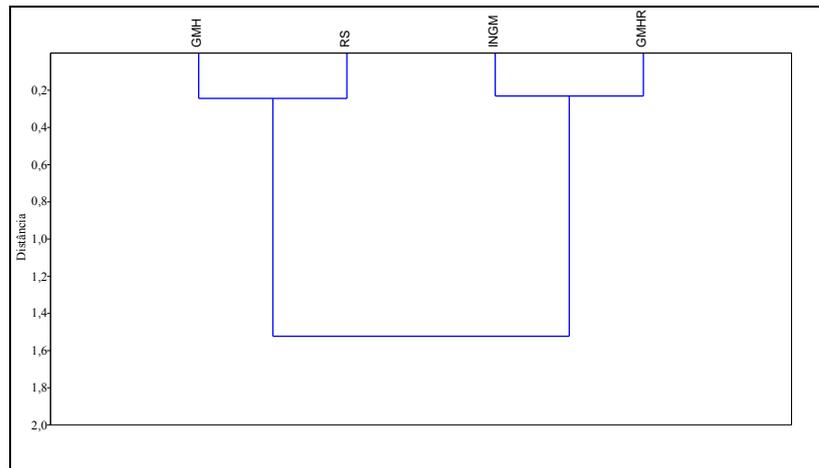


Figura 10: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9891.

Quando analisamos o perfil metabólico de carboidratos de grãos inteiros pela PCA envolvendo a INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS) não se obtêm uma clara separação dos genótipos, conforme pode ser observado na figura 11. A maior parte da variabilidade dos dados é explicada por PC1 (93%) e depois por PC2 (6,76%) e juntos ambos expressaram 99,76% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado – Rajado (RS), a isogênica não geneticamente modificada (INGM) e o tratamento T4 (50% INGM + 50% RS) agruparam-se em PC1 negativo, ao contrário do que foi observado para os genótipos T3 (75% INGM + 25% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS), que agruparam-se em PC1 positivo.

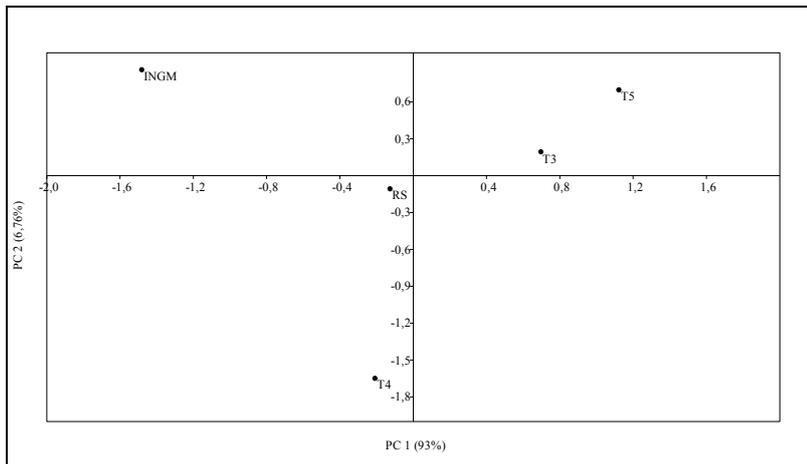


Figura 11: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

Na figura 12, mostra-se o comportamento do dendograma entre os genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5, no qual pode-se identificar a formação de três grupos, obtidos por meio de um corte transversal feito na metade da maior distância entre os grupos (entre 0,4 e 0,5). Um grupo é formado pelos genótipos T3 e T5, outro pelos T4 e RS, e outro isoladamente pela variedade INGM.

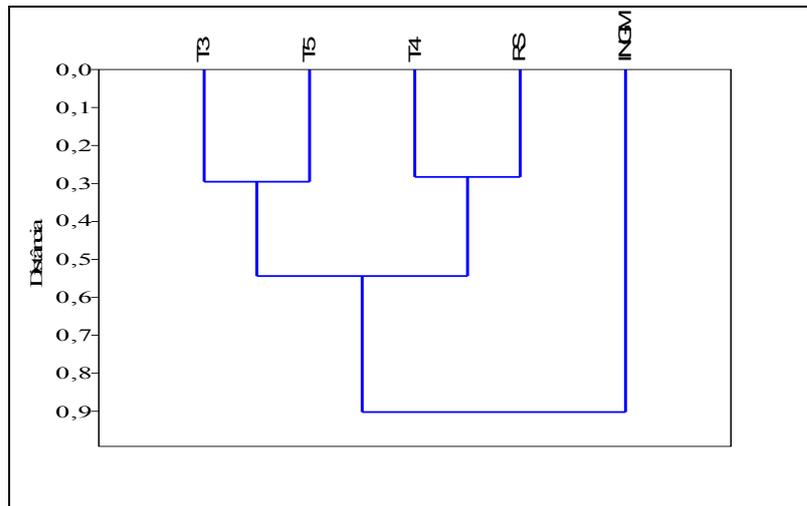


Figura 12: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8335.

O dendrograma da figura 12 revela que, na ausência de transgenes, $\frac{1}{4}$ de genes de RS na população já é suficiente para agrupar-se com o RS. Parece que os genes do RS possuem uma particularidade intrínseca, pois todos se agrupam com ele, exceto o INGM.

Analisando o perfil metabólico de carboidratos de grãos inteiros pela PCA envolvendo a GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) não há uma nítida separação dos genótipos, como ilustrado na figura 13. A variabilidade dos dados é explicada, quase que na totalidade, por PC1 (95,7%); PC1 e PC2 (3,49%) somados explicam 99,19% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado - Rajado (RS), a isogênica geneticamente modificada (GMH) e o genótipo T8 (50% GMH + 50% RS) agruparam-se em PC1 positivo, enquanto os tratamentos T7 (75% GMH + 25% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS) agruparam-se em PC1 negativo.

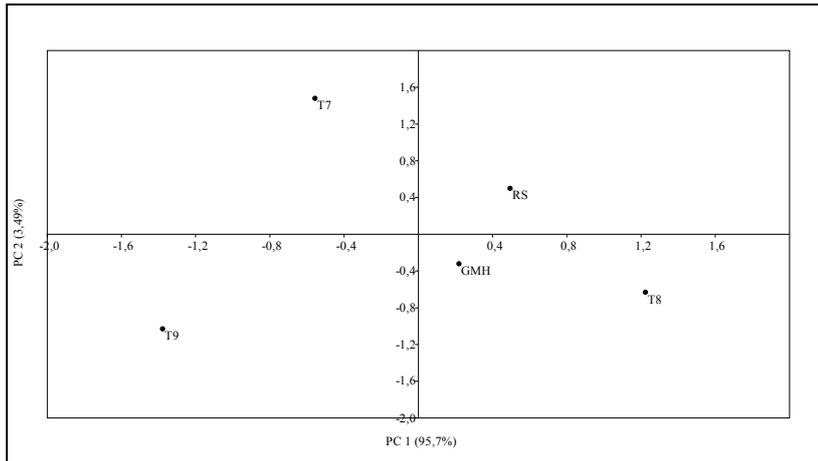


Figura 13: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

Como pode ser observado no dendograma da figura 14, fazendo um corte entre as distâncias 0,4 e 0,5 (em torno da metade da maior distância), há a formação de quatro grupos distintos. Um grupo é composto pelos genótipos RS e GMH, e os demais, T7, T8 e T9, isoladamente formam os demais grupos.

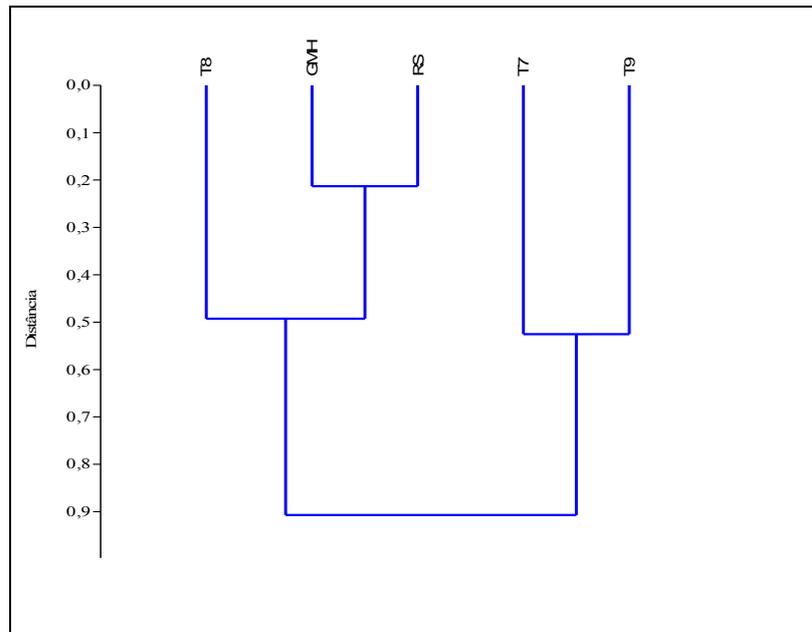


Figura 14: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC 1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,71.

O dendrograma da figura 14 exhibe que não é a presença isolada do evento TC1507 no híbrido o principal responsável pela distinção entre os tratamentos quanto aos carboidratos em grãos inteiros, pois a INGM também se distingue dos demais tratamentos e este híbrido não apresenta evento.

O perfil metabólico de carboidratos de grãos inteiros pela PCA, envolvendo a GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS), mostra a separação dos tratamentos, conforme demonstrado na figura 15. A explicação da variabilidade dos dados é dada, quase que exclusivamente, por PC1 (99,3%), enquanto PC2 explica apenas 0,52% e, ambos componentes, 99,82% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A isogênica geneticamente

modificada (GMHR) e os tratamentos T11 (75% GMHR + 25% RS) e T12 (50% GMHR + 50% RS) agruparam-se em PC1 negativo, ao contrário do que foi observado para os genótipos RS (Rosado-Rajado) e T13 (25% GMHR + 75% RS) que agruparam-se em PC1 positivo.

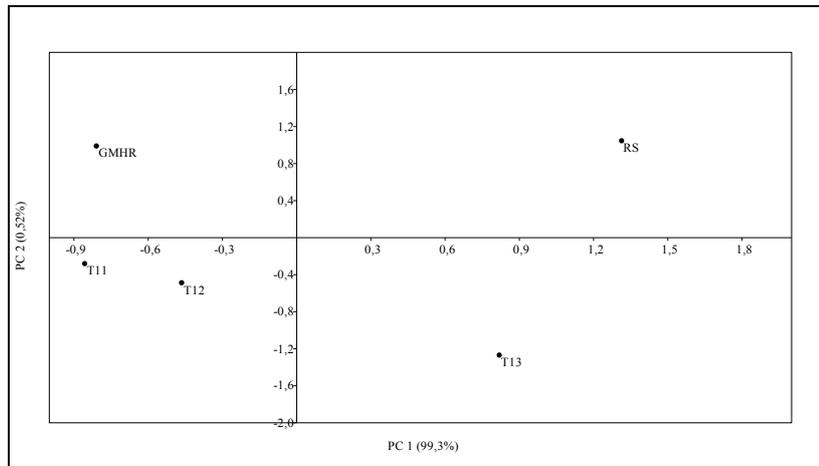


Figura 15: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Analisando o dendograma da figura 16, RS, GMHR, T11, T12 e T13 formaram dois grupos homogêneos distintos. Um grupo que engloba GMHR, T11 e T12, e um segundo grupo, representado por RS e T13.

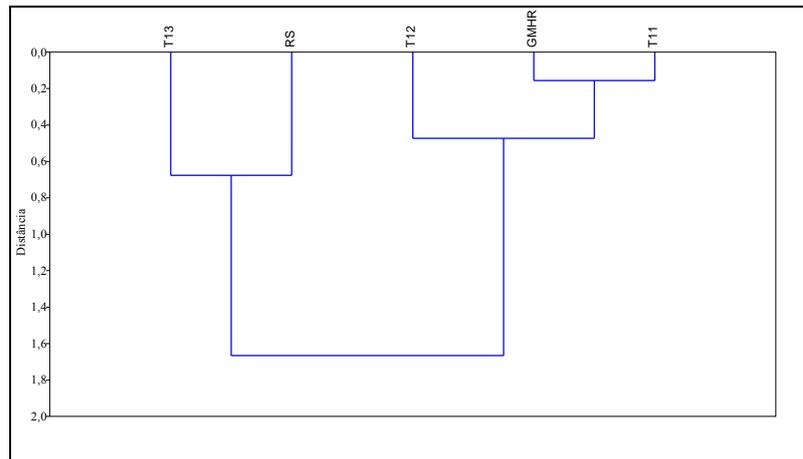


Figura 16: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9472.

Em todas as PCAs não foi possível determinar as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para causarem as separações entre os genótipos, pois todos os números de ondas (cm⁻¹) dessa faixa de carboidratos (1200-800 ondas.cm⁻¹) influenciaram igualmente para essas distinções entre os genótipos.

O fato é que na presença dos eventos, o RS puro só consegue se agrupar com *background* 75%RS e os demais se agrupam com GMHR. Comparando com os dendogramas anteriores, é possível inferir que na presença dos eventos (na presença de TC1507 + NK603) a influência do *background* de RS na definição dos carboidratos tem menos importância. Note que na ausência de eventos, RS se agrupa com qualquer *background*, inclusive com aquele que tem somente 25% de RS. Quando a análise é feita apenas com relação aos descendentes de INGM, os efeitos do *background* de RS se sobrepõem.

A análise do grupo funcional dos carboidratos de grãos inteiros a partir dos tratamentos vinculados a GMHR poderia ser usada para discriminar alterações de componentes desse grupo, em processos de contaminação por GM portadores do evento TC1507 + NK603. Futuros

estudos poderiam usar os carboidratos, em análises de grãos inteiros, para verificar quais componentes químicos deste grupo estariam sendo alterados a partir da contaminação com pólen de GMHR.

Proteínas (1650 – 1400 ondas. cm^{-1})

As proteínas geralmente são identificadas na faixa espectral de infravermelho entre 1650 - 1500 ondas.cm^{-1} , referentes as amidas I e II, respectivamente (SUBIRADE *et al.*, 1998; BARTH, 2007; CARBONARO *et al.*, 2008; PISTORIUS *et al.*, 2009; BONWELL & WETZEL, 2009; HERRERO *et al.*, 2012; SANTONI & PIZZO, 2013). Todavia, optou-se por realizar as PCAs estendendo até 1400 ondas.cm^{-1} , para abranger totalmente uma banda característica localizada próximo a 1500 ondas.cm^{-1} .

A Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil metabólico primário (*fingerprinting*) de proteínas possibilitou uma separação entre as variedades crioula (RS) e isogênicas (INGM, GMH e GMHR), a partir do cálculo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2), conforme na figura 17. A variabilidade dos dados é explicada, quase que exclusivamente por PC1 (99,37%), comparativamente ao PC2 (0,51%), sendo que ambos expressam 99,88% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS.

A variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a cultivar híbrida geneticamente modificada - evento TC1507 (GMH) - agruparam-se em PC1 positivo, opostamente observado para os híbridos não geneticamente modificados (INGM) e geneticamente modificados – evento TC1507 + NK 603 (GMHR) -, que agruparam-se em PC1 negativo. Nota-se que essa configuração na PCA para esses genótipos na faixa de proteínas é similar ao que foi observado na faixa de carboidratos (1200-800 ondas.cm^{-1}) para os mesmos genótipos.

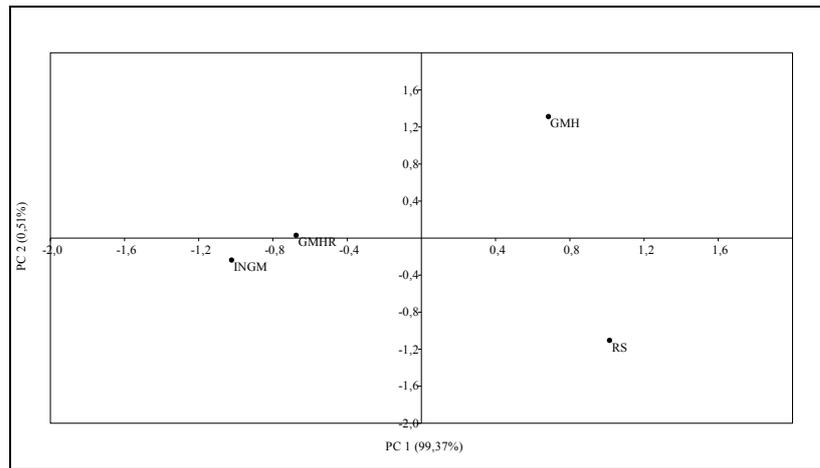


Figura 17: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

Por meio da análise de agrupamento entre os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, e como mencionado com a PCA, houve a formação de dois grupos distintos, tal como demonstrado no dendograma da figura 18. Assim, formou-se um grupo com os genótipos RS e GMH, e outro com os genótipos INGM e GMHR.

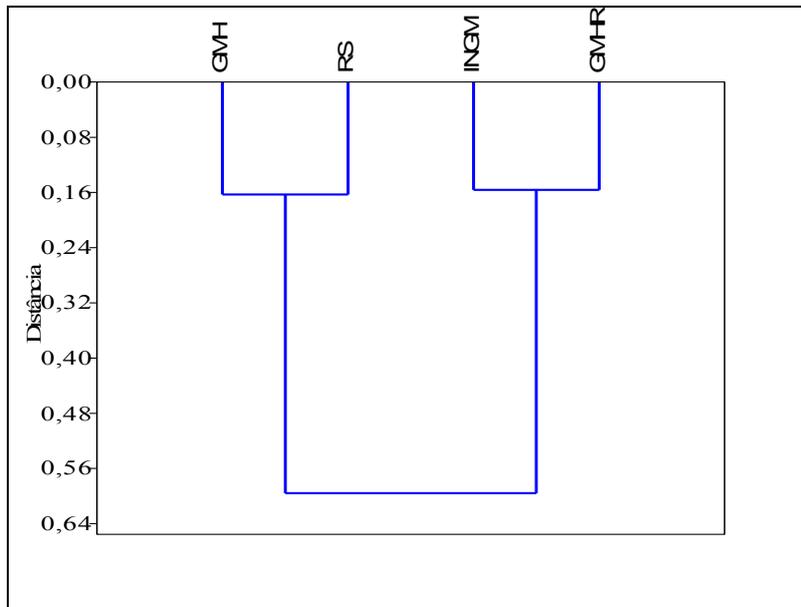


Figura 18: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9554.

O dendrograma da figura 18 revela que, aparentemente não seria a presença dos eventos a responsável pela separação dos tratamentos para as proteínas.

Na figura 19, nota-se a distribuição dos tratamentos INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS) ao longo do PC1 e PC2, que modelam 97,13% e 2,16% da variabilidade dos dados, respectivamente, ou seja, 99,29% da variação total dos dados espectrais de DRIFTS é explicada por esses dois componentes principais. A cultivar híbrida não geneticamente modificada (INGM) e o tratamento T4 (50% INGM + 50% RS) agruparam-se em PC1 negativo, enquanto a variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e os tratamentos T3 (75% INGM + 25% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS) agruparam-se em PC1 positivo.

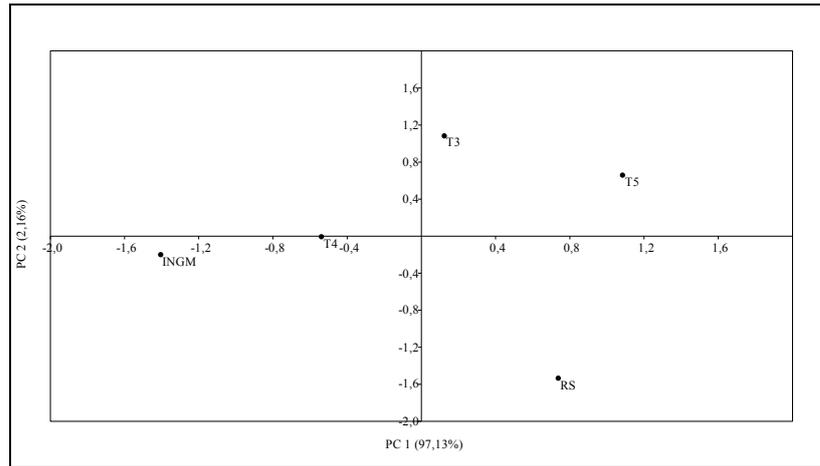


Figura 19: Dendograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

Analisando o dendograma da figura 20, com um corte entre as distâncias 0,24 e 0,32, houve a formação de três grupos. Um grupo formado pelos genótipos RS e T5, outro grupo formado pelos genótipos T3 e T4, e um último isoladamente formado pelo INGM.

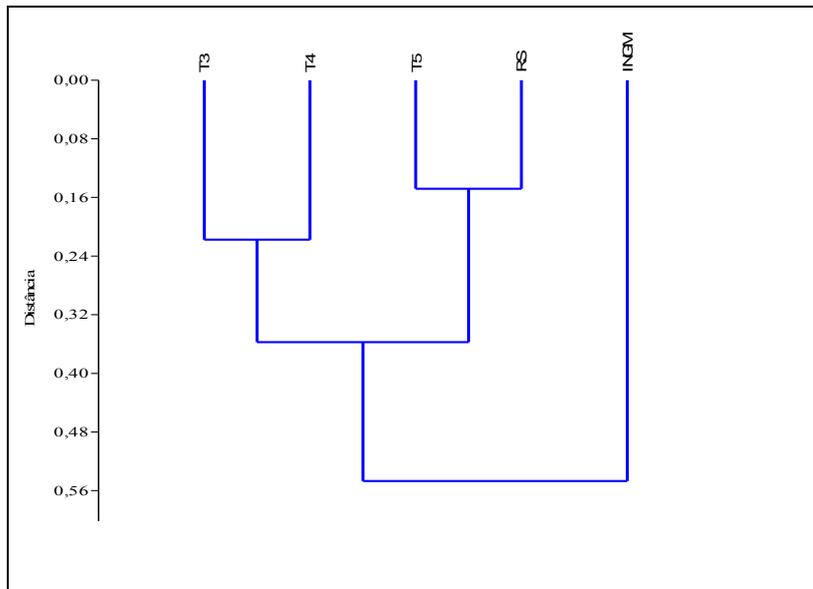


Figura 20: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,71.

De acordo com o dendrograma da figura 20, INGM distingue-se dos demais genótipos. Porém, utilizando esse ponto de corte (em torno da metade da maior distância), RS agrupou-se com o *background* portador de maior percentual médio de genes de RS (75%RS); os demais *backgrounds* (25 e 50% de INGM) agruparam-se entre si. Fica claro que os genes do INGM não conseguem alterar significativamente o comportamento das populações com diferentes *backgrounds* de RS no quesito proteínas.

De acordo com a PCA demonstrada na figura 21, da variação total dos dados espectrais de DRIFTS, os componentes principais 1 e 2 representam 99,73%. Contudo, comparando o perfil metabólico de proteínas de grãos inteiros de GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) não se obtém uma separação concreta dos

genótipos. A variedade crioula Rosado - Rajado (RS), a cultivar híbrida geneticamente modificada (GMH) e o tratamento T8 (50% GMH + 50% RS) agruparam-se em PC1 positivo, ao contrário do que foi observado para os tratamentos T7 (75% GMH + 25% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS), que se agruparam em PC1 negativo. Vale mencionar que quando os mesmos tratamentos são analisados na faixa espectral de carboidratos (1200-800 ondas.cm⁻¹), a configuração da PCA é semelhante.

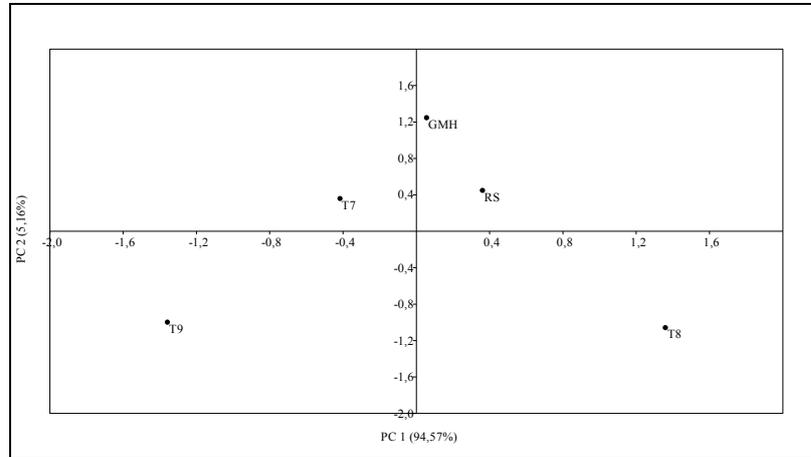


Figura 21: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

Pela análise do dendograma da figura 22, e realizando um corte entre as distâncias 0,09 e 0,12, os genótipos RS e GMH são similares entre si, e os demais tratamentos T7, T8, T9 são isoladamente distintos.

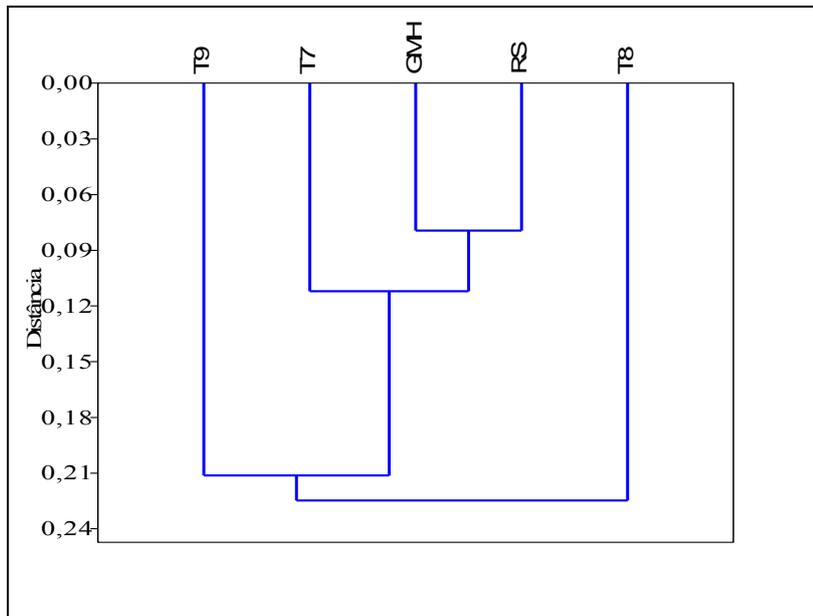


Figura 22: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7486.

Parece que neste caso do dendrograma da figura 22, nem a presença do evento, nem o efeito do *background* combinado ao evento explicam o agrupamento dos tratamentos para proteína.

Como pode ser observado na figura 23, a PCA dos genótipos GMHR, RS e os *backgrounds* genéticos entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS) agrupou-os diferentemente para as proteínas. A maior parte da variabilidade dos dados é definida por PC1 (99,59%) e PC2 (0,29%), sendo 99,88%o total da variação dos dados espectrais de DRIFTS. A cultivar híbrida geneticamente modificada (GMHR) e os tratamentos T11 (75% GMHR + 25% RS) e T12 (50% GMHR + 50% RS) agruparam-se em PC1 negativo, enquanto os tratamentos RS (Rosado-

Rajado) e T13 (25% GMHR + 75% RS) localizaram-se em PC1 positivo.

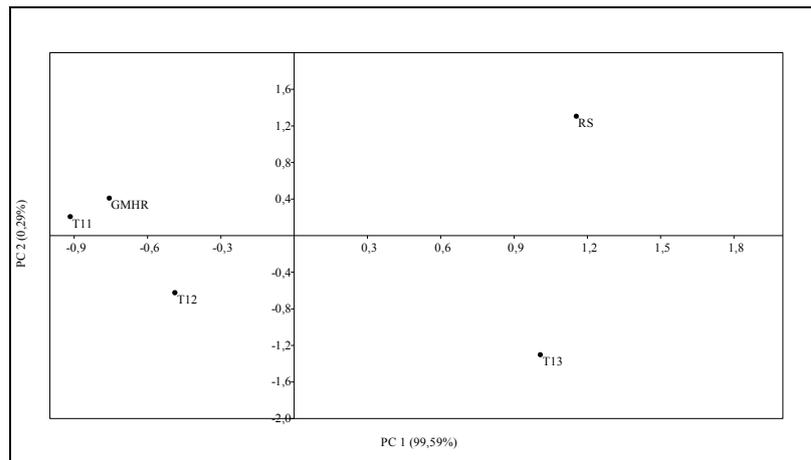


Figura 23: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS ($1650-1400 \text{ ondas.cm}^{-1}$) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Com a análise do dendrograma ilustrado na figura 24, a distribuição dos genótipos se deu em dois grupos, conforme mencionado pela PCA. Um grupo é formado pelos genótipos GMHR, T11 e T12 e outro por RS e T13. Vale destacar que a distribuição desses genótipos, pela análise de proteínas para grãos inteiros através do dendrograma e PCA, foram análogos ao da faixa de carboidratos ($1200-800 \text{ ondas.cm}^{-1}$) para os respectivos genótipos.

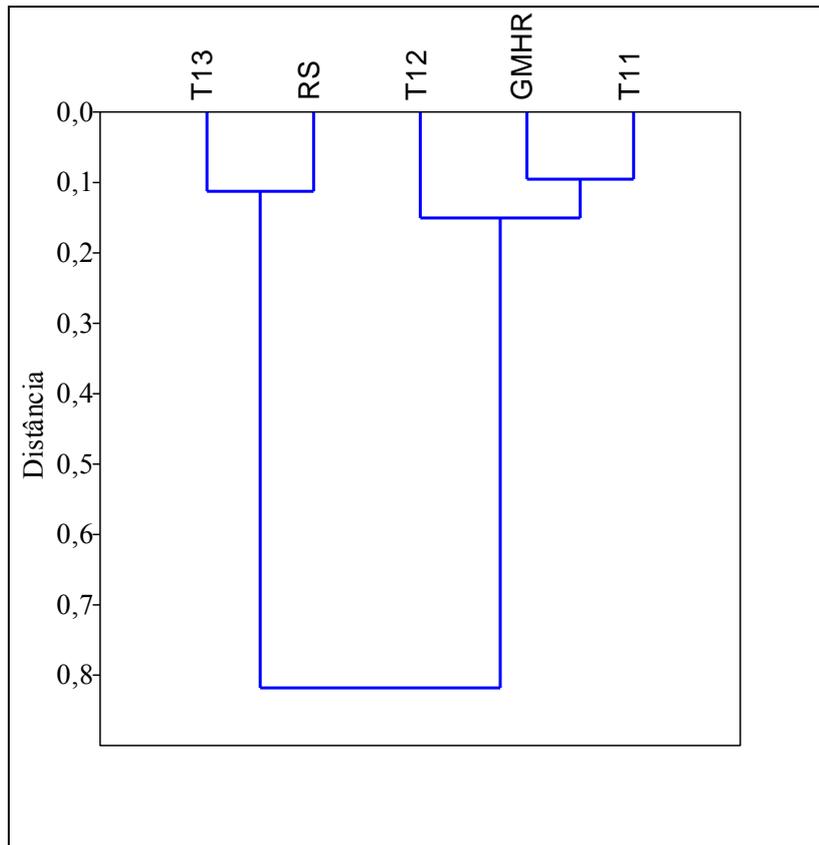


Figura 24: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9797.

De acordo com as PCAs, igualmente como ocorreu para a análise de carboidratos, não foi possível determinar as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para causarem as tais separações entre os genótipos, pois todos os números de ondas (cm⁻¹) na faixa de proteínas (1650-1400 ondas.cm⁻¹) influenciaram igualmente para as distinções entre os genótipos.

Igualmente como ocorreu em carboidratos de grãos inteiros, em proteínas foi observado um efeito gradativo de distanciamento entre tratamentos, que está relacionado à proporção média dos eventos (TC1507+ NK603), nas populações com diferentes *backgrounds*, ou seja, estão mais próximos ao genitor GMHR as populações com proporção média de genes 25%RS e 50%RS, nessa ordem, assim como ao genitor RS, apenas a população 75%RS se agrupou. Esse efeito gradativo e agrupamento não foram observados nas populações derivadas de RS e INGM.

A análise dos genitores mostrou que INGM e GMRH são mais similares entre si do que em relação aos demais genitores (GMH e RS). Isso sugere que o agrupamento das populações derivadas desses genitores em combinação com RS e dos seus respectivos genitores (75, 50 e 25% e seus respectivos genitores INGM ou GMHR) deveria ser similar, considerando ausência de efeito da presença dos transgenes. Contudo, observamos que os agrupamentos foram diferenciados. Esse comportamento diferenciado em função do híbrido envolvido no cruzamento com RS, aliado ao fato de existir efeito gradativo e crescente dos transgenes (eventos TC1507 + NK603) sobre a distância entre tratamentos à medida que a frequência média do *background* genético de RS aumenta, sugere que associado ao efeito da dose do transgenes, também pode existir um efeito diferenciado dos transgenes em combinação com o *background* de RS. Fato que também ocorreu para carboidratos.

Para proteínas, o comportamento foi similar ao que aconteceu com os carboidratos, na série de tratamentos envolvendo GMHR. A análise do grupo funcional das proteínas de grãos inteiros a partir dos tratamentos vinculados a GMHR também poderia ser usada para discriminar alterações de componentes desse grupo, em processos de contaminação por pólen do híbrido GMHR. Futuros estudos também poderiam usar as proteínas, em análises de grãos inteiros, para verificar quais componentes químicos deste grupo estariam sendo alterados a partir da contaminação com GMHR.

Lipídios (3000 - 2800 e 1750-1700 ondas. cm^{-1})

A presença de ácidos graxos pode ser detectada na faixa espectral de infravermelho entre 3000 - 2800 ondas. cm^{-1} (PISTORIUS *et al.*, 2009; HERRERO *et al.*, 2012). Outros autores também constataram sinal por

volta de $1740 \text{ ondas.cm}^{-1}$, relativos a éster C=O , típico desse metabólito primário (PISTORIUS *et al.*, 2009; SIVAM *et al.*, 2013).

A PCA do perfil metabólico primário (*fingerprinting*) de lipídios permitiu uma separação entre as variedades crioula (RS) e as cultivares isogênicas (INGM, GMH e GMHR), a partir do cálculo do PC1 e PC2, conforme figura 25. A variabilidade dos dados é explicada 98,8% por PC1, e 1,13% por PC2, sendo 99,93% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. Novamente, a variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a cultivar híbrida geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH) agruparam-se em PC1 positivo, e as cultivares não geneticamente modificada (INGM) e geneticamente modificada – evento TC 1507 + NK 603 (GMHR) se encontram em PC1 negativo. Como já mencionado anteriormente, os resultados das PCAs para esses genótipos na faixa de carboidratos ($1200\text{-}800 \text{ ondas.cm}^{-1}$) e proteínas ($1650\text{-}1400 \text{ ondas.cm}^{-1}$) são similares ao que foi observado na faixa de lipídios.

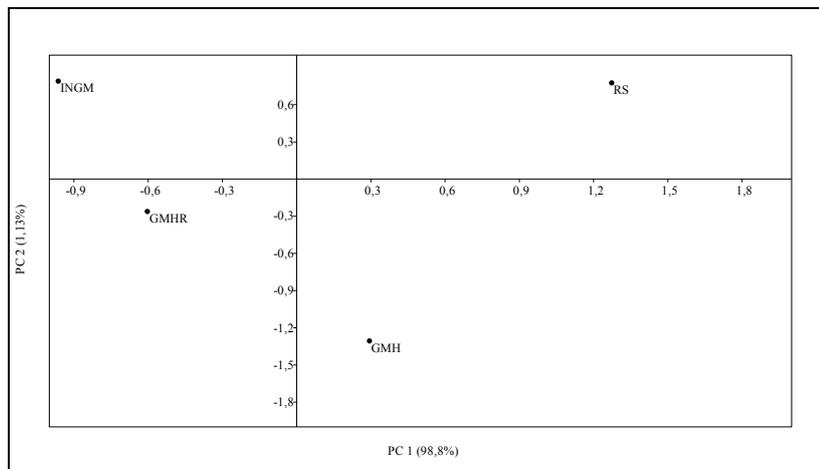


Figura 25: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS ($3000\text{-}2800$ e $1750\text{-}1700 \text{ ondas.cm}^{-1}$) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

Através do dendograma da figura 26, e com corte entre as distâncias 0,12 e 0,15, os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, distribuíram-se em três grupos. Um primeiro grupo composto pelos genótipos INGM e GMHR, um segundo e terceiro grupo formados isoladamente pelos genótipos GMH e RS. Aparentemente, a maior dose de eventos diferentes não afetou o agrupamento de grãos na faixa de lipídios, pois INGM e GMHR ficaram no mesmo grupo. Por outro lado, RS distinguiu-se dos demais genótipos.

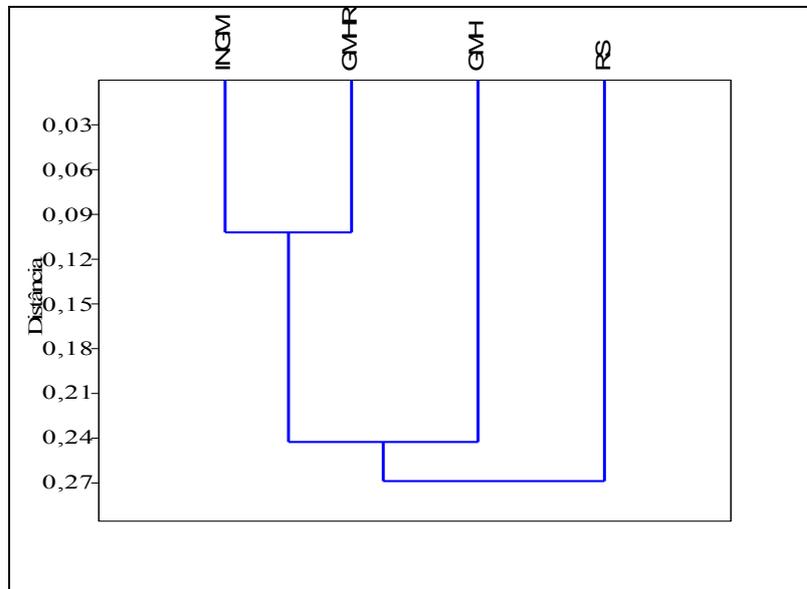


Figura 26: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9554.

Analisando o perfil metabólico de lipídios de grãos inteiros pela PCA dos genótipos INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS) pode-se aferir que não houve uma concreta separação

dos mesmos, segundo a figura 27. A variabilidade dos dados é explicada em grande parte por PC1 (98,92%), em menor parte por PC2 (0,85%), e os dois componentes juntos expressam 99,77% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. Igualmente ao ocorrido para a PCA desses genótipos na faixa de proteínas (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de grãos inteiros, a cultivar não geneticamente modificada (INGM) e o tratamento T4 (50% NGM + 50% RS) estão em PC1 negativo, e a variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e os tratamentos T3 (75% NGM + 25% RS) e T5 (25% NGM + 75% RS) em PC1 positivo.

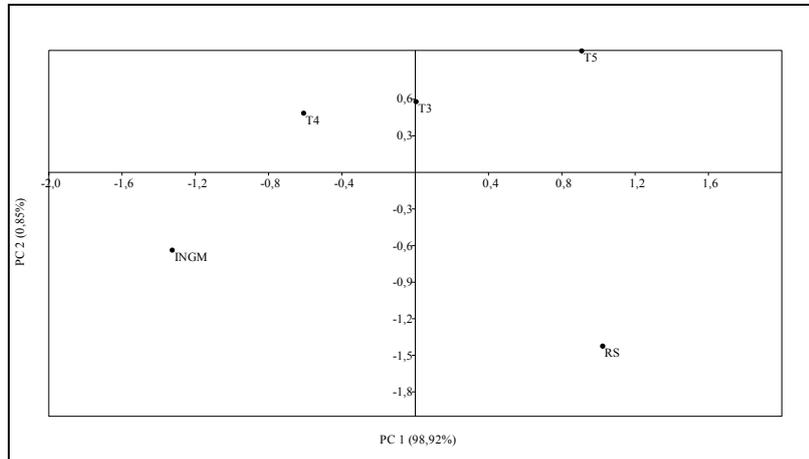


Figura 27: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

Através do dendograma dos genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5 (Figura 28), com corte entre as distâncias 0,08 e 0,12, houve a formação de quatro grupos. Um grupo formado por RS e T5, e os demais, INGM, T3 e T4 se distinguindo isoladamente.

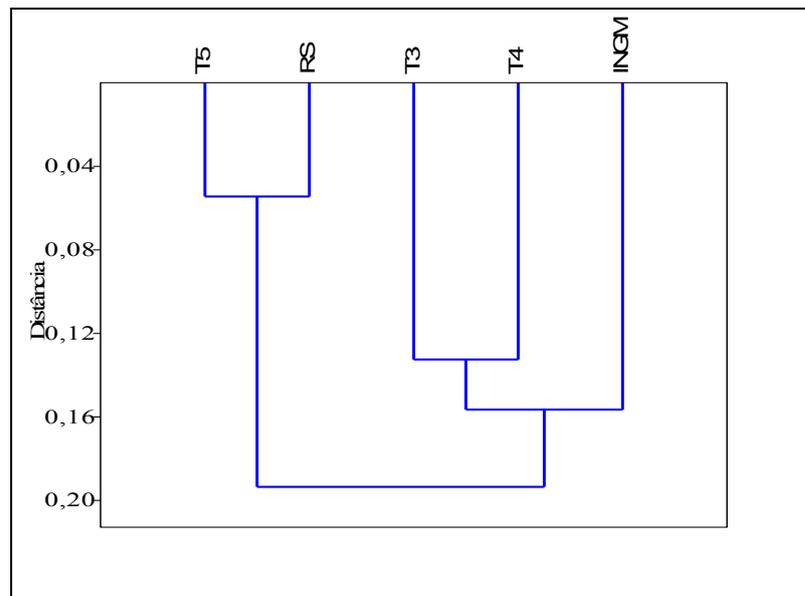


Figura 28: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7055.

A PCA dos genótipos GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) obteve a seguinte distribuição conforme figura 29. A variedade crioula Rosado - Rajado (RS) e o tratamento T8 (50% GMH + 50% RS) agruparam-se em PC1 positivo, e a GMH e os tratamentos T7 (75% GMH + 25% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS) em PC1 negativo. Do total da variação dos dados espectrais de DRIFTS (99,38%), o PC1 explicou (92,47%) e o PC2 (6,91%).

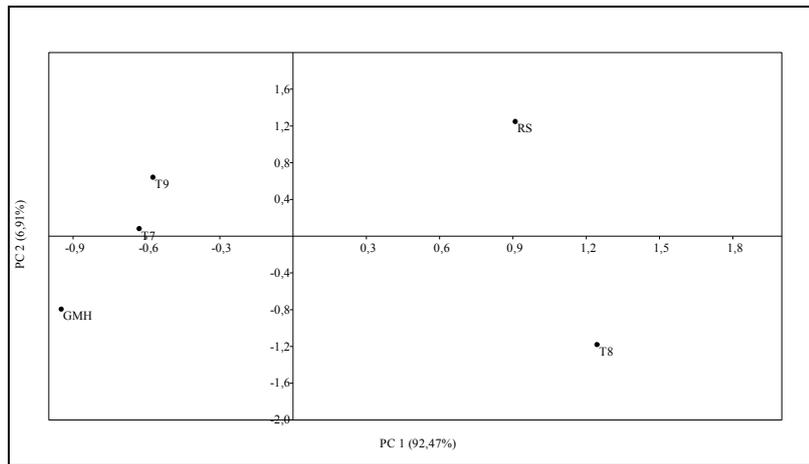


Figura 29: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

O agrupamento dos genótipos RS, GMH, T7, T8 e T9 está ilustrado no dendograma da figura 30. Um corte entre as distâncias 0,06 e 0,09 possibilita a formação de três grupos, sendo um grupo constituído por GMH, T7 e T9, um segundo por T8, e o terceiro grupo por RS.

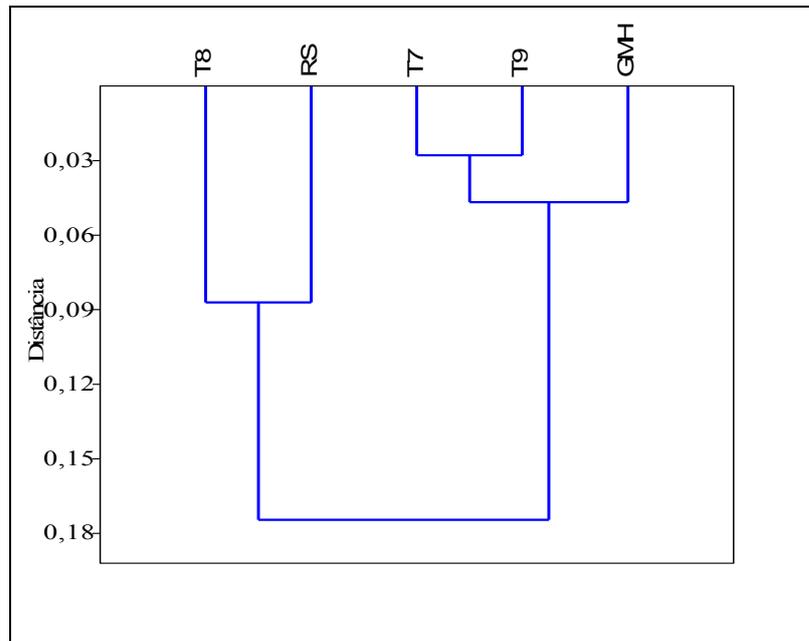


Figura 30: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9613.

Quando analisamos os genótipos GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS), a configuração da PCA para a faixa espectral de lipídios (Figura 31) é similar ao que foi encontrado para as faixas de carboidratos (1200-800 ondas.cm^{-1}) e proteínas (1650-1400 ondas.cm^{-1}). A variabilidade dos dados é dada na sua grande maioria por PC1 (99,65%), sendo 99,88% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A isogênica geneticamente modificada (GMHR) e os tratamentos T11 (75% GMHR + 25% RS) e T12 (50% GMHR + 50% RS) localizaram-se em PC1 negativo, estando os tratamentos RS (Rosado-Rajado) e T13 (25% GMHR + 75% RS) em PC1 positivo.

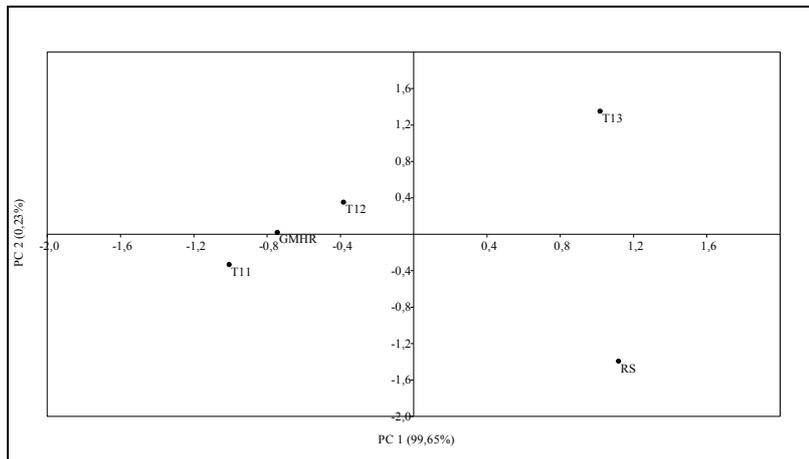


Figura 31: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Com base na análise de dendograma da figura 32, houve nitidamente a formação de dois grupos. Um primeiro grupo formado pelos genótipos RS e T13, e outro pelos materiais GMHR, T11 e T12. Essa configuração de separação entre esses genótipos já foi relatada igualmente quando analisamos carboidratos (1200-800 ondas.cm⁻¹) e proteínas (1650-1400 ondas.cm⁻¹) em grãos inteiros.

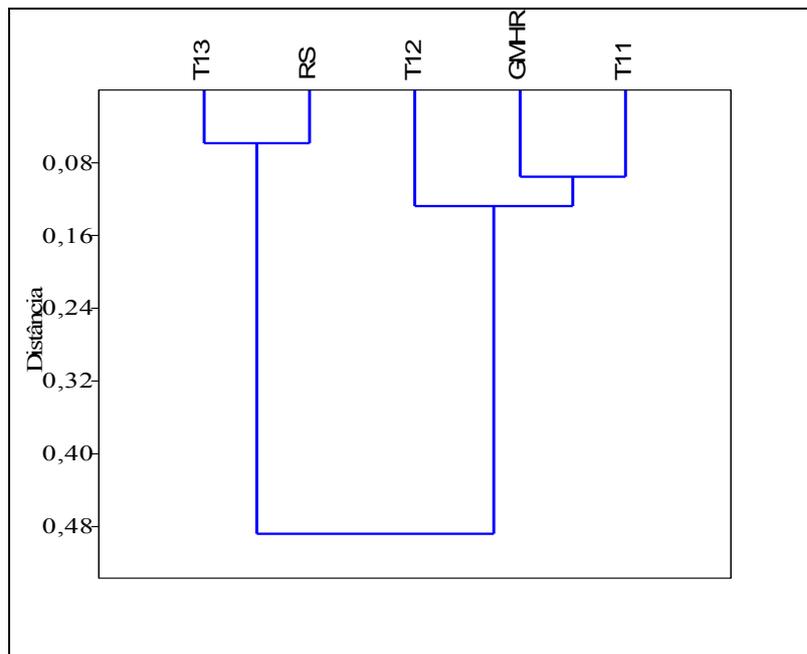


Figura 32: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9573.

Com base nas PCAs na faixa de lipídios, as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para as separações dos respectivos genótipos foram na faixa de 1750-1700 ondas.cm^{-1} .

De acordo com o dendrograma da figura 32, NK603 sozinho ou a combinação e interação dele com TC1507 deve ser responsável por esse comportamento consistente em todos os grupos funcionais.

No caso dos lipídios, sem eventos envolvidos, ficou claro que agrupou-se com RS a população portadora de maior percentual médio de genes de RS, assim ficando RS no mesmo grupo do tratamento que, em média, possuía 75% dos genes de RS, e os demais (25% e 50% RS agruparam-se com INGM). Isso também ocorreu para os tratamentos

envolvendo RS e GMHR. Note que, nesse caso, quando o *background* do híbrido ocorre em baixa frequência na população, esta se agrupa com o genitor RS, independentemente de o outro genitor ser INGM ou GMHR. Por isso, não decorre do efeito dos transgenes e sim dos genes do próprio milho derivados do híbrido.

No entanto, RS puro difere dos demais híbridos puros (GMH, GMHR e INGM), mas a partir da contaminação por pólen de qualquer híbrido, já resultaria em mudanças no grupo dos lipídios, independente dos eventos estarem presentes.

O grupo funcional constituído pelos lipídios em grãos inteiros não seria um bom indicador para acompanhar as mudanças decorrentes das contaminações recorrentes de variedades crioulas por pólen de milhos GMs.

Poli(fenóis) (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹)

A existência simultânea de bandas na faixa espectral de infravermelho em 2000-1700 e 900-690 ondas.cm⁻¹ indica presença de compostos com anéis aromáticos, como os (poli)fenóis (SILVERSTEIN, 1994; LAMBERT, 2001; XU *et al.* 2005; KUHNEN, 2007). Para Schulz & Baranska (2007), bandas entre 900-500 ondas.cm⁻¹ também são indicativos de existência de compostos aromáticos, como os flavonóides. Todavia, os compostos aromáticos, segundo Silverstein (1994) e Lambert (2001), também são detectados em sinais de banda em 633 ondas.cm⁻¹.

A figura 33 mostra a distribuição da variedade crioula (RS) e híbridos isogênicos (INGM, GMH e GMHR), segundo o cálculo do PC1 e PC2, a partir da faixa metabólica de poli(fenóis). De acordo com a PCA, houve uma separação entre os genótipos, onde a variabilidade dos dados é explicada 90,1% por PC1 e 8,21% por PC2, sendo ambos responsáveis por 98,31% o total da variação dos dados espectrais de DRIFTS. Novamente como ocorreu nas outras PCAs, em análises de carboidratos, proteínas e lipídios, a variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a cultivar híbrida geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH), localizaram-se em PC1 positivo, e as cultivares isogênicas não geneticamente modificada (INGM) e a geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603 (GMHR), em PC1 negativo.

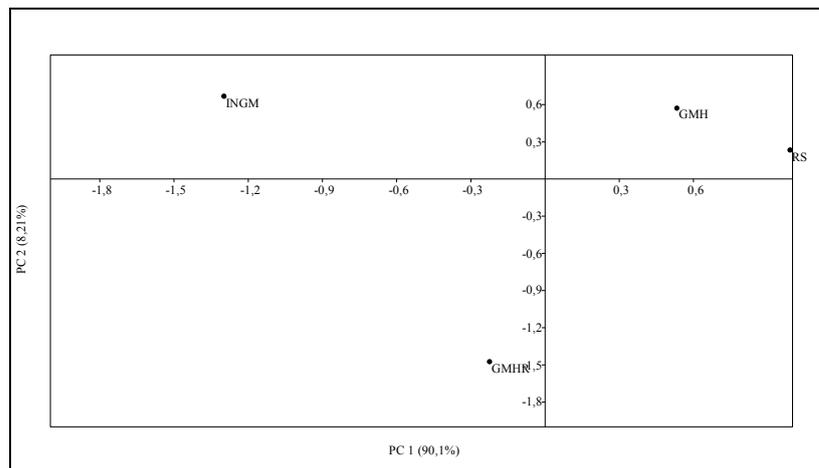


Figura 33: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

O dendograma desses genótipos pode ser visualizado na figura 34. Considerando o corte entre as distâncias 0,6 e 0,9, os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR se mostraram isoladamente heterogêneos entre si.

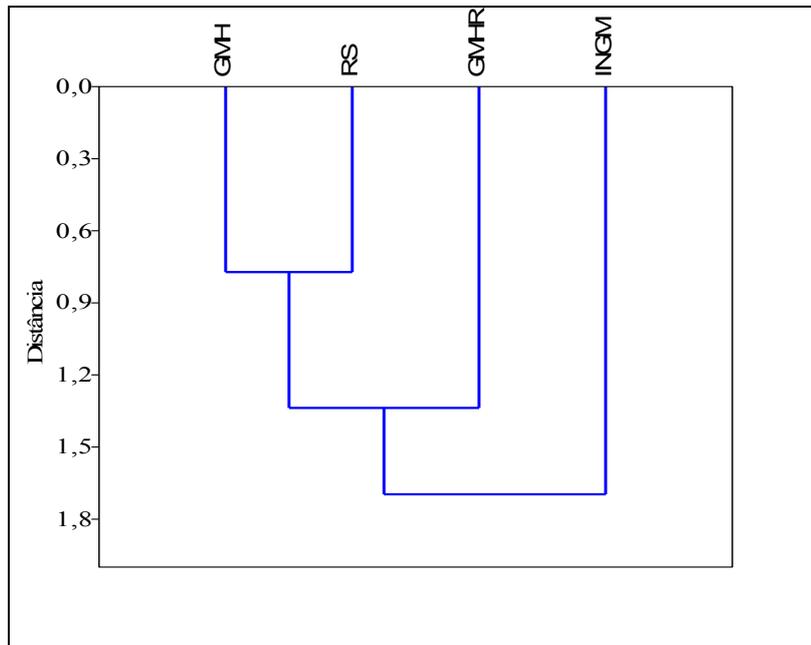


Figura 34: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8135.

Quando analisamos os genótipos NGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% NGM + 50% RS; T5 - 25% NGM + 75% RS), o perfil de origem poli(fenólica) de grãos inteiros pela PCA, configura-se conforme figura 35. A variabilidade dos dados é explicada na sua maioria por PC1 (92,95%), seguido por PC2 (3,63%), e ambos explicando 96,58% do total da variação dos dados espectrais de DRIFTS. A distribuição dos genótipos na PCA da figura 35 se deu da mesma forma ao que ocorreu para a PCA da faixa de proteínas e lipídios para os respectivos materiais, estando a cultivar híbrida isogênica não geneticamente modificada (INGM) e o tratamento T4 (50% INGM + 50% RS) em PC1 negativo, e a variedade

crioula Rosado – Rajado (RS) e os tratamentos T3 (75% INGM + 25% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS), em PC1 positivo.

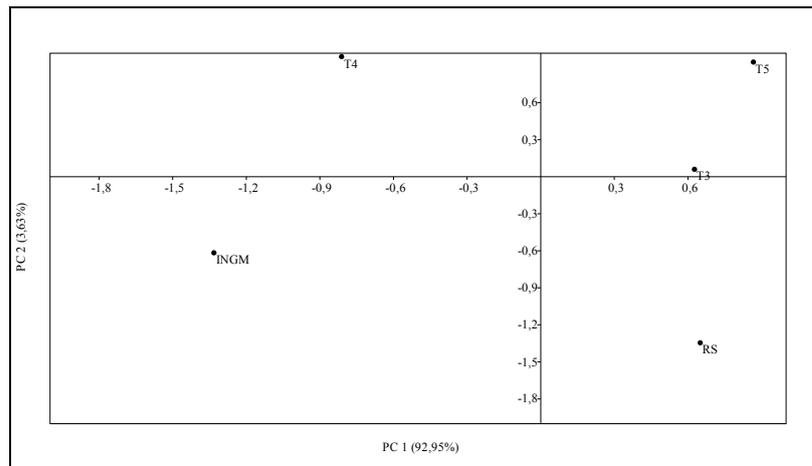


Figura 35: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas. cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

A análise de agrupamento para os genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5 possibilitou um dendograma ilustrado na figura 36. Realizando um corte entre as distâncias 0,9 e 1,2, houve a formação de dois grupos similares entre os membros, sendo RS, T3 e T5 pertencentes a um grupo, e INGM e T4, se agrupando em um segundo grupo.

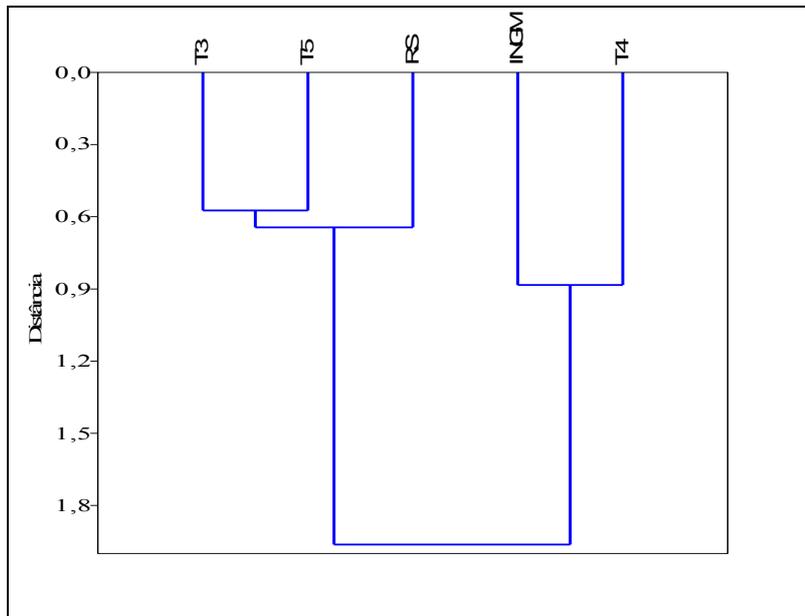


Figura 36: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9505.

A PCA do perfil metabólico de poli(fenóis) de grãos inteiros dos genótipos GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) está demonstrado na figura 37. A variabilidade dos dados é explicada por PC1 (49,14%), e por PC2 (42,55%), sendo 91,59% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado - Rajado (RS), a cultivar GMH e o tratamento T8 (50% GMH + 50% RS) agruparam-se em PC1 positivo, e os tratamentos T7 (75% GMH + 25% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS) em PC1 negativo.

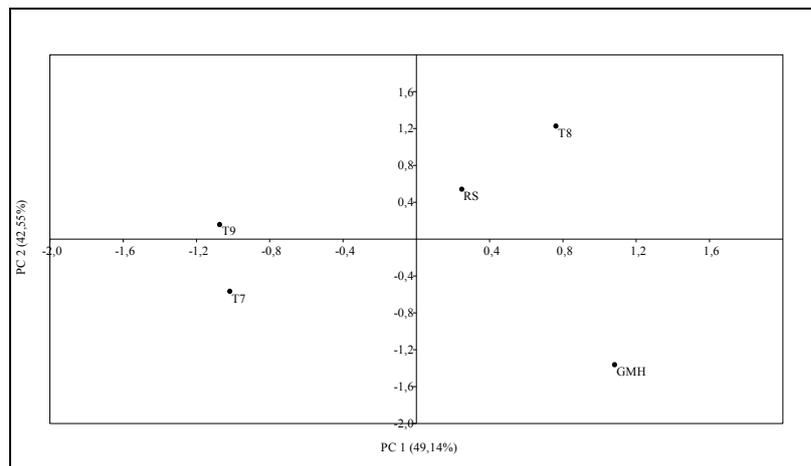


Figura 37: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

Na figura 38, está apresentado o dendograma dos genótipos RS, GMH, T7, T8 e T9, que com corte na distância de 0,36, estes se dividiram em quatro grupos. Um grupo similar entre si formado pelos genótipos T7 e T9, e os outros três, RS, GMH e T8, completando isoladamente os outros grupos.

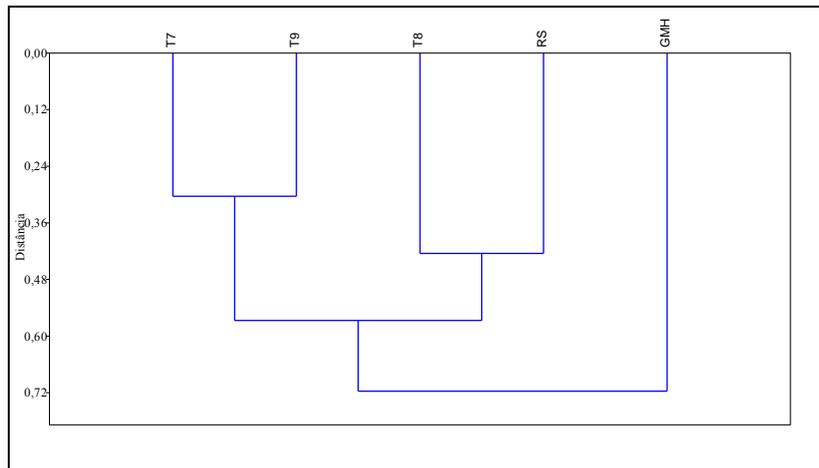


Figura 38: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8747.

Finalizando as PCAs de grãos inteiros no perfil metabólico de poli(fenóis), os genótipos GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS) foram analisados, e a PCA está apresentada na figura 39. Comparando com as PCAs de carboidratos, proteínas e lipídios, esses mesmos genótipos se distribuem semelhantemente ao longo da PC1. A cultivar isogênica geneticamente modificada (GMHR) e o tratamento T11 (75% GMHR + 25% RS) em PC1 negativo, e os genótipos RS (Rosado-Rajado), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS), em PC1 positivo. A variabilidade dos dados é dada por PC1 (81,13%) e PC2 (15,59%), sendo 96,72% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS.

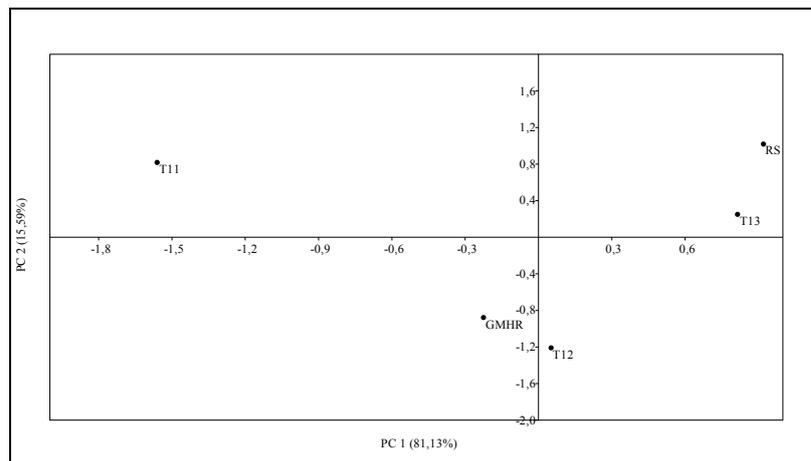


Figura 39: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 +NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Com o dendograma ilustrado na figura 40, e realizando um corte entre as distâncias 1,2 e 1,6, os genótipos se distribuíram em três grupos. Um grupo formado unicamente pelo genótipo T11, outro grupo pelos materiais GMHR e T12, e um terceiro grupo, mais similar entre si, formado por RS e T13.

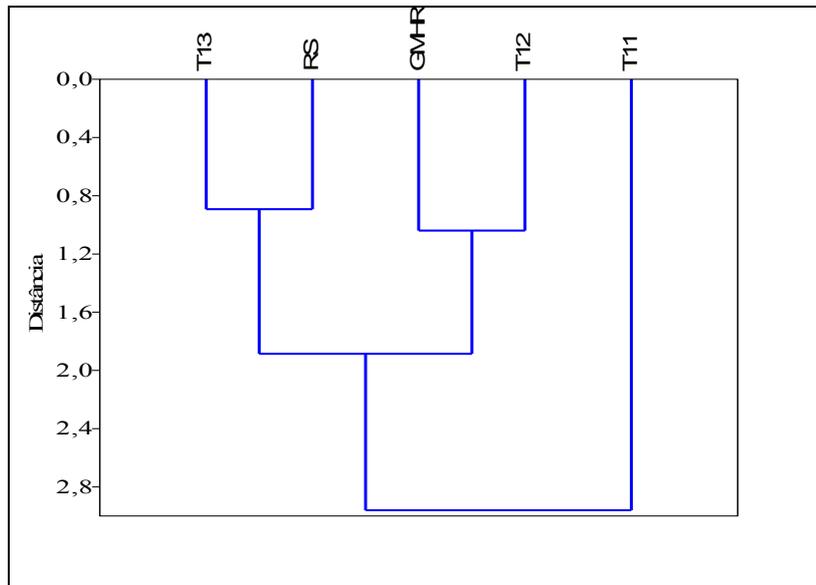


Figura 40: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos inteiros de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9135.

Nas PCAs na faixa de poli(fenóis) não foi possível determinar as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para causarem as distinções entre os genótipos, pois todos os números de ondas dessa faixa metabólica (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) influenciaram igualmente para essas separações entre os genótipos.

O grupo funcional constituído pelos (poli)fenóis em grãos inteiros não seria um bom indicador para acompanhar as mudanças decorrentes das contaminações recorrentes de variedades crioulas por pólenes de milhos GMs.

Análise de grãos degerminados

O perfil espectral das farinhas de grãos degerminados de milho por DRIFTS está apresentado na figura 41.

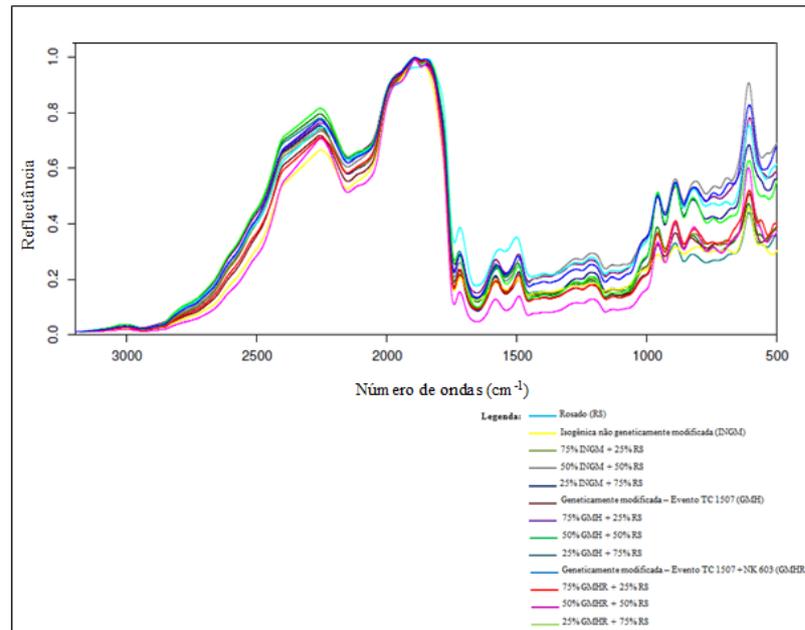


Figura 41: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm^{-1}) de farinhas de grãos degerminados de milho de todos os genótipos.

Perfil espectral (3200-500 ondas. cm^{-1})

A partir do cálculo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2), conforme demonstrado na figura 42, a maioria da variabilidade dos dados é explicada por PC1 (63,54%), comparativamente ao PC2 (24,68%). Contudo, ambos expressaram 88,22% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS para a análise do perfil espectral de grãos degerminados, sendo que os genótipos não tiveram um nítido agrupamento ao longo do PC1 e PC2.

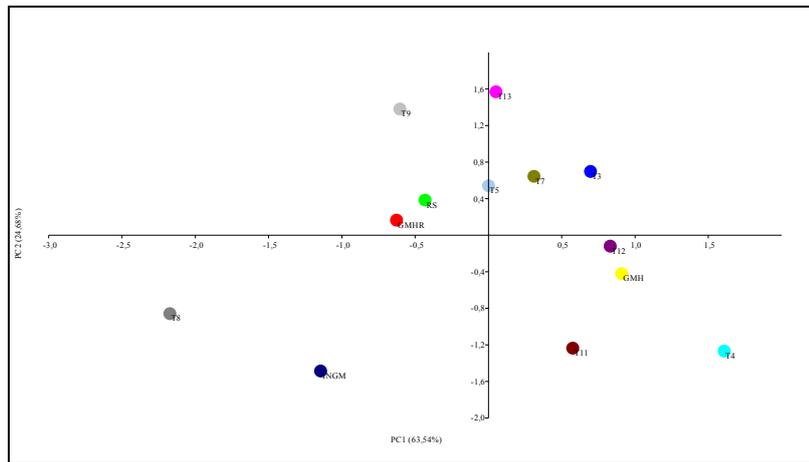


Figura 42: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm^{-1}) de farinhas de grãos degerminados de milho de todos os genótipos. RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507), GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK 603), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS), T9 (25% GMH + 75% RS), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

A análise de agrupamento entre todos os genótipos está demonstrada na figura 43. Com linha de corte entre as distâncias 0,6 e 0,9, houve a formação de um grupo com os genótipos T3 (75% INGM + 25% RS) e T7 (75% GMH + 25% RS), e os demais genótipos formaram grupos independentes entre si.

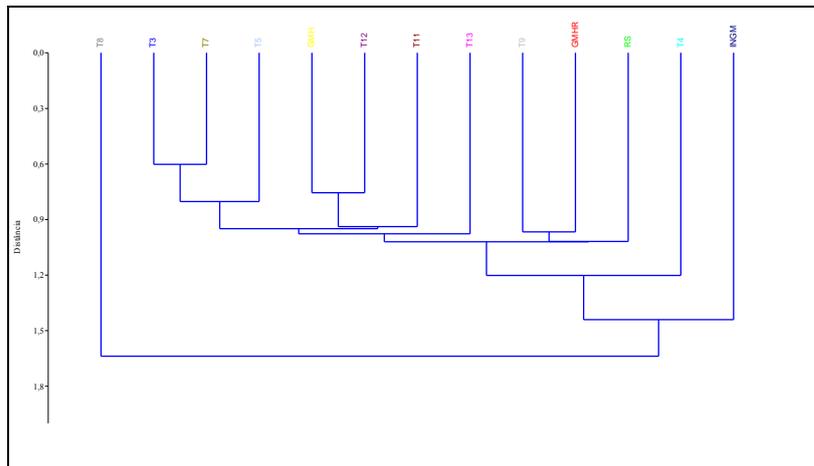


Figura 43: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de todos os genótipos. Coeficiente de correlação cofenética = 0,78.

Nas análises do perfil espectral infravermelho de grãos degerminados selecionaram-se os maiores constituintes presentes nesse tecido, como o amido, proteínas e poli(fenóis). De acordo com Watson (1987) *apud* FAO (1992), quando analisamos grãos degerminados, as constituições químicas, na sua grande maioria, são de amido (87,64%) e proteína (8%). Segundo Shukla & Cheryan (2001), no endosperma os dois principais tipos de proteínas, classificadas com base em sua solubilidade, são as zeínas e glutelinas. Concomitantemente avaliando grãos degerminados tem-se a presença do pericarpo, onde há nesse tecido uma maior concentração de pigmentação, tais como os poli(fenóis) (KUHNNEN, 2007).

Carboidratos (1200-800 ondas.cm⁻¹)

A PCA envolvendo as variedade crioula (RS) e cultivares híbridas isogênicas (INGM, GMH e GMHR), com base no perfil metabólico de carboidratos para os grãos degerminados, possibilitou uma distribuição desses genótipos, como apresentado demonstrado na

figura 44. A maior parte da variabilidade dos dados é explicada por PC1 (86,23%), comparando ao PC2 (12,83%), onde ambos expressaram 99,06% do total da variação dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a cultivar híbrida geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH) agruparam-se em PC1 positivo, contrariamente ao observado para as cultivares isogênicas não geneticamente modificada (INGM) e a geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603 (GMHR), que localizam-se em PC1 negativo. Quando esses genótipos foram comparados na faixa de carboidratos (1200-800 ondas.cm⁻¹), porém para grãos inteiros, a distribuição em PCA foi semelhante ao longo do PC1.

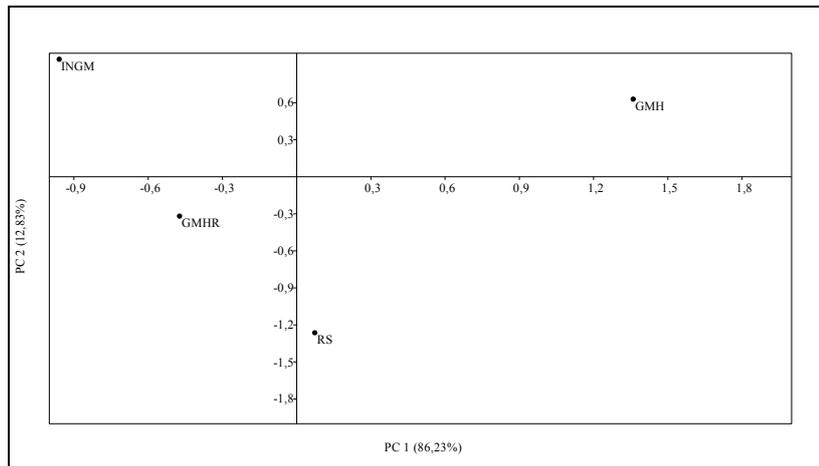


Figura 44: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

Na figura 45 está representando o dendrograma dos genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, que com corte entre as distâncias 0,4 e 0,5 houve a formação de dois grupos. O genótipo GMH isoladamente está num grupo, e RS, INGM e GMHR em outro grupo.

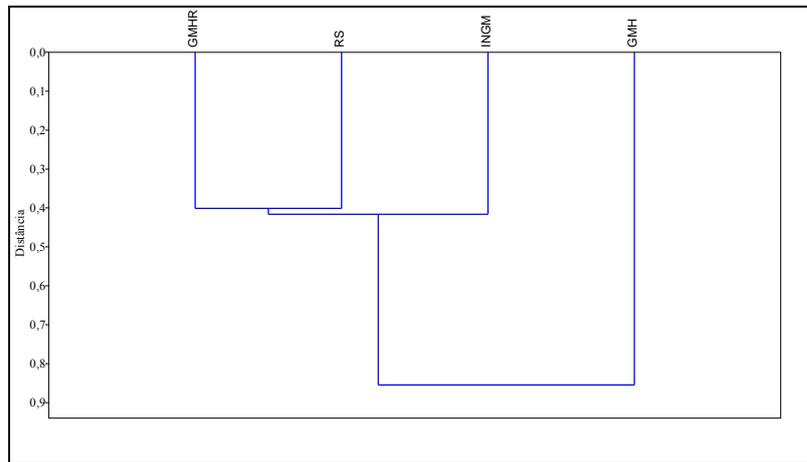


Figura 45: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8385.

O perfil metabólico de carboidratos de grãos degerminados para os genótipos INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS) está representado pela PCA na figura 46. A maioria da variação dos dados é explicada por PC1 (92,59%), seguido de PC2 (6,78%); ambos expressam 99,37% da variação total dos dados espectrais de DRIFTS. Os genitores variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a cultivar isogênica não geneticamente modificada (INGM) estão em PC1 negativo, e os cruzamentos T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS), em PC1 positivo.

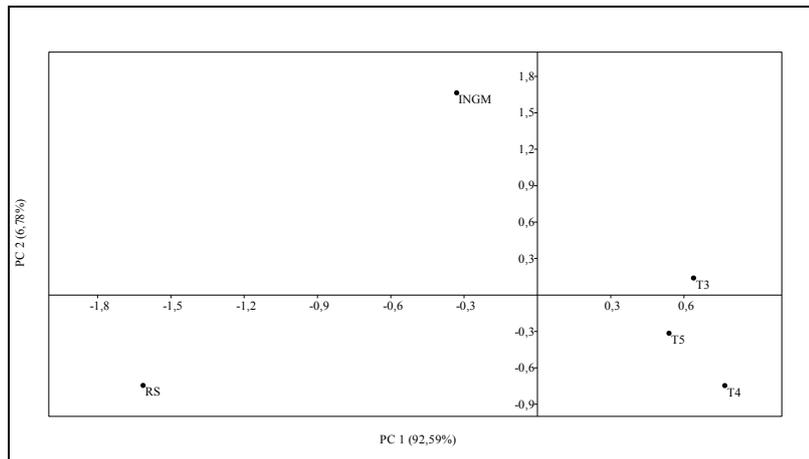


Figura 46: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

A partir do dendograma da figura 47, e corte entre as distâncias 0,6 e 0,9, os genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5 foram subdivididos em três grupos. Um grupo mais similar entre si pelos genótipos T3, T4 e T5, e os outros dois genótipos, INGM e RS, formando dois grupos heterogêneos isolados.

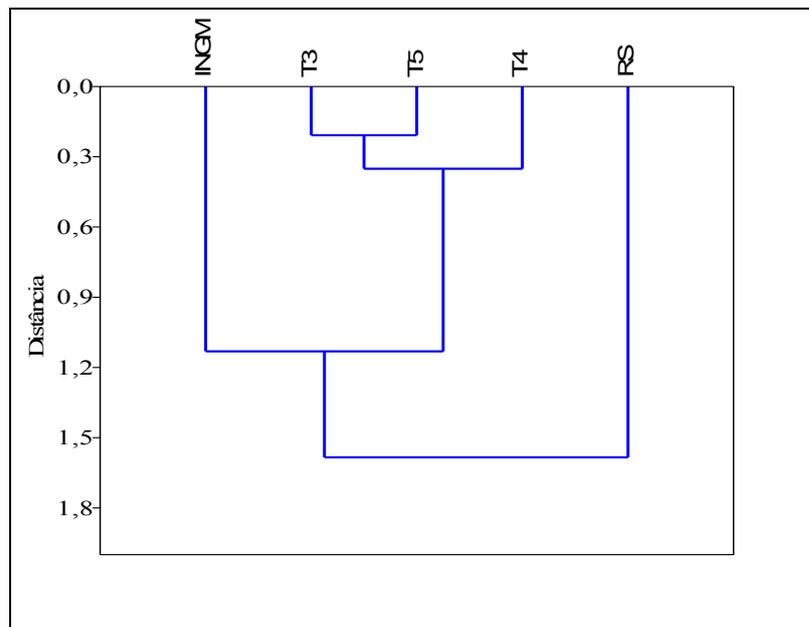


Figura 47: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9341.

Considerando o perfil metabólico de carboidratos de grãos degerminados, realizou-se a PCA envolvendo os genótipos GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS), como ilustrado na figura 48. A variabilidade dos dados é explicada, quase que unicamente, por PC1 (99,05%), e menos por PC2 (0,52%); ambos os componentes juntos expressam 99,57% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado - Rajado (RS), a cultivar isogênica geneticamente modificada (GMH) e o tratamento T7 (75% GMH + 25% RS) agruparam-se em PC1 positivo, e os genótipos T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS), em PC1 negativo.

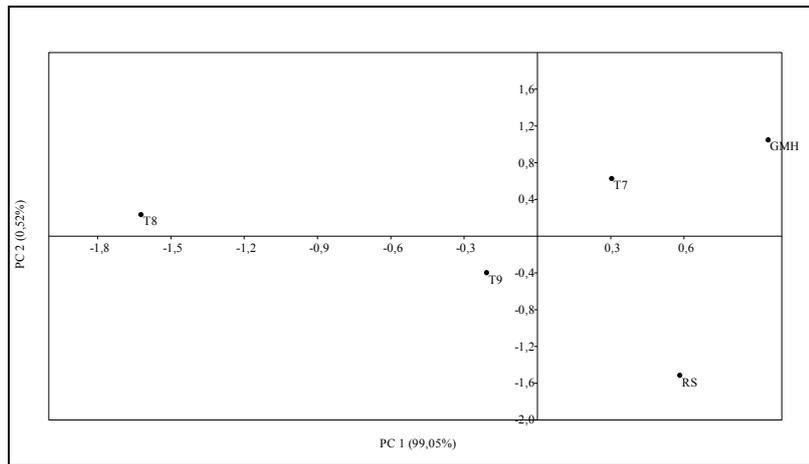


Figura 48: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

A análise de agrupamento dos genótipos RS, GMH, T7, T8 e T9 está representado no dendograma da figura 49. Com a linha de corte entre as distâncias 0,4 e 0,6, pode-se observar a existência de dois grupos. Assim, um grupo é similarmente formado pelos genótipos RS, GMH, T7 e T9, e isoladamente, tem-se o genótipo T8 na formação do segundo grupo.

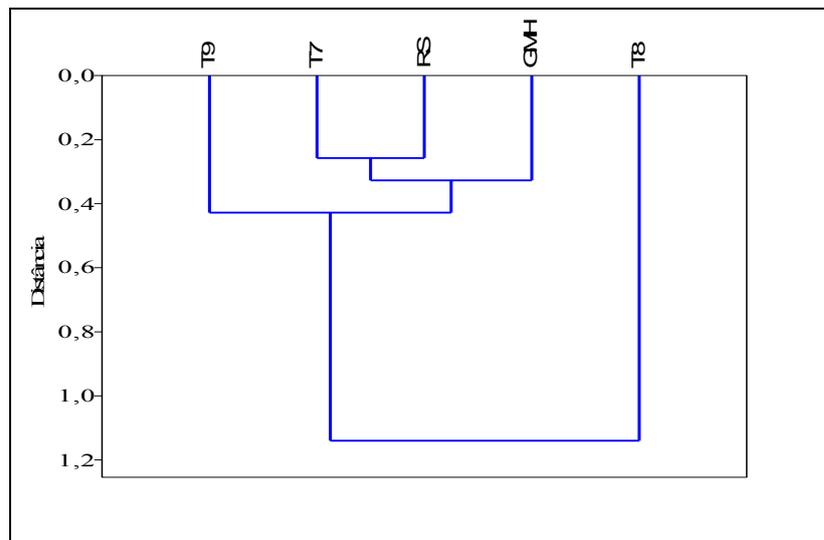


Figura 49: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9124.

A figura 50 está ilustrando a PCA com base no perfil metabólico de carboidratos de grãos degerminados dos genótipos GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS). A explicação da variabilidade dos dados por PC1 é 85,12%, e por PC2 é 11,42%, sendo 96,54% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A cultivar isogênica geneticamente modificada (GMHR) e os genótipos T11 (75% GMHR + 25% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS) estão em PC1 negativo, contrariando ao que foi observado para os genótipos RS (Rosado-Rajado) e T12 (50% GMHR + 50% RS), que localizam-se em PC1 positivo.

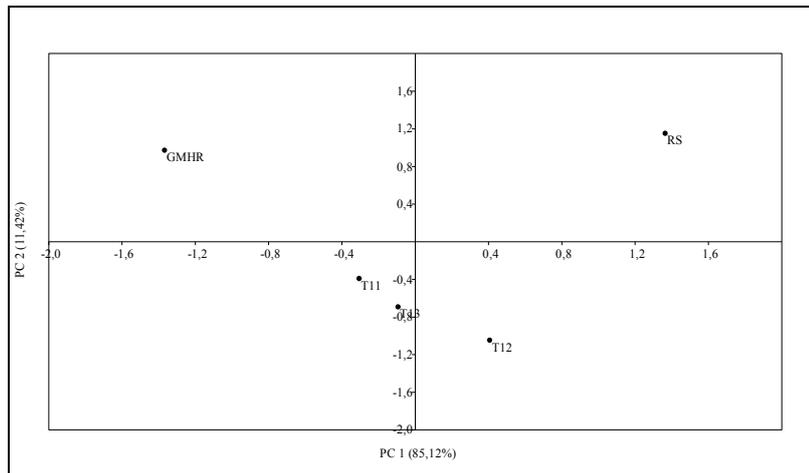


Figura 50: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Examinando o dendograma da figura 51 e realizando um corte entre as distâncias 0,3 e 0,4, houve a formação de quatro grupos envolvendo os genótipos RS, GMHR, T11, T12 e T13. Um grupo foi constituído pelos genótipos T11 e T13, e os demais grupos, isoladamente formados pelos genótipos GMHR, RS e T12.

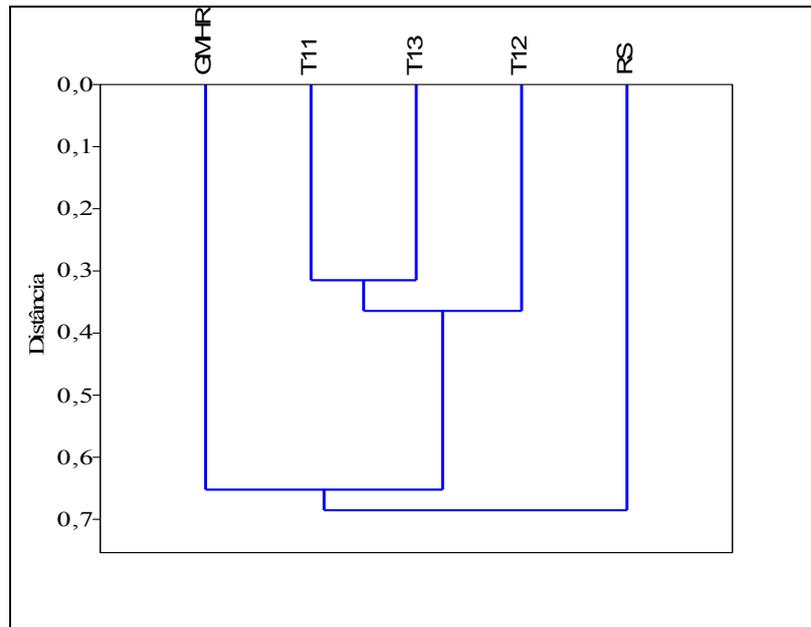


Figura 51: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1200-800 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7787.

Analisando grãos degerminados na faixa de carboidratos, os *backgrounds* não são próximos nem de RS nem de INGM, indicando um efeito de interação entre os genes de *Zea mays* dos dois genitores, produzindo populações com perfis metabólicos distintos. Isso pode ser confirmado pelo mesmo comportamento observado nos tratamentos derivados de RS e GMHR. Isso mostra efeito de interação entre alelos de milho presente nos dois genitores, independentemente da presença dos transgenes.

Através das PCAs na faixa de carboidratos de grãos degerminados, as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para as distinções dos respectivos genótipos foram na faixa de 1000-800 ondas.cm⁻¹.

Proteínas (1650 – 1400 ondas. cm^{-1})

A PCA do perfil metabólico primário de proteínas para os grãos degerminados permitiu uma clara separação entre as variedades crioula (RS) e isogênicas (INGM, GMH e GMHR), a partir do PC1 e PC2, conforme na figura 52. A variabilidade dos dados explicada por PC1 é de 95,67%, e por PC2 é 3,46%, sendo que ambos juntos expressam 99,13% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado – Rajado (RS) localiza-se em PC1 positivo, e as cultivares isogênicas não geneticamente modificada (INGM), geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH) e a geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603 (GMHR) agruparam-se em PC1 negativo.

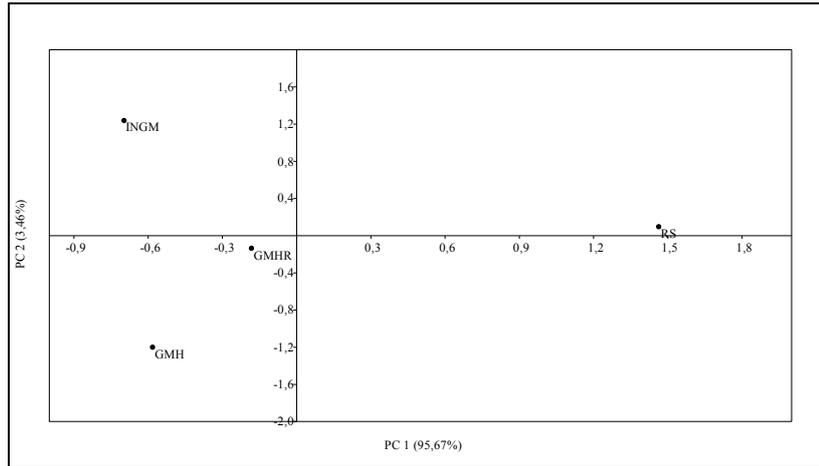


Figura 52: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas. cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

Por meio da análise de agrupamento entre os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, é possível verificar que houve a formação de dois grupos diferentes como demonstrado no dendograma da figura 53.

Um grupo, homogêneo entre si, formado pelos genótipos INGM, GMH e GMHR, e outro, isoladamente formado pelo genótipo RS.

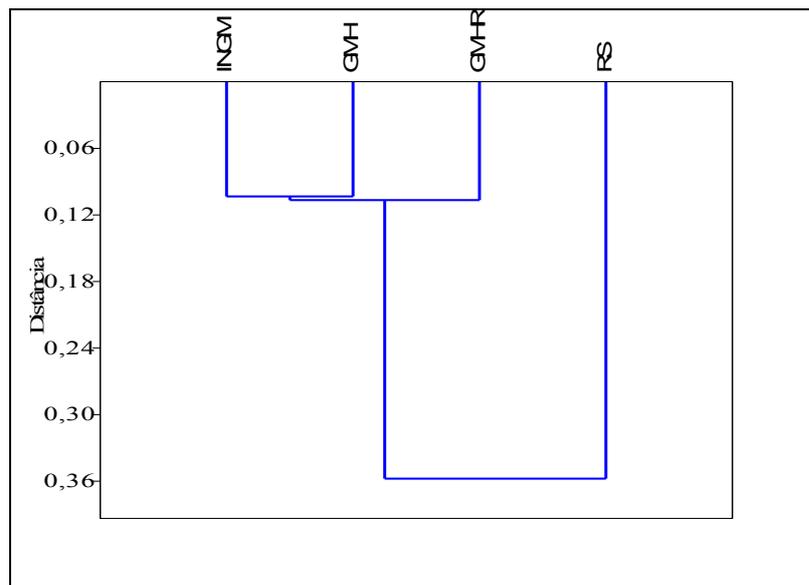


Figura 53: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507+ NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9757.

A distribuição, por meio da PCA, dos genótipos INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS) está ilustrada na figura 54. O PC1 e PC2 explicam 95,42% e 3,92% da variabilidade dos dados, respectivamente, ou seja, 99,34% da variação total dos dados espectrais de DRIFTS é explicada por esses dois componentes principais. A variedade isogênica não geneticamente modificada (INGM) e os tratamentos T3 (75% INGM + 25% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS) agruparam-se em PC1 positivo, contudo, a variedade crioula

Rosado – Rajado (RS) e o tratamento T4 (50% INGM + 50% RS) estão em PC1 negativo.

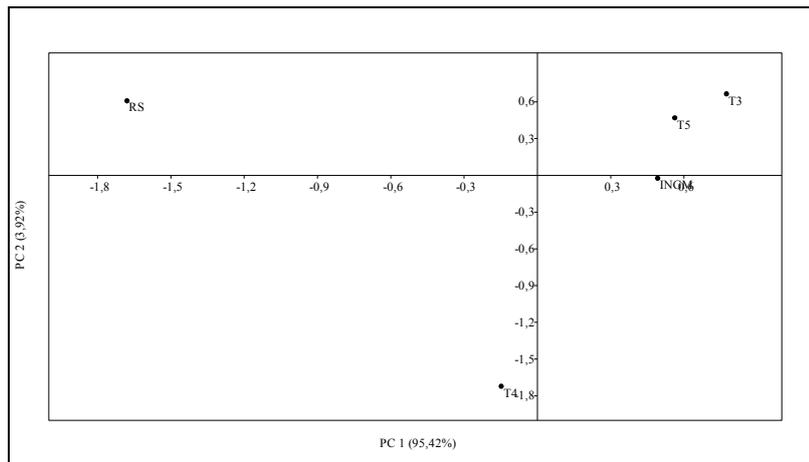


Figura 54: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

Considerando o dendograma da figura 55, com corte entre as distâncias 0,3 e 0,4, os genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5 dividem-se em dois grupos. Um grupo formado pelos genótipos INGM, T3, T4 e T5, e há um grupo isolado formado pela variedade crioula Rosado-Rajado (RS).

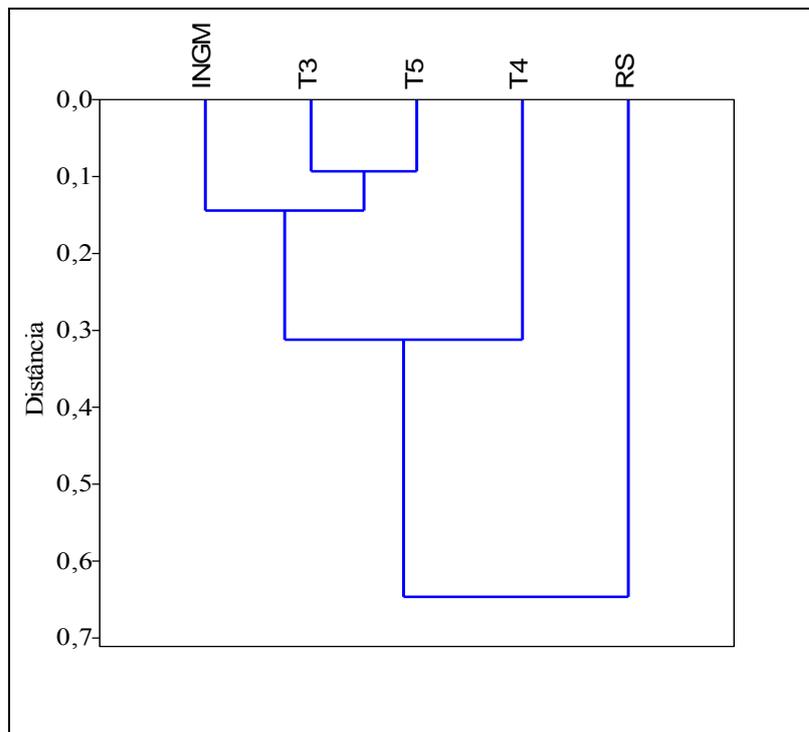


Figura 55: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas. cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9641.

Baseada no perfil metabólico de proteínas de grãos degerminados, a PCA dos genótipos GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) está demonstrada na figura 56. A isogênica geneticamente modificada (GMH) e os tratamentos T7 (75% GMH + 25% RS) e T8 (50% GMH + 50% RS) agruparam-se em PC1 negativo, o oposto do que foi observado para a variedade crioula Rosado - Rajado (RS) e o tratamento T9 (25% GMH + 75% RS) que localizaram-se em PC1 positivo. Da variação total dos dados espectrais de DRIFTS, os componentes principais 1 e 2 explicam 99,61% .

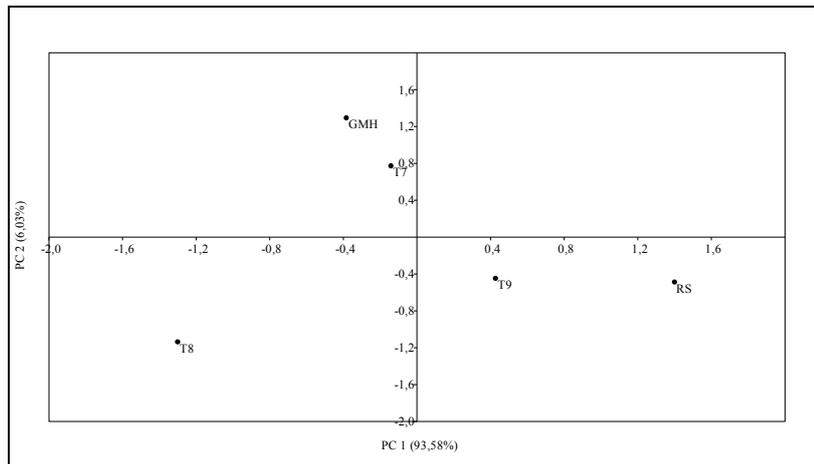


Figura 56: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

Pela análise do dendograma da figura 57, e realizando um corte entra as distâncias 0,20 e 0,25, os genótipos GMH e T7 são similares entre si, distanciando dos genótipos RS, T8, T9 que isoladamente são distintos.

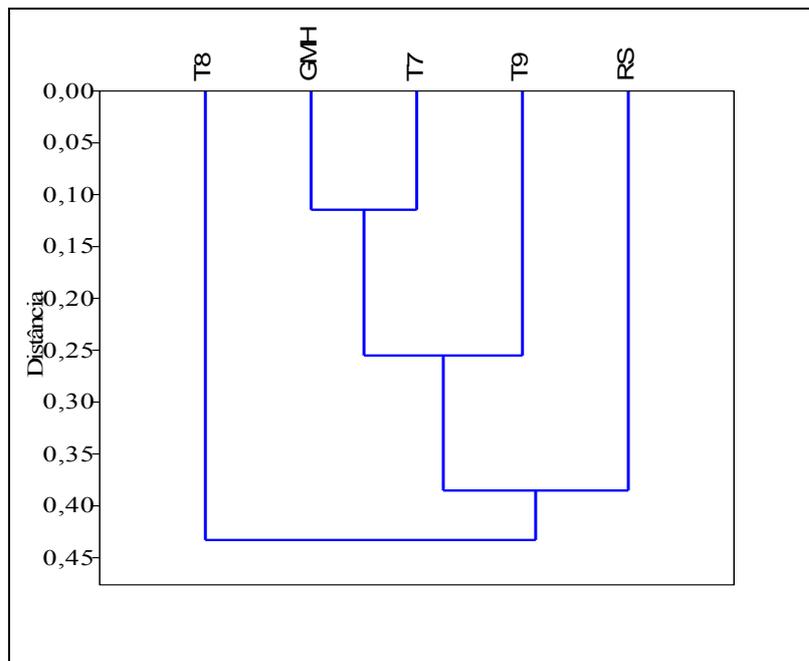


Figura 57: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,727.

Como pode ser observado na figura 58, a PCA dos genótipos GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS) obteve uma nítida separação entre os genótipos. A maioria da explicação da variabilidade dos dados é dada por PC1 (98,76%), e juntos, PC1 e PC2, explicam 99,79% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. O híbrido isogênico geneticamente modificado (GMHR) e os tratamentos T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS) agruparam-se em PC1 negativo, opostamente observado para a variedade crioula Rosado-Rajado (RS), que se localiza PC1 positivo.

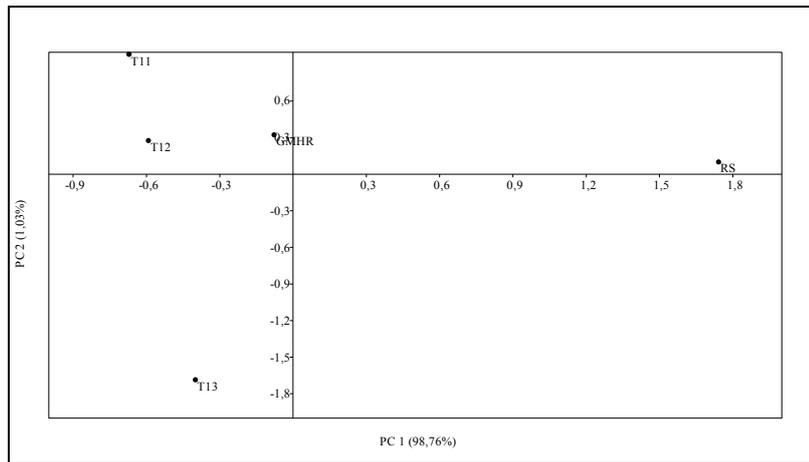


Figura 58: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Conforme dendograma da figura 59, a distribuição dos genótipos GMHR, RS, T11, T12 e T13 ocorre em dois grupos. Um grupo, similar entre si, formado pelos genótipos GMHR, T11, T12 e T13, e outro, formado unicamente pelo genótipo RS.

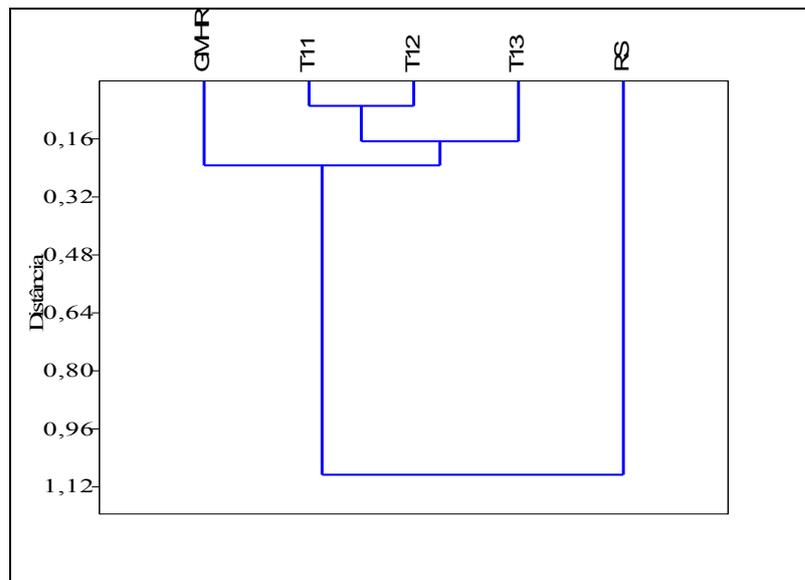


Figura 59: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS ($1650-1400 \text{ ondas.cm}^{-1}$) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 +NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,985.

Igualmente ao ocorrido com a análise de proteínas em grãos inteiros, por meio das PCAs não foi possível determinar as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para causarem as distinções entre os genótipos.

Poli(fenóis) ($2000-1700$ e $700-500 \text{ ondas.cm}^{-1}$)

A figura 60 exibe a distribuição das variedades crioula (RS) e das cultivares isogênicas (INGM, GMH e GMHR), segundo o cálculo do PC1 e PC2, a partir da faixa metabólica de poli(fenóis). A variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a híbrida geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH) localizaram-se em PC1 positivo, e as cultivares

isogênicas não geneticamente modificada (INGM) e a geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603 (GMHR), em PC1 negativo. De acordo com a PCA, a variabilidade dos dados é explicada 70,74% por PC1, e 28,15% por PC2, sendo 98,89% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. Comparando a PCA dessa mesma faixa metabólica - poli(fenóis), porém de grãos inteiros, pode-se observar que os respectivos genótipos distribuem semelhantemente ao longo do eixo do PC1.

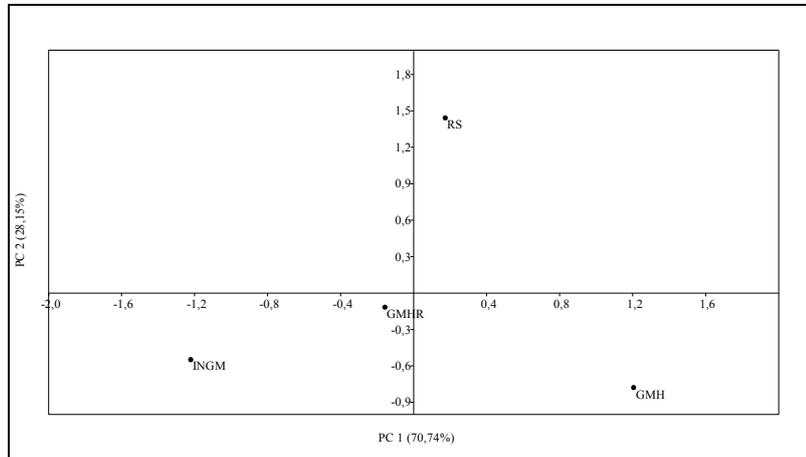


Figura 60: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

O dendograma dos genótipos RS, INGM, GMH e GMHR pode ser visualizado na figura 61, que por meio do corte entre as distâncias 0,64 e 0,80, os genótipos se mostram isoladamente distintos na faixa metabólica de poli(fenóis) de grãos degerminados.

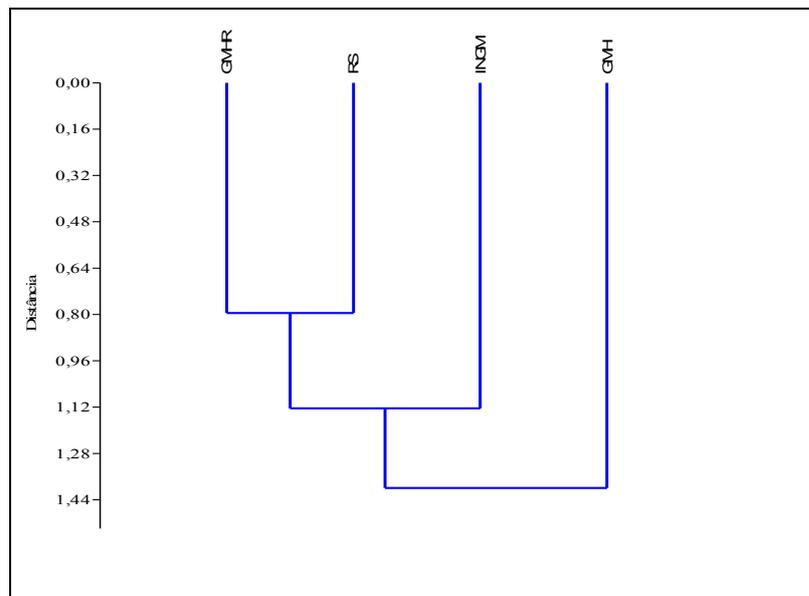


Figura 61: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,63.

Analisando os genótipos INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS), o perfil poli(fenólico) de grãos degerminados pela PCA, apresenta-se conforme figura 62. A variabilidade dos dados é explicada na sua maioria por PC1 (94,48%), sendo o PC2 (3,57%), e 98,05% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado Rajado (RS) e a cultivar isogênica não geneticamente modificada (INGM) localizaram-se em PC1 negativo, e os cruzamentos T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS), contrariamente, em PC1 positivo.

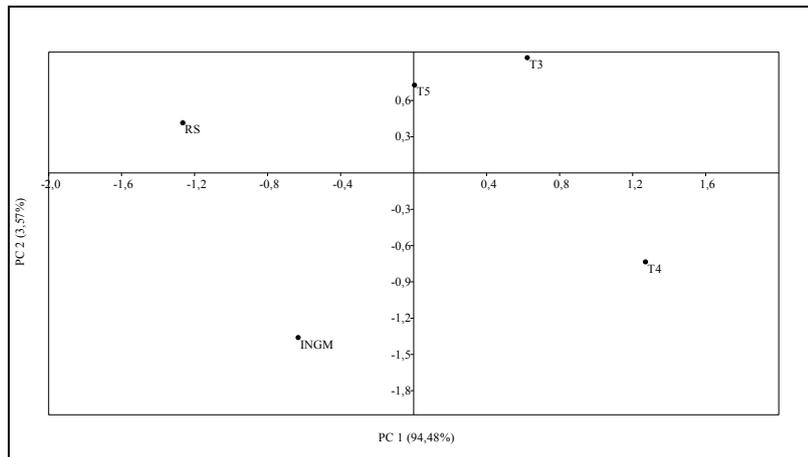


Figura 62: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

A análise de agrupamento para os genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5 permitiu um dendograma conforme o dendograma da figura 63. Ao realizar um corte entre as distâncias 0,8 e 1,2, somente os genótipos T3 e T5 se agrupam, e os demais são isoladamente distintos entre si.

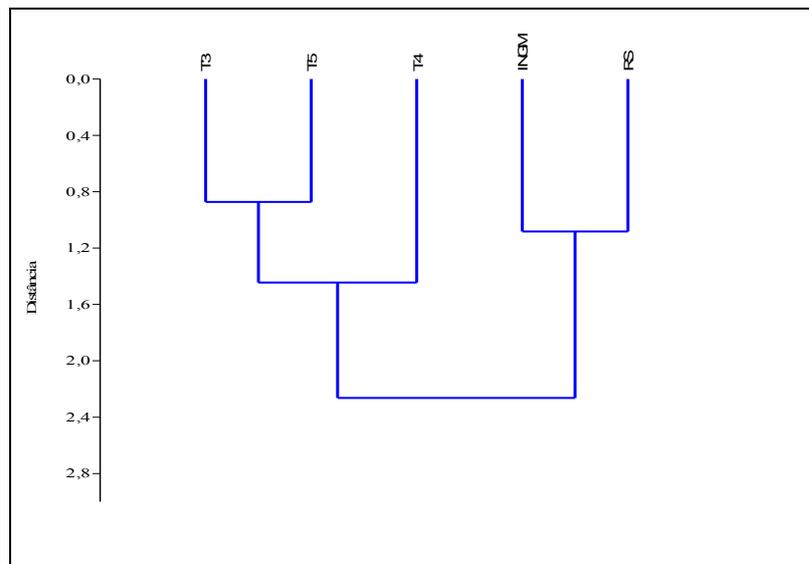


Figura 63: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,64.

De acordo com perfil metabólico de poli(fenóis) de grãos degerminados dos genótipos GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) pode-se observar a PCA conforme figura 64. A variabilidade dos dados é explicada por PC1 (82,70%), e por PC2 (15,83%), sendo 98,53% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado - Rajado (RS), a GMH e o genótipo T7 (75% GMH + 25% RS) agruparam-se em PC1 positivo, entretanto, os genótipos T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS) em PC1 negativo.

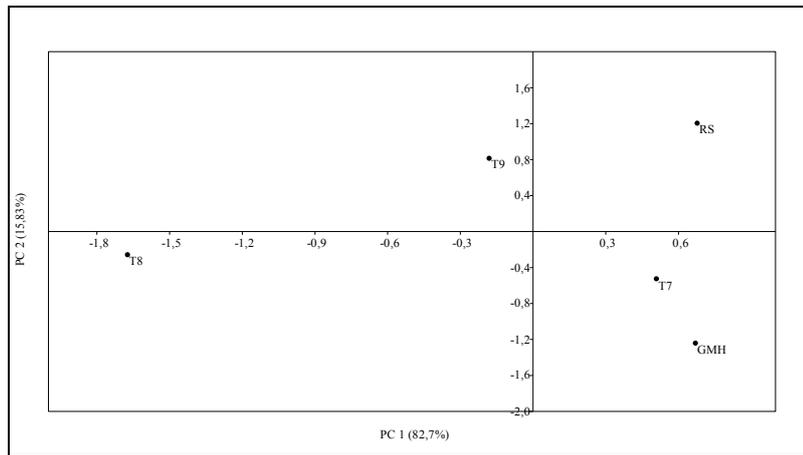


Figura 64: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

Na figura 65 está apresentado o dendograma dos genótipos RS, GMH, T7, T8 e T9, que com corte entre as distâncias 0,6 e 0,9 há a formação de quatro grupos. Um grupo similar entre si formado pelos genótipos GMH e T7, e os outros três, RS, T8 e T9 formando isoladamente os outros grupos.

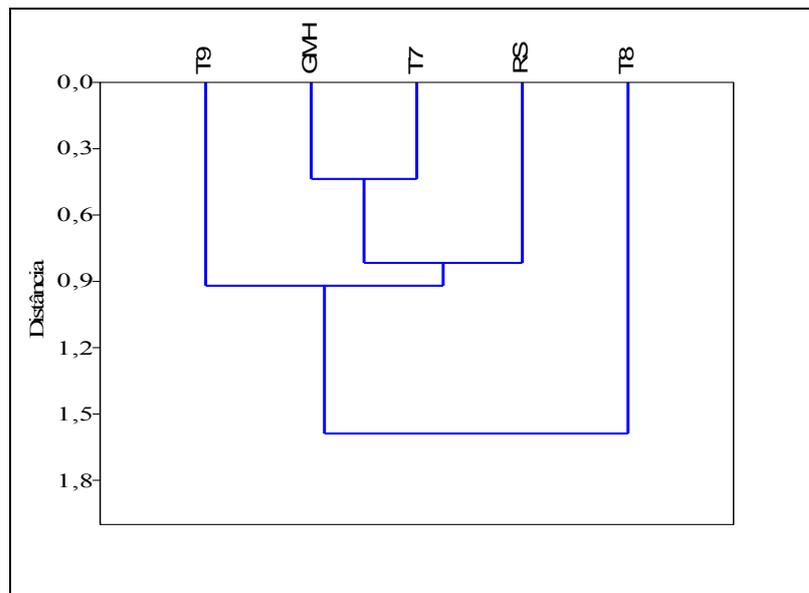


Figura 65: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9323.

Completando as PCAs de grãos degerminados no perfil metabólico de poli(fenóis), os genótipos GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS) foram analisados, e a PCA está demonstrada na figura 66. Há uma clara separação entre os genótipos, onde a cultivar isogênica geneticamente modificada (GMHR) e os genótipos T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS) estão em PC1 negativo, e isoladamente em PC1 positivo, está localizado o genótipo RS (Rosado-Rajado). A variabilidade dos dados é dada por PC1 (61,69%) e PC2 (35,47%), sendo 97,16% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS.

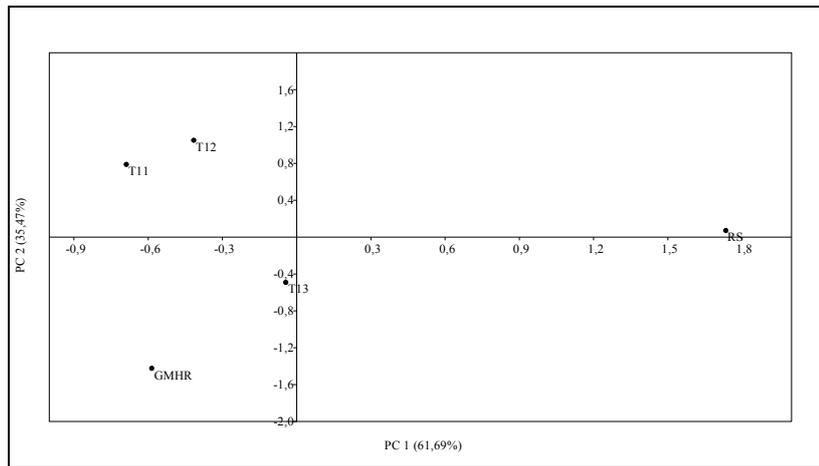


Figura 66: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Por meio do dendograma ilustrado na figura 67, com corte entre as distâncias 0,4 e 0,6, os genótipos se distribuíram em quatro grupos. Um grupo, mais similar, formado pelos genótipos T11 e T12, e os outros três grupos, formados unicamente com um genótipo, pelos genótipos GMHR, RS e T13.

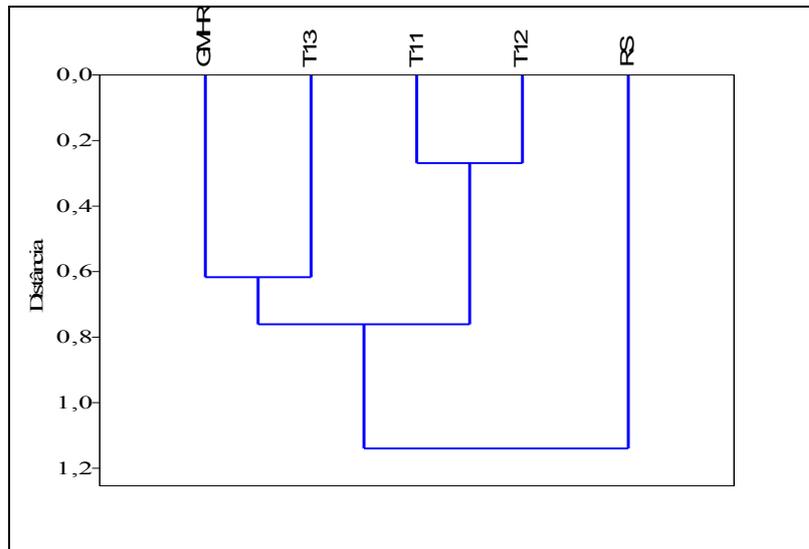


Figura 67: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (2000-1700 e 700-500 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de grãos degerminados de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento (TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9224.

Em grãos degerminados, não fica claro o efeito dos transgenes pela análise das isogênicas e nem tão pouco a interação deles com o *background* genético do RS por meio descendentes, para nenhum grupo funcional analisado. Os descendentes de RS com INGM apresentaram um comportamento muito semelhante em termos de agrupamento aos descendentes da combinação de GMHR com RS para proteínas. Isso sugere que o agrupamento foi definido com base nos genes endógenos do milho e não por influência dos transgenes.

Do mesmo modo como ocorreu para a análise de poli(fenóis) em grãos inteiros, através das PCAs não foi possível determinar as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para causarem as separações entre os genótipos.

Análise de embriões

O perfil espectral das farinhas de embriões de milho por DRIFTS está apresentado na figura 68.

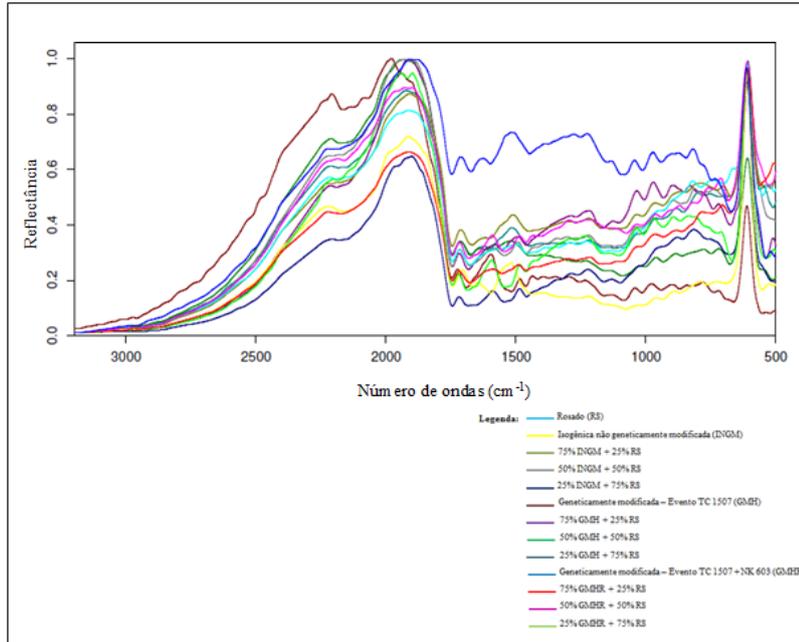


Figura 68: Perfil espectral de infravermelho médio (DRIFTS, 3200-500 cm^{-1}) de farinhas de embriões de milho de todos os genótipos.

Perfil espectral (3200 - 500 ondas.cm^{-1})

A partir do cálculo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2), conforme demonstrado na figura 69, a maioria da variabilidade dos dados é explicada por PC1 (68,28%), comparativamente ao PC2 (22,49%). Contudo, ambos expressaram 90,77% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS para a análise do perfil espectral de embriões, sendo que os genótipos não tiveram um nítido agrupamento ao longo do PC1 e PC2.

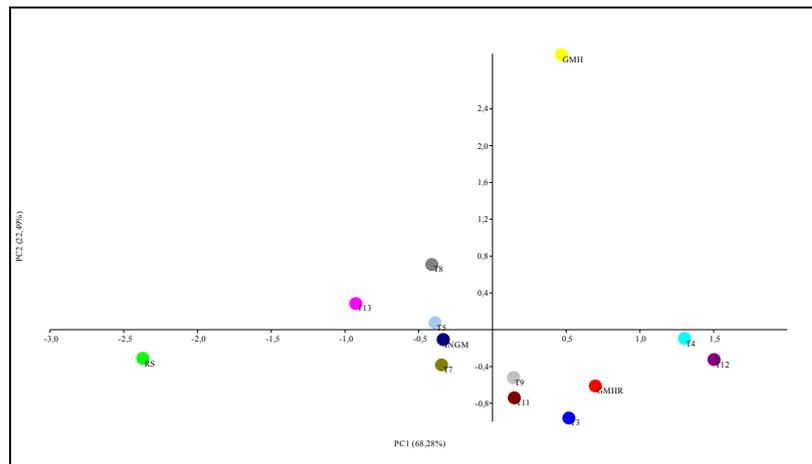


Figura 69: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3200-500 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de todos os genótipos. RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507), GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS), T9 (25% GMH + 75% RS), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

A análise de agrupamento entre todos os genótipos está demonstrada na figura 70. Com linha de corte entre as distâncias 1,6 e 2,4, houve a formação de um grupo com os genótipos INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T5 (25% INGM + 75% RS), T7 (75% GMH + 25% RS) e T8 (50% GMH + 50% RS), um grupo com T3 (75% INGM + 25% RS), T9 (25% GMH + 75% RS) e T11 (75% GMHR + 25% RS), e outro grupo com T4 (50% INGM + 50% RS) e T12 (50% GMHR + 50% RS), sendo que os demais genótipos formaram grupos independentes entre si.

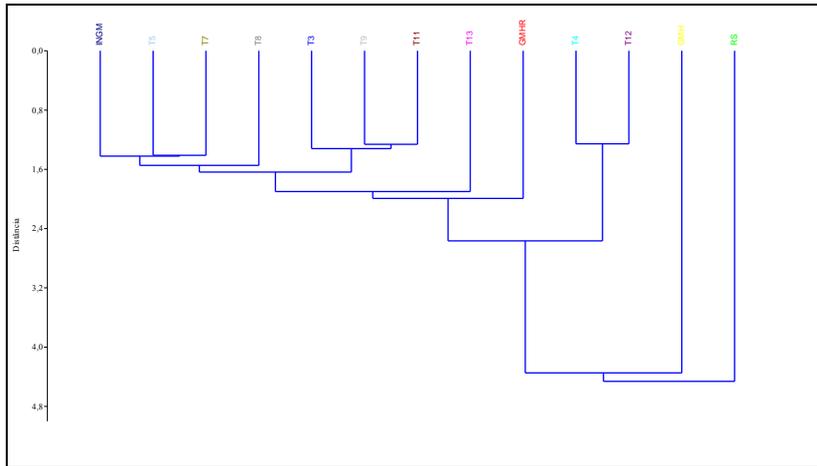


Figura 70: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS ($3200-500 \text{ ondas.cm}^{-1}$) de amostras de farinha de embriões de todos os genótipos. Coeficiente de correlação cofenética = 0,82.

Similarmente como ocorreu nas análises do perfil espectral infravermelho para os grãos degerminados, nas análises de embriões selecionaram-se os constituintes de maior representatividade presentes no tecido, como os lipídios e proteínas. Conforme Watson (1987) *apud* FAO (1992), quando analisamos embriões de milho, a constituição química, na sua grande maioria, são de lipídios (33,2%) e proteínas (18,4%). De acordo Shukla & Cheryan (2001), no embrião, os três principais tipos de proteínas, classificadas com base em sua solubilidade, são as albuminas, globulinas e glutelinas.

Lipídios (3000 - 2800 e 1750-1700 ondas. cm^{-1})

A PCA do perfil metabólico primário de lipídios possibilitou uma separação entre as variedades crioula (RS) e as cultivares isogênicas (INGM, GMH e GMHR), a partir do cálculo do PC1 e PC2, conforme figura 71. A variabilidade dos dados é explicada 89,35% por PC1, e 10,56% por PC2, sendo 99,91% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. Os híbridos isogênicos não geneticamente modificada

(INGM), geneticamente modificados evento TC1507 (GMH) e evento TC1507 + NK603 (GMHR) agruparam-se em PC1 positivo, contrariando o que foi observado para a variedade Rosado – Rajado (RS), que localiza-se em PC1 negativo.

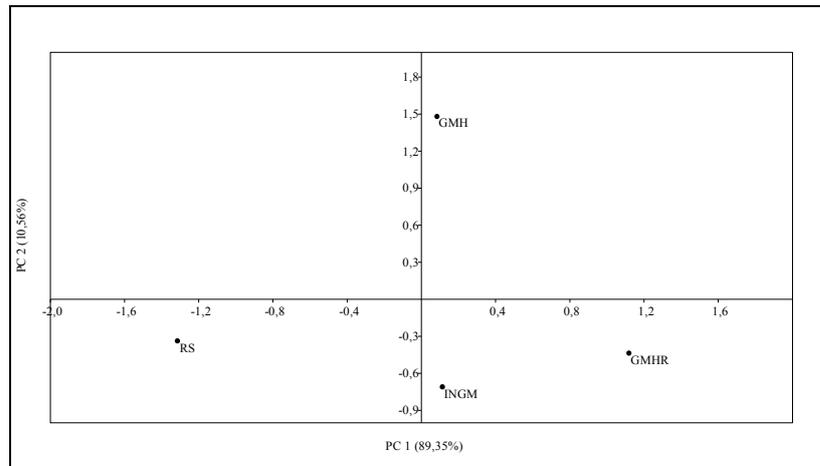


Figura 71: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

Através do dendrograma da figura 72, e com corte entre as distâncias 0,4 e 0,5, os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, distribuíram-se em quatro grupos distintos, onde cada genótipo forma um grupo isoladamente.

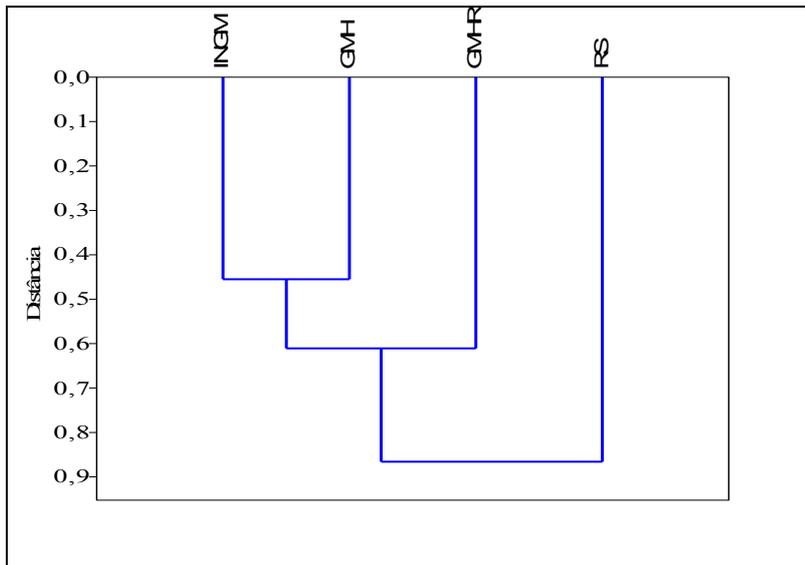


Figura 72: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7911.

O perfil metabólico de lipídios de embriões pela PCA dos genótipos INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS) pode ser visualizado na figura 73. A variabilidade dos dados é explicada quase, que exclusivamente, por PC1 (99,03%), comparando ao PC2 (0,75%), e os dois componentes juntos expressam 99,78% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. Deste modo, a cultivar isogênica não geneticamente modificada (INGM) e os genótipos T3 (75% INGM + 25% RS) e T4 (50% INGM + 50% RS) localizam-se em PC1 positivo, e a variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e o tratamento T5 (25% INGM + 75% RS) em PC1 negativo.

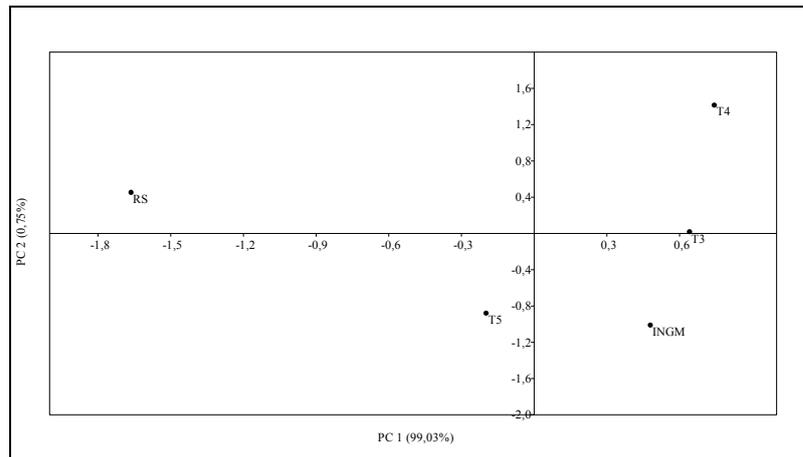


Figura 73: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

Por meio do dendograma dos genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5 (Figura 74), com corte entre as distâncias 0,4 e 0,5, houve a formação de dois grupos. Um grupo similarmente formado por INGM e os tratamentos T3, T4 e T5, e outro, isoladamente distinto, formando pelo genótipo RS.

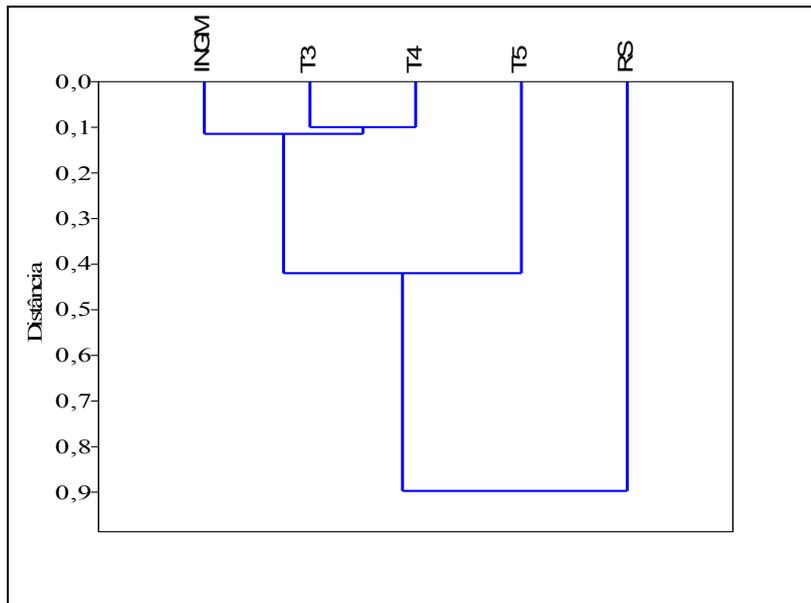


Figura 74: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9542.

Considerando os genótipos GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) a PCA possui a seguinte distribuição conforme figura 75. A variedade crioula Rosado - Rajado (RS) e o tratamento T7 (75% GMH + 25% RS) agruparam-se em PC1 negativo, e a GMH e os tratamentos T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS) em PC1 positivo. Do total da variação dos dados espectrais de DRIFTS (99,78%), o PC1 explicou (73,75%) e o PC2 (26,03%).

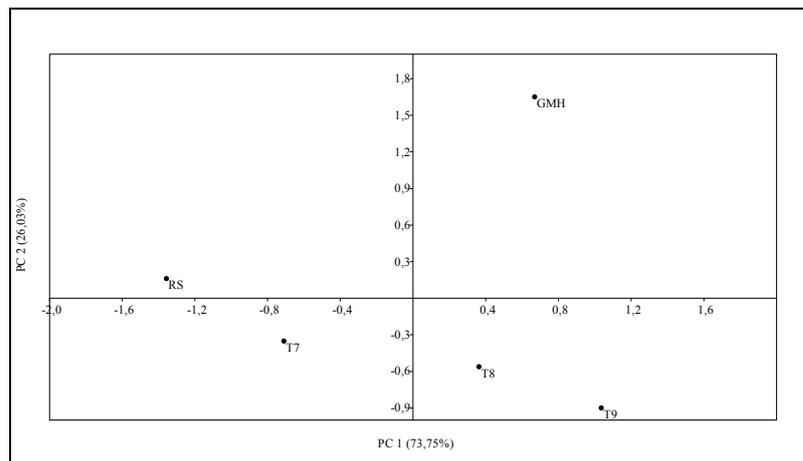


Figura 75: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

Na figura 76, está ilustrado o dendograma dos genótipos RS, GMH, T7, T8 e T9, que com corte entre as distâncias 0,24 e 0,32 os respectivos genótipos se dividiram em três grupos. Um formado pelos genótipos RS e T7, outro pelos genótipos T8 e T9, e um terceiro, isolado e heterogêneo, formado por GMH.

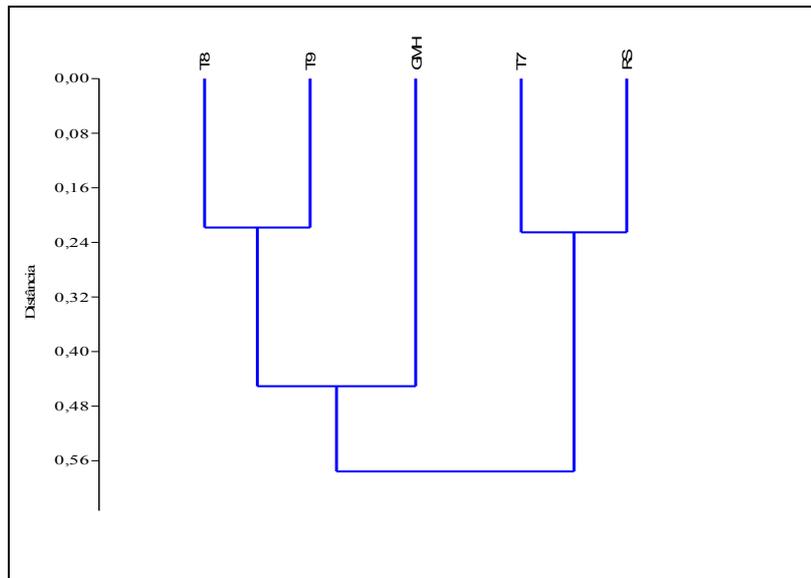


Figura 76: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - UPGMA) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,80.

Finalizando as PCAs de embriões na faixa de lipídios têm-se os genótipos GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS), com a seguinte distribuição na figura 77. A cultivar isogênica geneticamente modificada (GMHR) e os tratamentos T11 (75% GMHR + 25% RS) e T12 (50% GMHR + 50% RS) localizaram-se em PC1 positivo, e o genótipos RS (Rosado-Rajado) e T13 (25% GMHR + 75% RS) em PC1 negativo. A maioria da variabilidade dos dados é dada por PC1 (99,35%), sendo 99,90% o total da variância dos dados espectrais de DRIFTS.

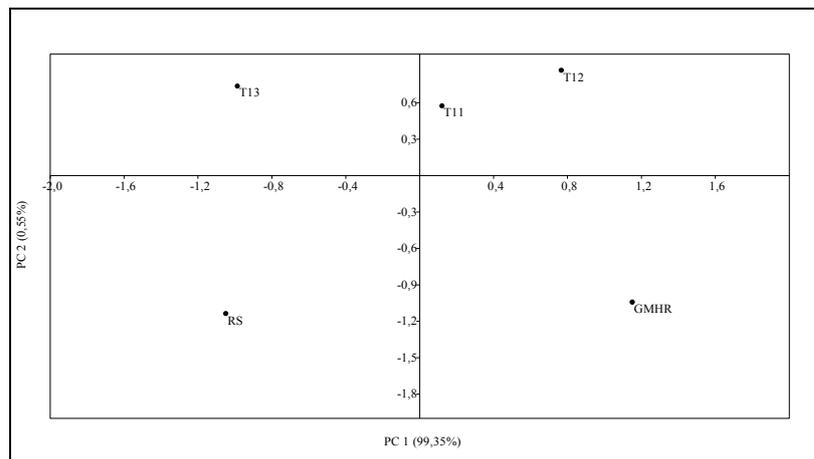


Figura 77: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Com base na análise de dendograma da figura 78, e corte entre as distâncias 0,3 e 0,4, houve a formação de três grupos. Um grupo, o mais similar entre os membros, formado pelos genótipos RS e T13, outro pelos genótipos GMHR e T12, e um terceiro grupo constituído isoladamente por T11.

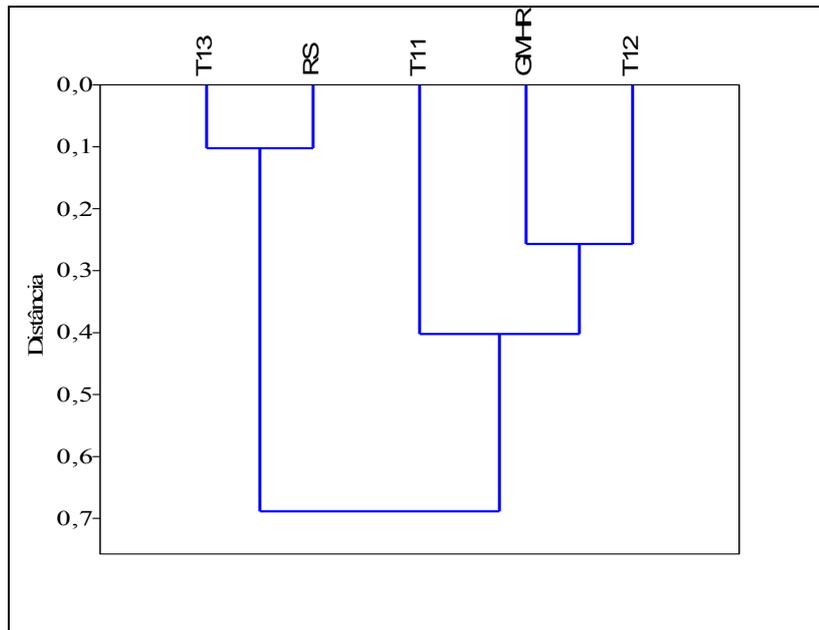


Figura 78: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8613.

De acordo com as PCAs, na faixa de lipídios de embriões, do mesmo modo que ocorreu para grãos inteiros, as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para as distinções dos genótipos foram na faixa de 1750-1700 ondas.cm^{-1} .

Proteínas (1650 – 1400 ondas.cm^{-1})

A PCA do perfil metabólico primário de proteínas para embriões possibilitou uma nítida separação entre as variedades crioula (RS) e as cultivares isogênicas entre si (INGM, GMH e GMHR), a partir do PC1 e

PC2, conforme na figura 79. A variabilidade dos dados explicada por PC1 é de 92,27%, e por PC2 é de 3,50%, sendo que ambos juntos expressam 95,77% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS. A variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e a cultivar geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH) localizam-se em PC1 negativo, e as cultivares isogênicas não geneticamente modificada (INGM), e a geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603 (GMHR) agruparam-se em PC1 positivo.

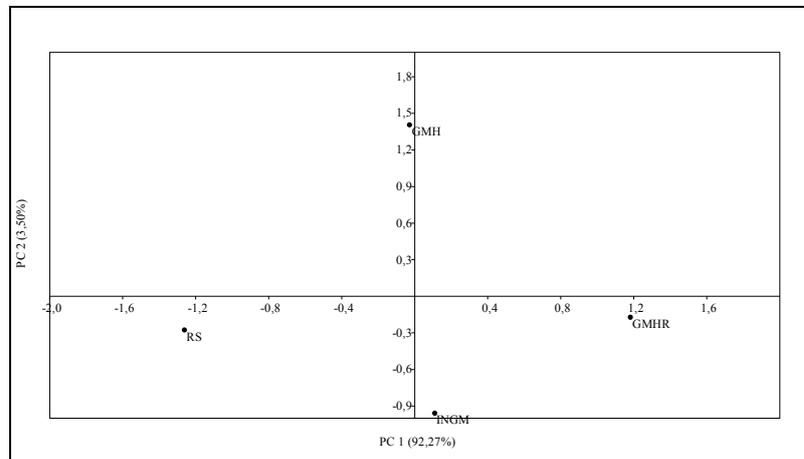


Figura 79: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS ($1650-1400 \text{ ondas.cm}^{-1}$) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603).

Por meio da análise de agrupamento entre os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, e realizando corte na distância de 0,9, houve a formação de três grupos como demonstrado no dendograma da figura 80. Um grupo, similar entre si, formado pelos genótipos INGM e GMH, e isoladamente, os genótipos GMHR e RS formando dois grupos distintos.

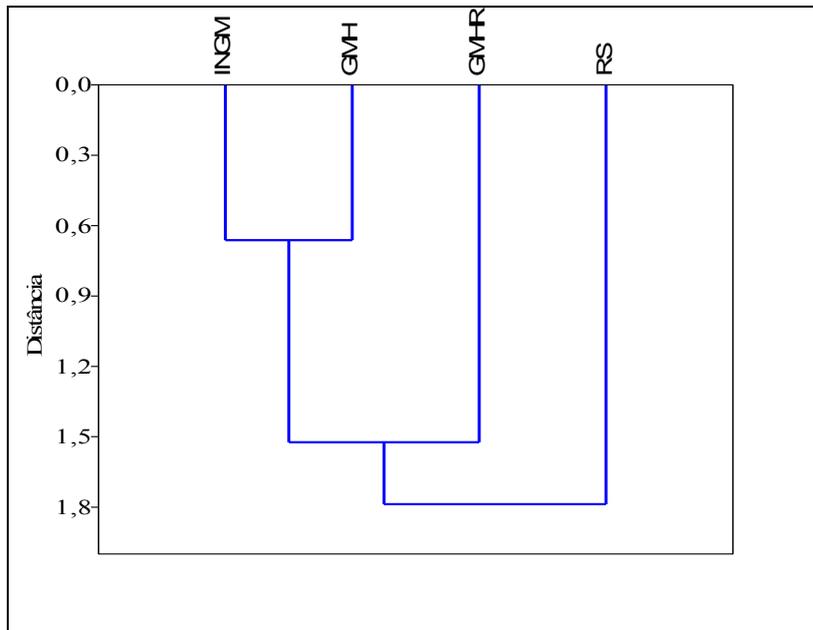


Figura 80: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), GMH (Geneticamente modificada – evento TC1507) e GMHR (Geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7394.

A distribuição dos genótipos INGM, RS e o *background* genético entre ambos (T3 - 75% INGM + 25% RS; T4 - 50% INGM + 50% RS; T5 - 25% INGM + 75% RS) através da PCA está ilustrada na figura 81. O PC1 e PC2 explicam 98,06% e 1,87% da variabilidade dos dados, respectivamente, assim, 99,93% da variação total dos dados espectrais de DRIFTS é explicada por esses dois componentes principais. A cultivar isogênica não geneticamente modificada (INGM) e os tratamentos T3 (75% INGM + 25% RS) e T4 (50% INGM + 50% RS) estão em PC1 positivo, opostamente o que foi observado para a variedade crioula Rosado – Rajado (RS) e o tratamento T5 (25% INGM + 75% RS) que estão localizados em PC1 negativo.

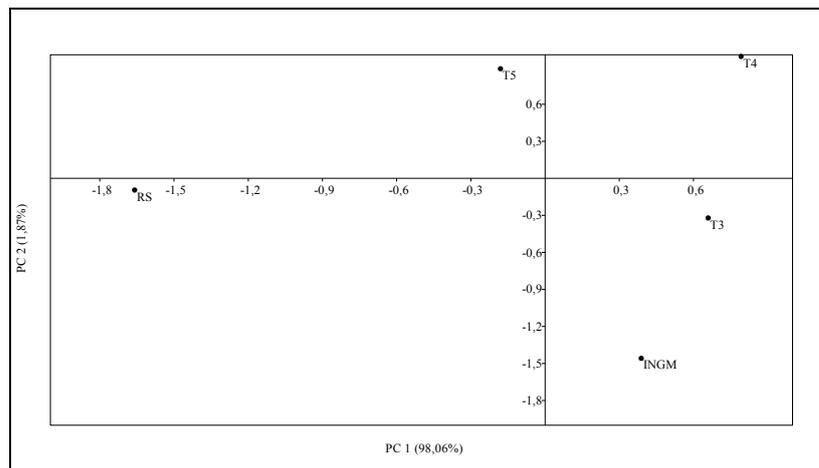


Figura 81: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS).

Analisando o dendograma da figura 82, com corte entre as distâncias 1,0 e 1,5, os genótipos RS, INGM, T3, T4 e T5 dividem-se em dois grupos. Um grupo similarmente formado pelos genótipos INGM, T3, T4 e T5, e há um grupo isolado formado unicamente pela variedade crioula Rosado-Rajado (RS).

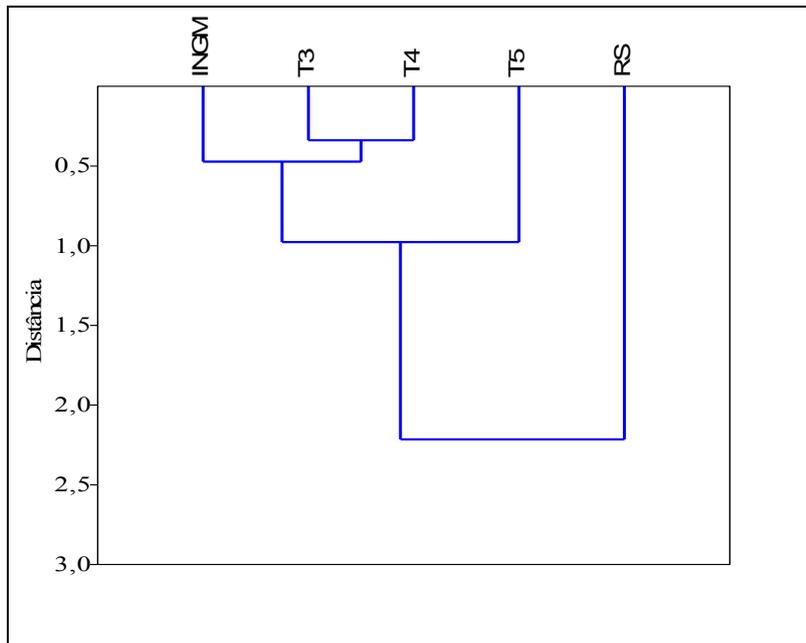


Figura 82: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), INGM (Isogênica não geneticamente modificada), T3 (75% INGM + 25% RS), T4 (50% INGM + 50% RS) e T5 (25% INGM + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,9482.

Fundamentada no perfil metabólico de proteínas de embriões, a PCA dos genótipos GMH, RS e o *background* genético entre ambos (T7 - 75% GMH + 25% RS; T8 - 50% GMH + 50% RS; T9 - 25% GMH + 75% RS) pode ser visualizada através da figura 83. A cultivar isogênica geneticamente modificada (GMH) e os tratamentos T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS) agruparam-se em PC1 positivo, e opostamente, a variedade crioula Rosado - Rajado (RS) e o tratamento T7 (75% GMH + 25% RS) em PC1 negativo. Da variação total dos dados espectrais de DRIFTS, os componentes principais 1 e 2 juntos explicam 99,28% .

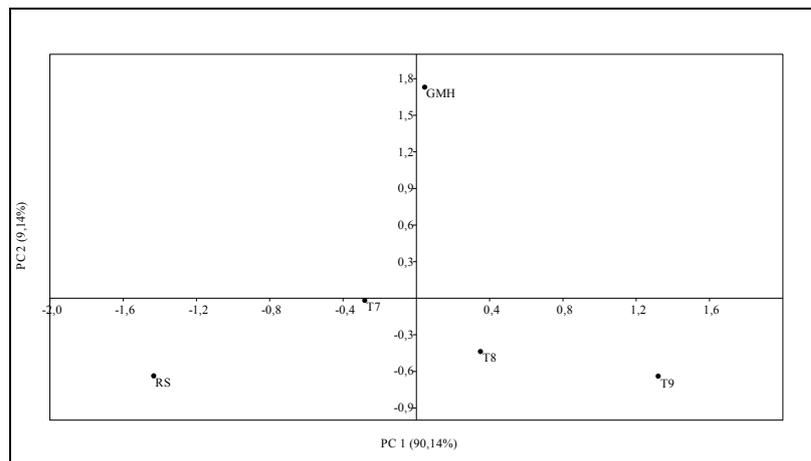


Figura 83: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS ($1650-1400 \text{ ondas.cm}^{-1}$) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS).

Pela análise do dendograma da figura 84, com linha de corte na distância de 0,4, todos os genótipos, RS, GMH, T7, T8 e T9, não são similares entre si, formando isoladamente quatro grupos heterogêneos.

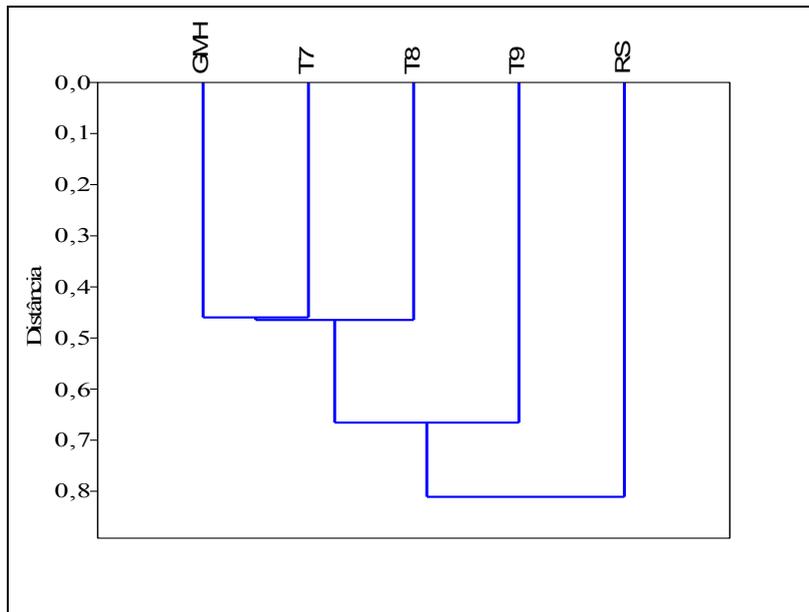


Figura 84: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMH (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507), T7 (75% GMH + 25% RS), T8 (50% GMH + 50% RS) e T9 (25% GMH + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,7708.

Concluindo as PCAs de embriões no perfil metabólico de proteínas, os genótipos GMHR, RS e o *background* genético entre ambos (T11 - 75% GMHR + 25% RS; T12 - 50% GMHR + 50% RS; T13 - 25% GMHR + 75% RS) possuem a seguinte distribuição de acordo com a figura 85. A cultivar isogênica geneticamente modificada (GMHR) e os tratamentos T11 (75% GMHR + 25% RS) e T12 (50% GMHR + 50% RS) agruparam-se em PC1 positivo, inversamente observado para a variedade crioula Rosado-Rajado (RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS) que localizaram-se em PC1 negativo. A explicação da variabilidade dos dados é dada por PC1 (97,55%) e por PC2 (2,34%), sendo que juntos, explicam 99,89% do total da variância dos dados espectrais de DRIFTS.

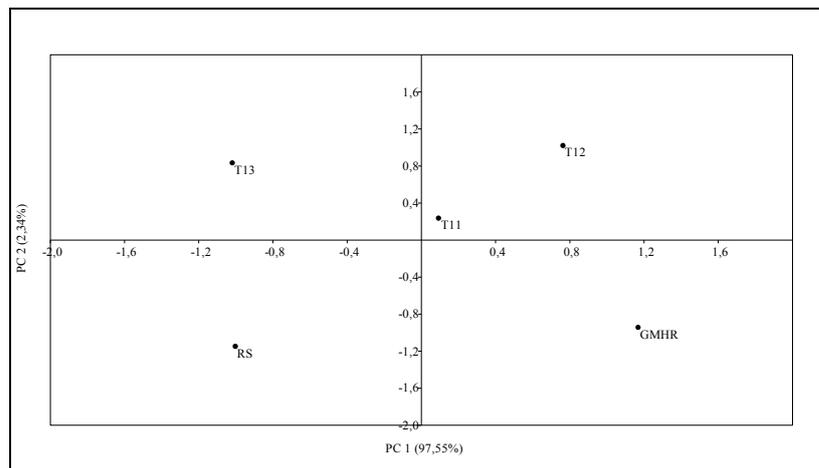


Figura 85: Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 e PC2) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm^{-1}) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS).

Conforme dendograma da figura 86, e corte entre as distâncias 0,6 e 0,9, a distribuição dos genótipos GMHR, RS, T11, T12 e T13 ocorre em quatro grupos. Um grupo formado pelos genótipos RS e T13, e os demais genótipos, GMHR, T11 e T12, formando três grupos isolados.

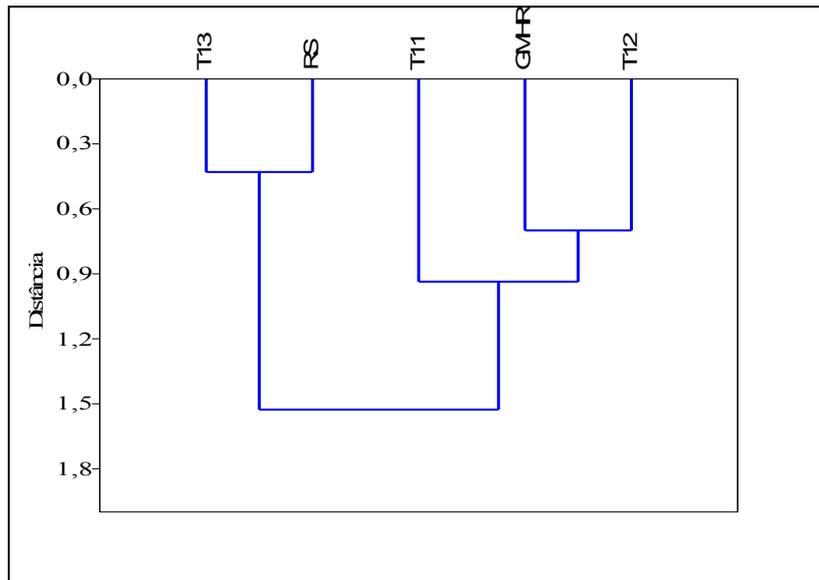


Figura 86: Dendrograma de agrupamento (distância euclidiana - ligação simples) para os dados espectrais de DRIFTS (1650-1400 ondas.cm⁻¹) de amostras de farinha de embriões de RS (Rosado-Rajado), GMHR (Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603), T11 (75% GMHR + 25% RS), T12 (50% GMHR + 50% RS) e T13 (25% GMHR + 75% RS). Coeficiente de correlação cofenética = 0,8324.

Nas PCAs na faixa de proteínas de embriões, igualmente como ocorreu na análise de grãos inteiros e degerminados, não foi possível determinar as bandas espectroscópicas que mais contribuíram para causarem as tais separações entre os genótipos, pois todos os números de ondas na faixa de proteínas (1650-1400 ondas.cm⁻¹) influenciaram igualmente para as distinções entre os genótipos.

Para embriões, o efeito dos transgenes pode ser notado a partir do padrão de agrupamento dos híbridos isogênicos entre si para lipídios e proteínas, bem como destes em relação ao RS. Note que RS difere de todos os híbridos isogênicos; o isogênico INGM é mais similar ao GMH e ambos menos similares ao GMHR. Esse agrupamento e efeito foram observados nos mesmos grupos funcionais de grãos inteiros. Com relação aos transgenes inseridos no *background* do crioulo, não foi possível constatar nenhum efeito comparando a análise de agrupamento

entre os descendentes do cruzamento de RS com INGM, pois o padrão de agrupamento foi parecido.

A análise de proteínas e lipídios em embriões foi satisfatória para detectar efeito de transgenes em híbridos isogênicos, mas não foi apropriada para detectar o efeito do transgene em *background* crioulo.

No caso de embriões, o padrão de agrupamento de descendentes de INGM e GMH é parecido. Por isso, usar GMH não serviria para acompanhar mudanças em grupos funcionais em variedades crioulas em processo recorrente de contaminação por seu pólen.

Analisando os coeficientes de correlação cofenética de todos os dendogramas, conclui-se que a maioria apresenta valores maiores que 0,70. A avaliação de um método de agrupamento, nesse caso ligação simples, é realizada quando o dendograma fornece uma imagem menos distorcida da realidade. Assim, é possível avaliar o grau de deformação provocado pela construção do dendograma calculando-se o coeficiente de correlação cofenética (VALENTIN, 2000). Portanto, o menor grau de distorção será refletido pelo maior coeficiente cofenético, possuindo assim, a capacidade de evidenciar melhor a estrutura dos dados e a existência de grupos.

Os métodos de agrupamento utilizados foram ligação simples e UPGMA. No método de ligação simples (vizinho mais próximo) os *clusters* são unidos com base na menor distância entre os dois grupos, e nas médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) os *clusters* são unidos com base na distância média entre todos os membros nos dois grupos (HAMMER *et al.*, 2001b).

Considerando as PCAs e os dendogramas para os dados espectrais de DRIFTS na faixa de carboidratos (1200-800 ondas.cm⁻¹) de farinhas de grãos inteiros e degerminados, a variedade crioula Rosado-Rajado (RS) e as cultivares isogênicas não geneticamente modificada (INGM), geneticamente modificada – evento TC1507 (GMH) e geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603 (GMHR), distribuíram-se e agruparam-se semelhantemente. Deste modo, analisando tanto farinhas de grãos inteiros ou degerminados na faixa de carboidratos, as variedades INGM e GMHR são similares e próximas, e a variedade GMH consecutivamente de maneira isolada e dissimilar a estas, e similar a RS na análise de grãos inteiros.

No entanto, quando analisamos as PCAs e os dendogramas na faixa de carboidratos entre grãos inteiros e degerminados envolvendo os genitores RS, INGM, GMH, GMHR e os *backgrounds* genéticos desenvolvidos entre eles (T3, T4, T5, T7, T8, T9, T11, T12 e T13) observa-se que não há relação entre distância com o grau de fluxo

gênico que pela análise de grãos degerminados. No entanto, na análise de grãos inteiros, somente há relação de distância com o grau de fluxo gênico entre os genótipos RS, GMHR, T11, T12 e T13, ou seja, é a partir dos genótipos que têm no mínimo 50% do genoma de GMHR (T12), que estes se assemelham ao genitor GMHR, e com 25% do genoma de GMHR (T13) este se agrupa com RS pela análise de carboidratos.

Analisando as PCAs e dendogramas para os dados espectrais de DRIFTS na faixa de proteínas (1650-1400 ondas.cm⁻¹) entre farinhas de grãos inteiros, degerminados e embriões, os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR distribuíram-se e agruparam-se de maneira diferente para cada tecido vegetal dos grãos. Na análise de grãos inteiros a similaridade está nos genótipos RS e GMH, e entre INGM e GMHR. Em grãos degerminados os genótipos INGM, GMH e GMHR se assemelham, onde somente o genótipo RS foi dissimilar a estes. Todavia, analisando os embriões, somente são similares os genótipos INGM e GMH, pois, GMHR e RS são isoladamente distintos.

Quando consideramos as PCAs e dendogramas na faixa proteínas de grãos inteiros, degerminados e embriões que envolvem os genitores RS, INGM, GMH, GMHR e os *backgrounds* genéticos gerados entre eles, observa-se que há diferença para cada tecido vegetal dos grãos. Na análise de grãos inteiros INGM, RS e os seus *backgrounds* genéticos são distintos; GMH e RS se assemelham. Entretanto, os seus *backgrounds* são diferentes; em GMHR, RS e seus *backgrounds* há relação de distância com o grau de fluxo gênico, havendo a mesma relação da análise de carboidratos. Em grãos degerminados há similaridade entre INGM e os *backgrounds*, onde estes se diferenciam de RS; GMH e 75% do genoma de GMH (T7) são os únicos similares, sendo os demais distintos; e GMHR e seus *backgrounds* se assemelham, diferenciando-os de RS. Na análise de embriões INGM e os *backgrounds* são similares, distinguindo-se de RS; entre GMH, RS e os seus *backgrounds* não há similaridade; e RS e 75% do genoma de RS (T13) são similares, diferenciando de GMHR e os demais *backgrounds* que são isoladamente distintos.

Comparando e analisando as PCAs e dendogramas para os dados espectrais de DRIFTS, na faixa de lipídios (3000-2800 e 1750-1700 ondas.cm⁻¹) entre farinhas de grãos inteiros e embriões dos genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, estes também se distribuíram e agruparam-se de maneira diferente para cada tecido vegetal dos grãos. Na análise de grãos inteiros INGM e GMHR são similares, e GMH e RS são isolados e diferentes dos demais e entre si. No entanto, na análise de embriões

não há similaridade entre os tratamentos, e o agrupamento destes segue a mesmo comportamento observado para proteínas em embriões. Assim, para detectar efeito dos transgenes, tanto lipídios como proteínas em embriões poderiam ser pesquisados, pois ambos separam os genótipos RS dos híbridos isogênicos e dentro destes últimos.

As PCAs e dendogramas na faixa de lipídios de farinhas de grãos inteiros e embriões dos genitores RS, INGM, GMH, GMHR e os *backgrounds* genéticos desenvolvidos entre eles, mostram a seguinte distribuição e agrupamento: em grãos inteiros entre RS e 75% do genoma de RS (T5) há similaridade, sendo os demais genótipos distintos; GMH, 75% e 25% do genoma de GMH, T7 e T9, respectivamente, são os únicos genótipos similares; em GMHR, RS e seus *backgrounds* há novamente a relação de distância com o grau de fluxo gênico, sendo a mesma relação da análise de carboidratos e proteínas anteriormente citadas. Na análise de embriões, INGM e os *backgrounds* assemelham-se, somente se diferenciando de RS; entre GMH, RS e os seus *backgrounds* não há similaridade; há similaridade entre os pares GMHR e 50% do genoma de GMHR (T12), e RS e 75% do genoma de RS (T13), estando o 75% do genoma de GMHR (T11) isolado e distinto.

Analisando as PCAs e dendogramas para os dados espectrais de DRIFTS na faixa de poli(fenóis) (2000-1700 e 700-500 ondas.cm⁻¹) de farinhas de grãos inteiros e degerminados para os genótipos RS, INGM, GMH e GMHR, estes se distribuem e agrupam-se de maneira semelhante e não existindo similaridade entre os genótipos em ambos tecidos vegetais dos grãos.

Venneria *et al.* (2008) analisando extratos de ácidos graxos e poli(fenóis) totais em cultivares GMs (evento MON810), comparado com sua isogênica não GM, não encontraram diferenças significativas.

Todavia, quando analisamos as PCAs e dendogramas na faixa de poli(fenóis) que envolvem os genitores RS, INGM, GMH, GMHR e os *backgrounds* genéticos desenvolvidos entre eles, observa-se que não há relação entre distância com o grau de fluxo gênico pela análise de grãos inteiros. Porém, em grãos degerminados os genótipos agrupam-se e distribuem-se da seguinte maneira: INGM, RS e os seus *backgrounds* isolados e distintos entre si; GMH e 75% do genoma de GMH (T7) os únicos similares, sendo os demais genótipos isolados; e 75% e 50% do genoma de GMHR, T11 e T12, respectivamente, havendo similaridade, e os demais genótipos isolados e distintos.

Após essas relações entre os genitores, seus *backgrounds* genéticos em diferentes análises do tecido vegetal dos grãos, pontos

importantes devem ser explorados. Inicialmente, na análise de grãos inteiros, entre as cultivares geneticamente modificadas GMH e GMHR estas não são similares em nenhuma das faixas espectrais de DRIFTS analisadas (carboidratos, proteínas, lipídios e poli(fenóis)). Somado a isso, analisando grãos inteiros e degerminados na faixa de poli(fenóis), as cultivares geneticamente modificadas GMH e GMHR são distintas entre si e não se assemelham com a INGM. Entretanto, essa conformação também ocorre quando embriões são analisados na faixa de lipídios. Somente há similaridade entre as isogênicas analisando a faixa de proteínas em grãos degerminados. Ressalta-se que as únicas diferenças entre a isogênica não geneticamente modificada (INGM) e as geneticamente modificadas (GMH e GMHR) são a existência dos genes *Cry1F* e *Pat*, em GMH, e a presença dos genes *Cry1F*, *Pat* e *cp4 epsps* em GMHR.

Deste modo, a não similaridade das faixas espectrais de DRIFTS para carboidratos, proteínas, lipídios e poli(fenóis) de grãos inteiros, entre GMH e GMHR, pode ser atribuída a presença ou ausência do gene *cp4 epsps*, e entre, INGM, GMH e GMHR na faixa de poli(fenóis) de grãos inteiros e degerminados, a presença ou ausência dos genes *Cry1F*, *Pat* e *cp4 epsps*.

Considerando os genitores RS, INGM, GMH, GMHR e os *backgrounds* genéticos desenvolvidos entre eles, questões relevantes devem ser mencionadas. Analisando carboidratos e proteínas de grãos inteiros de GMHR, RS e seus *backgrounds*, ressalta-se a relação de distância através da análise de agrupamento, com o grau de fluxo gênico. Assim, os genótipos que têm no mínimo 50% do genoma de GMHR (T12) se assemelham ao genitor GMHR, e com 25% do genoma de GMHR (T13) este se agrupa com RS. Considerando somente esses grupos das proteínas e carboidratos o conjunto de INGM/RS/descendentes e GMHR/RS/descendentes diferem entre si quanto ao agrupamento. Assim, nesses dois grupos funcionais, os agrupamentos diferenciados sugerem que se trata do efeito dos transgenes e não das combinações entre genes de milho derivados de diferentes genitores. Nos lipídios, para grãos inteiros, os conjuntos INGM/RS/descendentes e GMHR/RS/descendentes tiveram agrupamentos parecidos. Isso sugere que o efeito deveu-se às combinações de genes de milho vindos de ambos os parentais e não devido ao efeito dos transgenes.

Os genótipos INGM, RS e os *backgrounds* são distintos na faixa de proteínas e poli(fenóis) em grãos inteiros e degerminados, respectivamente. Em grãos degerminados e embriões para proteínas e

lipídios, respectivamente, INGM e os *backgrounds* são similares, diferenciando somente de RS, e em grãos inteiros para lipídios RS e 75% de RS são similares, sendo os demais genótipos distintos. Para proteínas e poli(fenóis) em grãos degerminados GMH e 75% do genoma de GMH são similares e os outros genótipos distintos. Para lipídios em embriões GMH, RS e os *backgrounds* genéticos são diferentes. Em grãos degerminados, RS e 75% de RS são similares e os demais genótipos distintos na faixa de proteínas. Porém, em poli(fenóis) somente há similaridade entre 75% e 50% do genoma de GMHR, sendo os demais genótipos distintos.

Deste modo, por meio da análise de agrupamento dos dados espectrais de DRIFTS de grãos inteiros, degerminados e embriões, ocorrendo similaridades e dissimilaridades entre os diferentes graus de fluxo gênico, seja transgene ou não transgene, parece que um maior efeito da presença dos transgenes ocorre quando há o envolvimento do híbrido GMHR. Esse destaque da cultivar GMHR pode ser atribuído à presença de um maior número de transgenes (*CryIF*, *Pat* e *cp4 epsps*), comparado a GMH (*CryIF* e *Pat*), refletindo assim, nos *backgrounds* respectivos. Assim sendo, em muitas das análises, um tratamento com 25% do genoma de uma cultivar GMHR, contra, 75% do genoma de RS, já é capaz de distinguir-se da variedade crioula RS íntegra.

Com relação à variedade RS ter se isolado e distinguido dos demais genótipos nas análises multivariadas (PCAs e dendogramas), através dos dados espectrais de DRIFTS, pode ser devido à intrínseca composição química dos tecidos vegetais da variedade crioula, e ao próprio componente ambiental atuando. Enfatiza-se que devido a problemas de germinação, atrasou-se a colheita da variedade RS, e que, todavia, esse atraso resultou no mesmo número de dias a campo, comparado aos outros genótipos antecipadamente colhidos. Deste modo, analisando os dados climáticos nesse período a mais que a variedade RS permaneceu no campo, não houve a ocorrência dos eventos de temperatura e pluviosidade anormais, e que se tratando de variedade crioula, comparados às variedades híbridas, esta tende a ter ciclo mais longo para o completo desenvolvimento dos grãos, o que estaria normalmente ocorrendo em campos naturais cultivados com milho crioulo.

A razão de não ter sido utilizado herbicida no experimento, refere-se a uma situação real encontrada nas propriedades dos agricultores do oeste de SC que desconhecem estar usando sementes milho GM vindas do programa troca-troca do governo federal (SILVA, *no prelo*).

Vale lembrar que mesmo o mecanismo de recombinação possibilitando o desenvolvimento de variabilidade genética em plantas, tais modificações são fontes de efeitos inesperados, tanto em melhoramento clássico, como em biotecnologias modernas. Portanto, os genes são considerados *hotspots* para a recombinação, e que as incorporações e/ou deleções no DNA pode resultar em alterações nos genes, e conseqüentemente, a produção de novas proteínas em plantas (CELLINI *et al.*, 2004). No entanto, espera-se que manipulações *in vitro* de DNA, como realizadas em OGMs, possam induzir efeitos estatisticamente mais inesperados do que a recombinação natural (ZOLLA *et al.*, 2008).

A liberação e comercialização de OGMs com eventos combinados/piramidados é um fato, e contrariando erroneamente essa possível recombinação dos genes, a critério da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) sob consulta, poderão ser dispensadas a análise e a emissão de novo parecer técnico sobre OGMs que contenham mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico e que já tenham sido previamente aprovados (individualmente) para liberação comercial pela CTNBio, como é o caso do evento piramidado em estudo TC1507 + NK603 (BRASIL, 2008).

Além da presença ou ausência de transgenes, quando analisamos os eventos piramidados devemos considerar também a existência de possíveis efeitos sinérgicos, como demonstrado por De La Garza *et al.* (2007). Os autores alteraram geneticamente plantas de tomate em dois ramos da rota metabólica de produção de ácido fólico, gerando linhagens expressando o gene *aminodeoxychorismate synthase* (*AzADCS*) e linhagens expressando o gene *GTP cyclohydrolase I* (*GCHI*). Individualmente as linhagens aumentaram a produção dos precursores do ácido fólico (*pteridine*, *p-aminobenzoate* (*PABA*), e glutamato), mas quando foram cruzadas entre si os níveis foram bem superiores que nas linhagens individualmente. Portanto, há de considerar estes possíveis efeitos sinérgicos, com avaliações caso-a-caso na análise de risco de plantas GMs.

Segundo Guerra & Nodari (2001), é exatamente o escasso conhecimento sobre o controle destes genes após a sua inserção no genoma da célula hospedeira, que torna imprevisível a tecnologia do DNA recombinante. Assim, a aplicação destas biotecnologias na agricultura é incerta, pois a tecnologia ainda não permite o controle sobre o sítio de inserção do transgene, a expressão gênica, o destino do transgene e os efeitos de sua disseminação no meio ambiente.

Analisando e comparando variedades de milho geneticamente modificadas com suas versões isogênicas não GM, em locais e anos diferentes, atribuem-se as alterações existentes em proteínas e metabólitos devido a maior parte aos componentes ambientais, comparado às modificações genéticas (RÖHLIG *et al.*, 2009; ASIAGO *et al.*, 2012; FRANK *et al.*, 2012; AGAPITO-TENFEN *et al.*, 2013). Portanto, a existência dessas variações, muitas vezes de planta-a-planta (BATISTA & OLIVEIRA, 2010) deve ser considerada na análise de risco de OGMs, sendo minimizadas com a utilização de ferramentas metodológicas adequadas. No entanto, várias análises entre cultivares de milho GM e suas isogênicas não GM asseguram a existência de equivalência substancial entre os materiais (SIDHU *et al.*, 2000; RIDLEY *et al.*, 2002; VENNERIA *et al.*, 2008; BALSAMO *et al.*, 2011).

Em contrapartida, parece haver influência a utilização da modificação genética em plantas. Utilizando análises de transcriptoma, proteoma e metaboloma entre duas variedades de milho GM (*Bt* e *RR*), com suas respectivas isogênicas não GM, em três locais diferentes e três anos consecutivos de plantio, constatou-se duas proteínas diferencialmente expressas na variedade de milho GM *RR*, em comparação com a variedade não GM; ocorrendo também para duas proteínas na comparação do milho *Bt* com o milho não GM. Este estudo concluiu que existem diferenças entre as cultivares GMs e suas isogênicas não GMs, mas comparando com a variação genética existente, a variação ambiental exerce uma maior influência sobre as variações das análises utilizadas (BARROS *et al.*, 2010).

Zolla *et al.* (2008), comparando o proteoma de grãos de milho GM com suas versões isogênicas não GM, concluíram que as variações ambientais têm mais influência nas alterações existentes no proteoma do que a modificação genética. Todavia, 43 proteínas foram significativamente diferentes em grãos GM, em relação às versões não GMs, devido à inserção de um único gene no genoma do milho pelo método de bombardeamento de partículas.

Levandi *et al.* (2008), utilizando *capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry*, com o objetivo de comparar os metabólitos de grãos de milho de variedades GM e suas isogênicas não GM, pressupõem os metabólitos L-carnitina e L-prolina-betaína como biomarcadores para detecção de amostras transgênicas, sendo estes superexpressos em amostras GMs.

Os resultados obtidos em Manetti *et al.* (2006), com a tecnologia de ressonância magnética nuclear em grãos de milho, mostram que a

modificação genética introduzindo o gene *CryIAb*, induz variações metabólicas envolvendo a via principal de nitrogênio.

Piccioni *et al.* (2009), utilizando-se também de ressonância magnética nuclear, observaram em extratos de grãos GMs maiores concentrações de etanol, ácido cítrico, glicina-betaína, trealose, e outro composto não identificado, comparado aos seus grãos da versão isogênica não GM.

Ampliando as abordagens transgênicas, cotilédones de *Vicia narbonensis* expressando um derivado de levedura da invertase diminuíram significativamente os níveis de sacarose, amido e proteínas de armazenamento. Em contrapartida, contêm grandes quantidades de hexoses, e que dependendo do nível de expressão do transgene a sacarose é reduzida em níveis diferentes (WEBER *et al.*, 1998).

No trabalho de Ren *et al.* (2009), comparando *Arabidopsis* GM e não GM, atribuíram as modificações existente nos aminoácidos treonina e alanina, devido à inserção do transgene *Bar*.

Segundo Caires *et al.* (2008), utilizando FTIR/PAS (*Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy*) e análise de discriminação canônica, foram os lipídios neutros e insaturados, as proteínas e hidratos de carbono os grupos funcionais mais importantes na discriminação entre as variedades convencionais e transgênicas de grãos de soja.

Deste modo, visto que as análises dos estudos científicos produzem resultados diferentes devido ao uso de distintas origens genéticas, condições de crescimento, tecidos vegetais, comparadores e metodologias, portanto, são consideradas como análises exploratórias na avaliação de plantas GMs (RICROCH *et al.*, 2011).

Essas dissimilaridades entre os tratamentos, com base nas diferentes faixas espectrais de DRIFTS para grãos inteiros, degerminados e embriões, reveladas no presente estudo, podem ter sido originadas devido a vários fatores. Entre esses fatores, as mutações genéticas aleatórias como consequência da técnica de bombardeamento de partículas. Trata-se de um processo de modificação genética que pode levar à ruptura física do genoma, alterando a regulação dos genes, com um potencial de inativação de genes endógenos (SOMERS & MAKAREVITCH, 2004). Outro fato é que, após a transformação genética, mutações somaclonais poderiam existir, havendo, portanto, mudanças genéticas espontâneas e hereditárias em culturas *in vitro* (LARKIN & SCOWCROFT, 1981). Consequentemente, se uma ou mais mutações hereditárias estão intimamente relacionadas com a inserção de transgenes, ou outros genes que controlam características

importantes, isso iria prejudicar o uso da engenharia genética atual (PICCIONI *et al.*, 2009). Um último fator, não menos importante, são os possíveis efeitos pleiotrópicos agindo na rede metabólica pela inserção dos transgenes *CryIF*, *Pat* e *cp4 epsps*. Entretanto, não só a região proximal da inserção, onde as modificações são devidas a uma reordenação das sequências genéticas para incluir o novo fragmento genético, mas também as regiões distais do genoma, que afetam todo o equilíbrio das vias metabólicas, estariam atuando para o surgimento desses efeitos indesejáveis em OGMs (SOMERS & MAKAREVITCH, 2004).

Uma questão relevante dos riscos de OGMs é que análises caso-a-caso devem ser realizadas, e que os transgenes que têm sido considerados seguros quando são analisados com um fundo genético, não podem ser considerados seguros quando são cruzados acidentalmente ou por casualidade com outros fundos genéticos da mesma espécie ou entre espécies (HEINEMANN, 2009).

Resultados de um estudo de sequenciamento de embriões (20 DAP) de cultivares GMs (MON810), e suas contrapartes, isogênicas não GMs, revelaram que 140 genes eram diferencialmente expressos, estando envolvidos principalmente no metabolismo de carboidratos e proteínas, e na organização da cromatina. O estudo justifica que as cultivares GMs (MON810) parecem possuir processos de maturações ligeiramente atrasados em comparação com que as cultivares não GMs, o que inclui o desenvolvimento do embrião. Eles também descobriram que pequenas diferenças são essencialmente atribuídas *background* genético varietal, e provavelmente, não diretamente relacionadas à modificação genética (LA PAZ *et al.*, 2014).

O cultivo de milho GMs traz consigo danos secundários importantes. Como é o caso da produção de milho crioulo no sistema orgânico, uma realidade brasileira, onde o fluxo de transgenes a cultivos não GM pode comprometer ou impedir a certificação orgânica, e dessa maneira reduzir significativamente seus ingressos, havendo, assim, uma supervalorização paga pelos produtos orgânicos (HEINEMANN, 2009).

O milho é base da alimentação humana, sendo utilizado e explorado por muitas associações e cooperativas catarinenses (por exemplo: ASSO e ASCOOPER) nas cadeias produtivas de milho-grão, farinha e leite orgânicos, e as muitas variedades de milho crioulo com suas composições próprias. Assim, os cultivos GMs poderiam influenciar negativamente esse nicho de mercado, contaminando e modificando a composição química intrínseca de muitas variedades crioulas de milho do oeste de SC, que pela legislação brasileira isto fere

o direito dos agricultores de optarem pela agricultura orgânica e convencional e também fere o direito dos consumidores de escolherem alimentos livres de GMs.

CONCLUSÕES

- i. Não houve agrupamento para os perfis espectrais de grãos inteiros, degerminados e embriões de todos os genótipos em conjunto;
- ii. Para grãos inteiros, os grupos funcionais constituídos pelas proteínas, carboidratos, lipídios e (poli)fenóis não foram bons indicadores para detectar o efeito da presença dos transgenes, a partir da análise de híbridos isogênicos com e sem os eventos;
- iii. Para grãos inteiros, os grupos funcionais constituídos pelas proteínas e pelos carboidratos foram bons indicadores para acompanhar as mudanças decorrentes das contaminações recorrentes em variedade crioula por pólen de milho GM portador dos eventos TC1507 e NK603 combinados, diferenciando gradativamente os diferentes *backgrounds* genéticos, segundo a proporção de eventos (TC1507 + NK603) na população;
- iv. Em grãos degerminados, os grupos funcionais constituídos pelos carboidratos, proteínas e lipídios não foram bons indicadores para detectar efeito da presença de transgenes (TC1507 isolado e combinado a NK603), a partir da análise em híbridos isogênicos, nem tão pouco para acompanhar às mudanças decorrentes das contaminações recorrentes de variedades crioulas por pólen de milho GM portador dos eventos TC1507 e NK603 combinados;
- v. Para embriões, os grupos funcionais constituídos pelas proteínas e lipídios foram satisfatórios para detectar o efeito da presença de transgenes, diferenciando híbridos isogênicos entre si pela ausência e presença de eventos (TC1507 isolado e TC1507 + NK603 combinados) e pela quantidade de eventos inseridos, assim como estes, em relação à população de milho crioulo não contaminado por milhos GMs.
- vi. Para embriões, os grupos funcionais constituídos pelas proteínas e lipídios não foram bons indicadores para detectar mudanças decorrentes da presença de transgenes combinado ao *background* crioulo, em simulações de contaminações recorrentes de variedade crioula por pólen de milho transgênico, portador do evento TC1507 isolado e combinado a NK603;
- vii. O agrupamento das populações derivadas de RS e GMH não produziu um padrão satisfatório para identificar os efeitos gradativos das contaminações recorrentes na variedade crioula por pólen de híbrido portador do evento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados espectrais de DRIFTS, na faixa de carboidratos, proteínas, lipídios e poli(fenóis) de grãos inteiros, degerminados e embriões, sob essas condições edafoclimáticas específicas de Florianópolis/SC, e utilizando-se de análises estatísticas multivariadas (PCAs e dendogramas), nossos resultados revelam que a ausência ou presença de transgenes (*Cry1F*, *Pat* e *cp4 epsps*), seja nas análises entre as variedades isogênicas, ou nos respectivos *backgrounds* com a variedade crioula Rosado-Rajado, influenciaram na dissimilaridade entre genótipos, com destaque para GMHR (evento piramidado com a presença dos três transgenes).

Os procedimentos metabolômicos baseados em DRIFTS, combinado com análise multivariada, possam abrir novas perspectivas no estudo de organismos geneticamente modificados, a fim de colaborar como *screening* inicial na análise de equivalência substancial com suas contrapartes convencionais, incluindo materiais crioulos. A partir dessa abordagem inicial, métodos mais específicos devem ser usados para validar e conhecer a origem das dissimilaridades encontradas no presente estudo, qualificando e quantificando os componentes químicos do grão e de suas partes que efetivamente estão envolvidos na definição dos agrupamentos. No entanto, para uma avaliação de segurança abrangente, devem ser realizados mais estudos como este em diferentes locais e anos, envolvendo outras cultivares híbridas GMs e variedades crioulas, acompanhadas de testes toxicológicos, biológicos e imunológicos.

Por fim, essas abordagens de equivalência substancial envolvendo milho GM, com possível existência de efeitos pleiotrópicos, são de fundamental importância na biossegurança de OGMs, e que com base nesse estudo, se abra um viés para que sejam incorporadas metodologias eficientes nas análises de risco dos possíveis efeitos do fluxo de transgenes em variedades crioulas, sendo este, um recurso genético de base alimentar de muitas famílias agrícolas de SC.

Como encaminhamentos e perspectivas futuras, recomenda-se realizar comparativos utilizando-se da aplicação de herbicidas; adubação orgânica; separação pela coloração dos grãos da variedade Rosado-Rajado e avaliação da camada de aleurona; realização do perfil de aminoácidos; e flavonoides no gérmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPITO-TENFEN, S. Z.; GUERRA, M. P.; WIKMARK, O. D.; et al. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. **Proteome Science**, v. 11, 46, 2013.

ASIAGO, V. M.; HAZEBROEK, J.; HARP, T.; et al. Effects of Genetics and Environment on the Metabolome of Commercial Maize Hybrids: A Multisite Study. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 11498–11508, 2012.

BALSAMO, G. M.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; BERTOLDO, J. B.; et al. Proteomic analysis of four Brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 11553-11559, 2011.

BARROS, E.; LEZAR, S.; ANTONEN, M. J.; et al. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, issue 4, p. 436-451, 2010.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, p. 1073–1101, 2007.

BATISTA, R.; OLIVEIRA, M. Plant natural variability may affect safety assessment data. **Regul. Toxicol. Pharm.**, v. 58, p. S8-S12, 2010.

BONWELL, E.; WETZEL, D. Innovative FT-IR imaging of protein film secondary structure before and after heat treatment. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 10067–10072, 2009.

BRASIL: MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Resolução Normativa nº 5, de 12/03/2008**, 2008.

BRASIL: MCT - Comissão técnica nacional de biossegurança. **Resolução Normativa nº 4, de 16/08/2007**, 2007.

CAIRES, A. R. L.; TEIXEIRA, M. R. O.; SÚAREZ, Y. R.; et al. Discrimination of Transgenic and Conventional Soybean Seeds by

Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 62, n° 9, 2008.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; DORE, P.; et al. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. **Food Chem.**, v. 108, p. 361–368, 2008.

CÉLERES: **Informativo biotecnologia**. 2013. Disponível em: <<http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf>>. Acesso em: 20/03/2014.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chemistry Toxicology**, v. 42, p. 1089- 1125, 2004.

CERNÁ, M.; BARROS, A.S.; NUNES, A.; et al. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 383–389, 2003.

CORDEIRO, A.; ALVES, A. C.; OGLIARI, J. B. Challenges for co-existence in small-scale farming: the case of maize in Brazil. In: BRECKLING, B.; REUTER, H.; VERHOEVEN, R. **Implications of GM-Crop Cultivation at Large Spatial Scales**. Theorie in der Ökologie 14. Frankfurt, Peter Lang. 2008.

DE LA GARZA, R. I. D.; GREGORY III, J. F.; HANSON, A. D. Folate biofortification of tomato fruit. **PNAS**, v. 104, n° 10, p. 4218–4222, 2007.

DOYLE, J.J.; DOYLLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EPAGRI/CIRAM: **Dados meteorológicos**. 2013.

FAO/OMS: Biotechnology and food safety. In: Report FAO/OMS, **FAO Food Nutrition Paper**, 61. Roma. 31p., 1996.

FAO: **FAO Statistical yearbook**. Roma. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>>. Acesso em: 15/06/2014.

FAO: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 1992. **Maize in human nutrition**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/T0395E/T0395E00.htm#Contents>>. Acesso em: 30/04/2014.

FERMENT, G.; ZANONI, M.; BRACK, P.; et al. **Proposta de Revisão da Resolução Normativa nº4 da CTNBio**. Brasília: MDA, 2009.

FRANK, T.; RÖHLIG, R.M.; DAVIES, H.V.; et al. Metabolite profiling of maize kernels—genetic modification versus environmental influence. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 3005–3012, 2012.

GALEANO, P.; DEBAT, C. M.; RUIBAL, F.; et al. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. **Environ. Biosafety Res.**, v. 9, p. 147-154, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Impactos ambientais das plantas transgênicas: as evidências e as incertezas. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Emater/RS, v.2, nº 3, 2001.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. 2001a. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1): 9pp. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 25/06/2014.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. 2001b. PAST: **Multivariate Statistics**. Disponível em: <<http://folk.uio.no/ohammer/past/multivar.html>>. Acesso em: 25/06/2014.

HEINEMANN, J. A. **Hope Not Hype: The Future of Agriculture Guided by the International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology for Development**. 2009. Third World Network: Malasia, 168 p.

HENRY, C.; MORGAN D.; WEEKES R.; et al. (2003). Farm scale evaluations of GM crops: monitoring gene flow from GM crops to non-GM equivalent crops in the vicinity: part I: forage maize. **DEFRA report EPG 1/5/138**. Disponível em: < <http://cib.org.br/wp->

content/uploads/2011/10/estudos_cientificos_ambiental_14.pdf>.
Acesso em: 04/02/2014.

HERRERO, A. M.; CARMONA, P.; PINTADO, T.; et al. Lipid and protein structure analysis of frankfurters formulated with olive oil-in-water emulsion as animal fat replacer. **Food Chemistry**, v. 135, Issue 1, p. 133–139, 2012.

JAMES, CLIVE. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. **ISAAA Brief**. n° 44. ISAAA: Ithaca, NY.

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea Mays* L.). **Tese**. Recursos Genéticos Vegetais. UFSC. 2007.

KUHNEN, S.; DIAS, P. F.; OGLIARI, J. B.; et al. Brazilian Maize Landraces Silks as Source of Lutein: An Important Carotenoid in the Prevention of Age-Related Macular Degeneration. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n° 11, p. 1609-1614, 2012.

LAMBERT, J.B.; SHURVELL, H.F.; LIGHTNER, D.A.; et al. **Organic Structural. Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 568 p., 2001.

LA PAZ, J. L.; PLA, M.; CENTENO, E.; et al. The use of massive sequencing to detect differences between immature embryos of MON810 and a comparable non-gm maize variety. **PLOS ONE**, v. 9, Issue 6, 2014.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theor. Appl. Genet.**, v. 60, p. 197-214, 1981.

LEVANDI, T.; LEON, C.; KALJURAND, M.; et al. Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for comparative metabolomics of transgenic versus conventional maize. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 6329–6335, 2008.

LI, X.; YANG, L.; ZHANG, J.; et al. Simplex and Duplex Polymerase Chain Reaction Analysis of Herculex® RW(59122) Maize Based on One

Reference Molecule Including Separated Fragments of 5' Integration Site and Endogenous Gene. **J. AOAC Int.**, 2009.

MANETTI, C.; BIANCHETTI, C.; CASCIANI, L.; et al. A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. **J. Exp. Bot.**, v. 57, p. 2613–2625, 2006.

MILLSTONE, E.; BRUNNER, E.; MAYER, S. Beyond “substantial equivalence”. **Nature**, 401, p. 525-526, 1999.

OGLIARI, J. B.; KIST, V.; CANCI, A. The participatory genetic enhancement of a local maize variety in Brazil. In: BOEF, W.; PERONI, N.; SUBEDI, A.; et al. (Org.). **Community Biodiversity Management. Promoting Resilience and the Conservation of Plant Genetic Resources**. 1 ed. Abingdon: Routledge, p. 265-271, 2013.

PICCIONI, F.; CAPITANI, D.; ZOLLA, L.; et al. NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1Ab gene. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 57, p. 6041–6049, 2009.

PISTORIUS, A. M.; DEGRIP, W. J.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T. A. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. **Biotechnol. Bioeng.** v. 103, p. 123–129, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

REN, Y.; WANG, T.; PENG, Y.; et al. Distinguishing transgenic from non-transgenic *Arabidopsis* plants by ¹H NMR-based metabolic fingerprinting. **J. Genet Genomics**, v. 36, p.621–628, 2009.

RICROCH, A. E.; BERGÉ, J. B.; KUNTZ, M. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. **Plant Physiology**, v. 155, n° 4, p. 1752-1761, 2011.

RIDLEY, W. P.; SIDHU, R. S.; PYLA, P. D.; et al. Comparison of the nutritional profile of glyphosate-tolerant corn event NK603 with that of conventional corn (*Zea mays* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, nº 25, p.7235-7243, 2002.

RÖHLIG, R. M.; EDER, J.; ENGEL, K.H. Metabolite profiling of maize grain: differentiation due to genetics and environment. **Metabolomics**, v. 5, p. 459–477, 2009.

SANTONI, I.; PIZZO, B. Evaluation of alternative vegetable proteins as wood adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 148–154, 2013.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; et al. EMBRAPA. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOLOS. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA Solos, 2006. 306p.

SANVIDO O.; WIDMER F.; WINZELER M.; et al. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. **Transgenic Res.**, v. 17, p. 317-335, 2008.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational spectroscopy**, v. 43, 13-25, 2007.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, p. 171–192, 2001.

SIDHU, R. S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R. L.; et al. Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 2305-2312, 2000.

SILVA, N. C. A. Diversidade de Milho Crioulo e Distribuição de Parentes Silvestres no Oeste de Santa Catarina: impactos potenciais do milho geneticamente modificado na conservação *in situ-on farm*. **Tese** - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. *no prelo*.

SILVERSTEIN, R.M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 387 p., 1994.

SIVAM, A. S.; SUN-WATERHOUSE, D.; PERERA, C. O.; et al. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. **Food Research International**, v. 50, Issue 2, p. 574–585, 2013.

SOMERS, D. A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 15, p. 126-131, 2004.

STEINMACHER, N. C. Caracterização físico-química, das propriedades reológicas e das proteínas de milho crioulo (*Zea mays*). **Dissertação**. Ciência de Alimentos. UFSC. 2005.

STEWART C. N.; HALFHILL, M. D.; WARWICK, S. I. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 806-817, 2003.

SUBIRADE, M.; KELLY, I.; GUÉGUEN, J.; et al. Molecular basis of **Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada**. film formation from a soybean protein: comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 23, p. 241–249, 1998.

TEIXEIRA, F. F.; VASCONCELOS, J. H.; NETTO, D. A. M.; et al. Mapeamento da distribuição geográfica do milho (*Zea mays* L.), com vistas à conservação das variedades crioulas. In: MMA. **Parentes Silvestres das Espécies de Plantas Cultivadas**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006, 23 p.

USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. **World Agricultural Production**. Date Created: March 2014. Disponível em: < <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> >. Acesso em: 20/03/2014.

VALENTIN, J. L. **Ecologia numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.
VENNERIA, E.; FANASCA, S.; MONASTRA, G.; et al. Assessment of the nutritional values of genetically modified wheat, corn, and tomato crops. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n°19, p.9206-9214, 2008.

WEBER, H.; HEIM, U.; GOLOMBEK, S.; et al. Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. **Plant J.**, v. 16, p.163- 172, 2008.

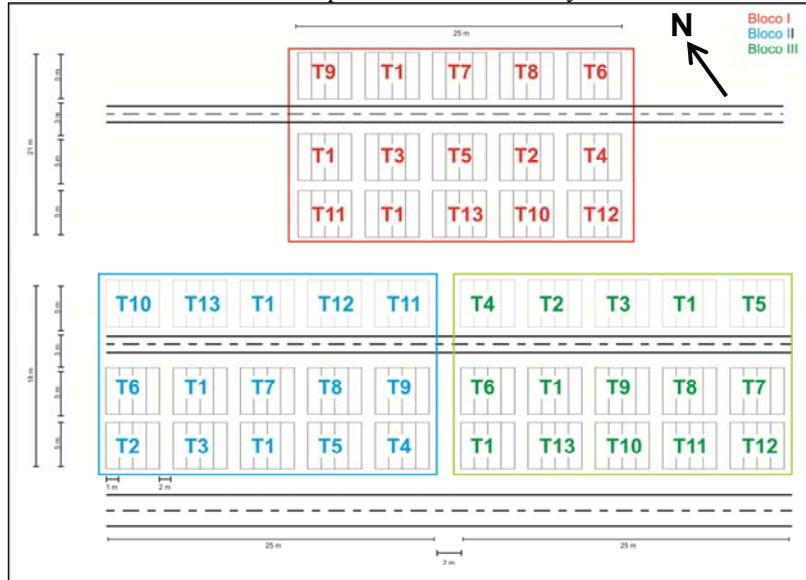
WIETHÖLTER, S. et al. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Porto Alegre (RS): SBCS-NRS, 2004. 394p.

XU, F.; SUN, R.C.; SUN, J.X.; et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 207–217, 2005.

ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S.; ANTONIOLI, P.; et al. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. **Journal Proteome Research**, v.7, p. 1850-1861, 2008.

ANEXOS

Anexo I: Croqui do experimento (safra 2012/2013) na Fazenda Ressacada/UFSC – Florianópolis/SC. Fonte: Kelly Justin da Silva.



Tratamentos	
T1	RS
T2	INGM
T3	75% INGM + 25% RS
T4	50% INGM + 50% RS
T5	75% RS + 25% INGM
T6	GMH
T7	75% GMH + 25% RS
T8	50% GMH + 50% RS
T9	75% RS + 25% GMH
T10	GMHR
T11	75% GMHR + 25% RS
T12	50% GMHR + 50% RS
T13	75% RS + 25% GMHR

Anexo II: Análise de solo do experimento (safra 2012/2013) na Fazenda Ressacada/UFSC – Florianópolis/SC.

UNOESC		UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA - UNOESC LABORATÓRIO DE FÍSICA DO SOLO Rua Benjamin Colla 289 - Bairro Senhor Bom Jesus CEP - 89620-000 - CAMPOS NOVOS - SC e-mail: labsolos.cnv@unoesc.edu.br Fone / Fax: (49) 3541 6321								
Relatório de Análise de Solo										
Nome: Kelly Justin da Silva										
CPF:										
Endereço:				Data de Recebimento: 15/02/2013						
Município: I				Data da Expedição: 20/02/2013						
NUM.	PROCOLO	MATRÍCULA	ARGILA %	pH H ₂ O	Índice SMP	P mg dm ⁻³	K mg dm ⁻³	M.O. %		
1	07/13	-	8	6,5	5,4	13,5	24	3,8		
2	08/13	-	8	5,7	5,5	4,6	32	3,9		
3	09/13	-	8	5,8	5,6	8,6	26	3,8		
<small>Argila determinada pelo método do densímetro; pH em água 1:1; P e K determinados pelo método Mehlich I; M.O. por digestão úmida.</small>										
NUM.	Al _{troc.} cmol _c dm ⁻³	Ca _{troc.} cmol _c dm ⁻³	Mg _{troc.} cmol _c dm ⁻³	Al+H cmol _c dm ⁻³	CTC cmol _c dm ⁻³	% SAT da CTC BASES	Al	RELAÇÕES		
								Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
1	0,0	5,6	4,0	8,9	17,5	50	0,0	1,1	74,1	65,2
2	0,1	4,6	4,0	7,6	13,8	45	1,6	1,2	40,3	34,2
3	0,0	3,2	2,6	6,6	12,5	47	0,0	1,2	48,1	39,1
<small>Ca, Mg, Al, Mn e Na trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹; S-BO, extraído com CaHPO₄ 500 mg L⁻¹ de P; Zn e Cu extraídos com HCl 0,1 mol L⁻¹; B extraído com água quente.</small>										
NUM.	S mg dm ⁻³	Zn mg dm ⁻³	Cu mg dm ⁻³	B mg dm ⁻³	Mn mg dm ⁻³	Fe g dm ⁻³	Na mg dm ⁻³	OUTRAS DETERMINAÇÕES		
Consulte um agrônomo para obter as recomendações de adubação										
NUM.	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA									
1	K1									
2	K2									
3	K3									
							 Eng. Agr. Dr. Analu Mantovani CREA/SC 060944-4 Responsável Técnico			

Anexo III: Figuras da implantação da área experimental (safra 2012/2013) na Fazenda Ressacada/UFSC – Florianópolis/SC. Fonte: Kelly Justin da Silva.



Anexo IV: Figuras experimento (safra 2012/2013) na Fazenda Ressacada/UFSC – Florianópolis/SC. Fonte: André Felipe Lohn.



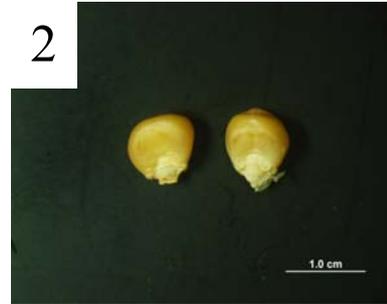
Anexo V: Figuras experimento (safra 2012/2013) na Fazenda Ressacada/UFSC – Florianópolis/SC na fase de polinização. Fonte: André Felipe Lohn.



Anexo VI: Figuras experimento (safra 2012/2013) na Fazenda Ressacada/UFSC – Florianópolis/SC na fase de colheita. Fonte: André Felipe Lohn.



Anexo VII: Figuras dos grãos. (1: Rosado-Rajado; 2: Isogênica não geneticamente modificada; 3: Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507; 4: Isogênica geneticamente modificada – evento TC1507 + NK603). Fonte: André Felipe Lohn. Microscópio estereoscópico (Olympus SZH-ILLB), equipado com câmara clara Olympus DP71).



2



4

Anexo VIII: Figuras dos grãos com detalhes do endosperma e embrião.
Fonte: André Felipe Lohn. Microscópio estereoscópico (Olympus SZH-ILLB), equipado com câmara clara Olympus DP71).



Anexo IX: Figuras da fase de preparação das amostras. Detalhes dos grãos degerminados e embriões. Fonte: André Felipe Lohn.



Anexo X: Figuras da fase de preparação das farinhas. Fonte: André Felipe Lohn.

