

PARECER TÉCNICO Nº 2754/2010

Processo nº: 01200.000800/2010-17

Requerente: Bayer S.A

CNPJ: 18.459.628/0001-15

Endereço: Rua Domingos Jorge, 1100 Prédio 9504 – 3º andar São Paulo –SP

Assunto: Liberação comercial de OGM

Extrato Prévio: nº 2286/2010, publicado em 29/03/2010

Reunião: 139ª Reunião Ordinária, ocorrido em 09/12/2010

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de algodão geneticamente modificado tolerante a herbicidas denominado GHB614 (Algodão GlyTol®), bem como todas as progênes dele provenientes, concluiu pelo DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico.

A Bayer S.A, detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB 005/96, solicitou à CTNBio parecer sobre a biossegurança de algodão geneticamente modificado tolerante a herbicidas denominado GHB614 (Algodão GlyTol®), com vistas ao livre uso no meio ambiente, registro, consumo humano ou animal, comércio ou uso industrial e qualquer outro uso ou atividade relacionado ao Evento ou seus subprodutos, respeitadas as demais legislações e exigências aplicáveis. O Evento GHB614 foi obtido através da transformação da variedade de algodão Coker 312 cuja modificação genética ocorreu através do sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para a inserção do gene *2mepsps* o qual é responsável pela expressão da enzima 2mEPSPS (5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase) com alteração em apenas dois aminoácidos na seqüência peptídica original. Esta enzima confere ao algodão GlyTol® seletividade as herbicidas contendo o ingrediente ativo: glifosato, permitindo assim, o controle de plantas daninhas em pós emergência da lavoura sem causar injúrias a cultura do algodão geneticamente modificado. Avaliações de biossegurança realizadas no algodão GHB614 demonstraram inocuidade alimentar, semelhantemente às plantas convencionais genitoras (var. Coker312). Em relação aos estudos de biossegurança foram conduzidas avaliações para determinar se o algodão GlyTol é similar as outras variedade de algodão em relação ao seu uso na alimentação humana/animal. Nesse sentido, foram realizados estudos de: caracterização molecular, nível de expressão da proteína 2mEPSPS em vários tecidos, análise nutricional/composicional, alimentação animal, digestibilidade da proteína, toxicidade aguda da proteína, homologia da proteína com compostos tóxicos/alergênicos. Os resultados em todos os casos indicaram que o Evento GHB614 e sua progênie são substancialmente equivalentes às outras variedades de algodão. O DNA inserido bem como a proteína expressa 2mEPSPS não oferecem nenhum risco significativo a saúde humana/animal comparativamente a utilização do algodão convencional e seus subprodutos na alimentação. Os aspectos de segurança ao meio ambiente foram analisados a partir de diversos estudos realizados no território nacional a campo onde demonstraram que as plantas derivadas do Evento GHB614 apresentam o mesmo comportamento agrônomo e de adaptabilidade em comparação aos genótipos convencionais, sem alteração sobre os caracteres que regulam a sobrevivência e reprodução da espécie. Análises comparativas das características morfológicas, fenotípicas e agronômicas demonstraram que nenhuma destas variáveis foi alterada em função da inserção do gene *2mepsps*. Adicionalmente, não foi observado nenhum caractere que pudesse conferir vantagem seletiva ao algodão GlyTol ou comportamento atípico à espécie. Com relação aos possíveis riscos para o meio ambiente foram consideradas e analisadas questões relativas à distribuição endêmica da forma silvestre de *G. mustelinum* no sul do Rio Grande do Norte e no nordeste baiano, ou sub espontâneas da espécie *G. barbadense* em toda a região Amazônica, no Pantanal, no sudeste do Piauí e oeste de Pernambuco, bem como na Mata Atlântica, compreendendo os estados RN, PB, AL, SE, BA, MG e ES. A especificidade de tolerância ao herbicida glifosato foi testada em campo quando as plantas foram submetidas à ação do glufosinato de amônio, resultando em total destruição das plantas assim tratadas. As análises de características morfológicas, fenotípicas e agronômicas não apresentaram

Secretaria Executiva da CTNBio

SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10

Brasília, DF – CEP: 70610-200

Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317-7475

diferenças entre o algodão geneticamente modificado e o não-geneticamente modificado, tampouco foram observados parâmetros que pudessem conferir vantagens seletivas ao algodão GHB614 ou comportamento atípico à espécie. Além disso, a CTNBio consultou literatura científica independente para avaliar a ocorrência de algum efeito inesperado oriundo do cruzamento entre esses eventos.

No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e legislação vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal e concluiu que o algodão GHB614 (Algodão GlyTol®) é substancialmente equivalente ao algodão convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, concluiu a CTNBio que o cultivo do algodão GHB614 (Algodão GlyTol®) não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao algodão convencional.

PARECER TÉCNICO DA CTNBio

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Algodão Glytol® Evento GHB614

Requerente: Bayer S.A

Espécie: *Gossypium hirsutum* L.

Característica Inserida: Tolerância ao glifosato

Método de introdução da característica: Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pTEM2

Uso proposto: produção de fibras para a indústria têxtil e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados

II. Informações Gerais

O algodão pertence ao gênero *Gossypium*, Tribo Gossypieae, Família Malvaceae, ordem Malvales (FRYXELL, P.A. 1979, MUNRO, J.M. 1987). Esse gênero subdivide-se em quatro subgêneros (*Gossypium*, *Sturtia*, *Houzingenia* e *Karpas*), que, por sua vez, se subdividem em nove seções e várias subseções (FRYXELL, P.A., CRAVEN, L.A. E STEWART, J.MCD. 1992).

O gênero *Gossypium* é constituído de 52 espécies distribuídas nos continentes: Ásia, África, Austrália e América, sendo que destas apenas 4 são cultivadas. O *Gossypium arboreum* L., cultivado na Índia é importante comercialmente e o *Gossypium herbaceum* L. que já teve maior importância no passado, atualmente é plantado apenas em algumas regiões secas da África e Ásia. Finalmente, cerca de 90% da produção mundial de algodão é de *Gossypium hirsutum* L. e 8% de *Gossypium barbadense* L. (LEE, 1984).

Das mais de 50 espécies já catalogadas, todas têm um número básico de cromossomos de $n = 13$, sendo uma parte delas diplóides ($2n = 26$) como os algodoeiros do Velho Mundo (África, Ásia), as espécies endêmicas da Austrália (CRAVEN et al., 1994) e algumas espécies da América. Outras espécies são tetraplóides (alotetraplóides), com $n = 2 \times 13 = 26$ e $2n = 52$, envolvendo segundo

FRYXELL (1984), seis espécies: *G. tomentosum*, endêmica no Havaí, *G. mustelinum*, no Nordeste do Brasil, *G. darwinii*, no arquipélago dos Galápagos, *G. barbadense*, com centro de origem na América do Sul, *G. lanceolatum*, originária do México, e *G. hirsutum* com centro de origem no México e sul dos Estados Unidos.

Das espécies que produzem fibra comercial, *G. hirsutum* e *G. barbadense* tetraplóides oriundas do Novo Mundo, *G. herbaceum* e *G. arboreum* são diplóides do Velho Mundo (GRIDI-PAPP, 1965).

O Brasil é o centro de origem do *G. mustelinum* e importante centro de diversidade de *G. barbadense* e *G. hirsutum* r. *marie galante*. Não possui variedades diplóides.

Segundo FREIRE et al. (1990) o *G. mustelinum*, a selvagem genuinamente brasileira, nunca foi melhorada ou explorada comercialmente, apesar de evidências da introgressão de alelos de *G. hirsutum* no seu genoma (WENDEL et al., 1994). O seu centro de origem é o Nordeste, onde ainda se encontram algumas populações nos municípios de Caiacó-RN, Macurerê-BA e Caraíba-BA (FREIRE, 2000).

No Brasil, a espécie *G. barbadense* L. têm ampla distribuição, na sua forma silvestre ou sub espontânea, desde a bacia amazônica até as matas tropicais do Rio Grande do Norte ao Espírito Santo, nas margens do Pantanal, nos cerrados do Centro Oeste (MT,MS,GO) e as terras baixas do semi-árido do Maranhão e Piauí. Duas espécies são encontradas, *G. barbadense* var. *barbadense* e o "Rim-de-Boi" *G. barbadense* var. *brasiliense*, presente em aldeias indígenas e fundos de quintais. É provável que a variedade *barbadense* foi introduzida das ilhas do Caribe, enquanto a *brasiliense* oriunda da floresta amazônica. A repartição das duas variedades no Brasil é o resultado das atividades agrícolas (BOULANGER & PINHEIRO, 1972) as populações sendo mantidas e cultivadas como variedades "locais". Atualmente, as variedades "modernas" de *G. barbadense* quase não são cultivadas no Brasil.

Gossypium hirsutum está representado em dois biótipos no Brasil. A raça *latifolium*, também conhecido como algodão "Upland" é o principal algodão cultivado no país. A raça *marie galante*, conhecida como algodão "Mocó" ou algodão "arbóreo" foi muito cultivado no Nordeste na década de setenta, e atualmente há muito poucas áreas.

As cadeias de algodoeiros especiais, convencionais e transgênicos têm convivido de modo satisfatório, sem que tenham sido divulgados relatos de problemas de coexistência. A área plantada com algodoeiro no Brasil na safra 2007/2008 foi cerca de um milhão e cem mil hectares, dos quais mais de 85% concentra-se no bioma Cerrado, particularmente nos estados do Mato Grosso, Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul. As demais lavouras estão presentes em outros estados do país,

principalmente no Semi-Árido da região Nordeste, no Paraná, em Minas Gerais e em São Paulo (IBGE, 2008).

Os algodoeiros são plantas notáveis em seus aspectos utilitários, os quais incluem fibras fiáveis e sementes oleaginosas e protéicas usadas na alimentação animal e humana. Suas espécies foram melhoradas pelo homem desde a antiguidade, tanto no velho quanto no novo mundo. O algodão (*Gossypium spp.*) é uma planta domesticada pelo homem desde o ano 3000 a.C. é cultivada em todos os continentes. Sua principal utilização é a produção de fibras e alimentação, especialmente de animais.

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das quatro espécies cultivadas no mundo para a produção da fibra de algodão (PENNA, J.C.V., 2005) e é explorada economicamente numa ampla faixa tropical e em algumas regiões subtropicais. A cultura de algodão no Brasil está entre as dez principais culturas agrícolas do Brasil e ocupa também o sexto lugar mundial em superfície cultivada.

O algodoeiro é considerado como sendo uma planta bastante sensível a interferência causada pelas plantas daninhas, devido a diversos aspectos internos (fotossíntese tipo C3, elevada taxa de fotorrespiração, etc.) e externos como a arquitetura das plantas e por apresentar crescimento inicial muito lento, o que condiciona a planta uma baixa capacidade de competição com as invasoras.

Com o emprego da tecnologia de DNA recombinante o desenvolvimento de uma linhagem de algodão geneticamente modificado, Evento GHB614, tem por objetivo propiciar o controle e manejo de plantas daninhas na cultura algodoeira através do uso seletivo do herbicida a base de glifosato. O efeito do herbicida se dá pela inibição da atividade da enzima EPSPS (rota de produção de aminoácidos aromáticos), sendo que este princípio ativo já está devidamente registrado no Brasil, inclusive para a cultura do algodão.

III. Descrição do OGM e Proteínas Expressas

O algodão GlyTol® - Evento GHB614 - foi geneticamente modificado pela inserção do gene *2mepsps*, responsável pela expressão da enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase (2mEPSPS) com mutação em 2 aminoácidos. Esta enzima modificada confere ao algodão GlyTol® seletividade ao efeito herbicida do ingrediente ativo glifosato, permitindo, assim, o controle de plantas daninhas em pós emergência da lavoura sem causar injúrias a cultura do algodão. O Evento GHB614 foi obtido pela inserção do gene de interesse e os elementos reguladores no genoma da variedade de algodão Coker 312. A modificação genética no Evento ocorreu através do sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pTEM2.

O gene *2mepsps* tem como origem o gene *epsps* em milho (*Zea mays*) com alteração através de mutação sítio-dirigida em apenas 2 (dois) aminoácidos na seqüência peptídica original, resultando numa proteína com menor afinidade de ligação ao glifosato, mantendo assim sua funcionalidade (via do chiquimato e síntese de aminoácidos aromáticos) mesmo sob as condições de pulverização com este herbicida.

Os elementos presentes entre as bordas esquerda e direita no vetor pTEM2 incluem, além do gene *2mepsps*, os elementos reguladores para sua expressão.

Assim, o gene quimérico *2mepsps* contém: Promotores Ph4a748At e intron1-h3At; peptídeo de trânsito otimizado - TPotp C – que direciona a proteína para os plastídeos e a seqüência sinal de poliadenilação 3' histonAt.

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo largamente utilizado na agricultura. O modo de ação do glifosato consiste na alteração de diferentes processos bioquímicos vitais nas plantas, como a biossíntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos (GLASS, 1984). O herbicida é absorvido pelo tecido vivo e translocado, via floema, através da planta para raízes e rizomas, e sua ação inibe enzimas específicas como a enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS) suspendendo a síntese de aminoácidos aromáticos (AMRHEIN, ET al., 1980; COUTINHO e MAZO, 2005). No entanto, o gene *2mepsps*, originalmente isolado de células em suspensão de milho (*Zea mays*) (LEBRUN et al., 1997), contém substituição em 2 (dois) aminoácidos em relação à seqüência original, resultando na expressão de uma proteína insensível à atividade do glifosato.

O gene que expressa o atributo de seletividade ao glifosato no Evento GHB614 é denominado *2mepsps*, que tem como origem o gene *epsps* em milho (*Zea mays*) com alteração através de mutação sítio-dirigida em apenas 2 (dois) aminoácidos na seqüência peptídica original, nas posições 102 (substituindo treonina por isoleucina) e na posição 106 (substituindo prolina por serina) (LEBRUN et al., 1997), resultando numa proteína com menor afinidade de ligação ao glifosato, mantendo sua funcionalidade e mesmo sob as condições de pulverização com este herbicida.

A proteína EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, E.C. 2.5.1.19) é uma enzima chave na via do chiquimato. Apesar desta rota estar presente em plantas e em muitos microrganismos, ela é completamente ausente em mamíferos, peixes, pássaros, répteis e insetos. Estas formas de vida não dependem da via do chiquimato porque retiram da dieta os produtos aromáticos que necessitam. Já as plantas são obrigadas a produzir estes aminoácidos essenciais para sobreviver e multiplicar (GRUYS & SIKORSKI, 1999). O glifosato age sobre a EPSPS inibindo a via de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina, os quais são precursores de outros

produtos, como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (STEINRÜCKEN e AMRHEIN, 1980; BUSSE et al., 2001; ZABLOTOWICZ & REDDY, 2004).

O algodão GlyTol expressa a enzima 2mEPSPS que, por apresentar insensibilidade à ação deste herbicida, possibilita a manutenção da via do chiquimato, e assim, o pleno desenvolvimento do vegetal mesmo quando pulverizado com tal herbicida.

IV. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

A cadeia de polipeptídeo expressa tem massa molecular de 47 kDa e 445 aminoácidos apresentando alta similaridade com a seqüência da proteína de milho (> 99,5%). A expressão do gene nuclear resulta em mRNA traduzido no citoplasma sendo o polipeptídeo importado para o interior dos cloroplastos onde a enzima exerce sua função. Sítios de glicosilação residem nas asparaginas 118 e 394. Para estudos de toxicidade aguda, grandes quantidades da proteína são necessárias e foi comprovada a identidade diretamente, em SDS-PAGE e pela detecção imunológica via Western blot do material da planta e daquele expresso em bactéria. Análise cromatográfica, espectroscopia de massa e seqüência N-terminal do polipeptídeo também resultaram idênticas. A quantificação da proteína 2mEPSPS nos diferentes tecidos do Evento GHB614 foram realizadas através de imunoenaios (ELISA). Os dados detalhados estão mostrados nos itens 2.5.3. Segue abaixo resumo dos resultados encontrados.

a. Quantidade de proteína 2mEPSPS em sementes descaroçadas de algodão GlyTol: os resultados apresentados mostram que a proteína foi detectada em todas as frações relacionadas às sementes GM. Mais que 99,5% da 2mEPSPS foi encontrada no grão (semente lisa) e também na semente descaroçada (grão + linter). A fração linter contém menos que 0,5% de 2mEPSPS. O nível de expressão da proteína variou nas diferentes localidades e entre os tratamentos com glifosato. Os valores variaram entre 16,2 µg/g a 30,5 µg/g de matéria fresca nas amostras de GlyTol submetidas à aplicação com glifosato e entre 15,8 a 25,5 µg/g nas amostras sem a pulverização com este herbicida, representando, na média, 0,0093% e 0,01% do total de proteína, respectivamente.

b. Teor da proteína 2mEPSPS em diferentes tecidos ao longo do ciclo da cultura. O teor de 2mEPSPS em folhas jovens decresceu ao longo do ciclo, indo de 11,16±3,73 a 0,45±0,22 µg/g da matéria fresca quando atingiu o estágio 4. No caule, os teores da proteína se mantiveram relativamente constante entre os estádios 2 e 4, enquanto que nas raízes, a 2mEPSPS aumentou. No geral, os teores da proteína 2mEPSPS no algodão GlyTol foram maiores nas folhas durante o estágio 2 (7,94±2,87 MF) e menores em pólen (0,16±0,0 µg/g).

Há um kit comercial para imunodetecção específica da proteína EPSPS expressa no evento GHB614. Está também validada a técnica de detecção do transgene por meio de PCR quantitativo que estará à disposição dos interessados havendo aprovação da presente solicitação.

Os dados das avaliações nutricional e composicional centesimal do algodão GlyTol e seu equivalente ao parental não-modificado, variedade Coker312 e a outras variedades convencionais de algodão estão sumarizadas na Tabela 13 (OBERDORFER, 2010). Para isso foram analisadas: composição centesimal, fibras, micronutrientes (minerais e vitamina E), antinutrientes totais, gossipol, ciclopropenoides, ácido fítico, aminoácidos totais e ácidos graxos.

Foram utilizadas para análises composicional do algodão GlyTol sementes descaroçadas (grãos + linter) oriundas de plantas cultivadas em 17 localidades nos Estados Unidos nas safras de 2005 e 2006. Além deste material, foram feitas análises composicionais no linter, casca, sementes deslintadas, tortas (crua e tostada) e óleo (bruto, refinado e desodorizado). As plantas de algodão convencional Coker312 e GlyTol receberam os tratamentos típicos para a cultura, com a adição de glifosato para parcelas do algodão GlyTol. Adicionalmente, uma parcela do mesmo algodão foi conduzida sem a aplicação do herbicida glifosato. As culturas foram conduzidas nas condições típicas para o algodão, com exceção da aplicação de glifosato, feita sobre 3 parcelas contendo algodão GlyTol. Para a comparação, foram mantidas, nas mesmas condições, 3 parcelas de GlyTol sem aplicação com glifosato.

Os dados mostraram que para a maioria dos componentes analisados não se identificou diferença significativa entre o algodão GlyTol e a sua iso-linha. Nos casos de ocorrência de variação, elas não representaram impacto nutricional pelas seguintes razões:

- os valores encontrados para as amostras de GHB614 e de Coker 312 estavam dentro da amplitude relatada para produtos comerciais, especialmente para os ciclopropenóides (ácidos graxos malvalico, esterculico e dihydroesterculico);
- não existiu tendência na variação encontrada. Na análise de fibra (neutra), por exemplo, em alguns tecidos foram encontrados valores maiores no GHB614 e em outros menores, comparados ao Coker 312;
- diferenças nos níveis de nutrientes foram observadas em apenas um produto. Os valores mensurados para o ácido graxo mirístico (C14:0) apresentaram diferença entre os genótipos apenas quando analisados no óleo refinado, o que não foi observado nas sementes descaroçadas, sementes deslintadas e no óleo bruto;
- diferenças nos níveis de nutrientes foram tão pequenas que não têm relevância nutricional (variação de 0,1% para ácidos graxos medidos em casca e fibras entre os genótipos).

O conteúdo dos minerais analisados em sementes de GHB614 e Coker 312 foi equivalente entre os genótipos (Tabela 20), com exceção do Ferro e de Cálcio, que, no caso das sementes deslintadas (Tabela 21) os teores foram superiores ao GHB614. Ainda assim os valores observados estão dentro da faixa média descrita por outros autores. As variações observadas de outros compostos químicos (nutrientes ou fatores anti-nutricionais) foram apontadas nas tabelas 21 a 28 e estão dentro de valores equivalentes para a iso-linha.

A composição de aminoácidos analisada em diferentes partes das plantas GHB614 e Coker 312 estão apresentadas nas tabelas 29 a 32. As amostras de tortas de algodão testadas apresentaram valores aumentados de aminoácidos, independentemente da origem do material utilizado na preparação, aos valores da literatura. Estes resultados podem ser consequência da forma de preparação das amostras ou ainda ser uma característica específica da variedade parental utilizada para transformação. As diferenças entre as amostras testadas, GHB614 e Coker312, não foram estatisticamente significativas, permitindo afirmar que são equivalentes quanto à composição de aminoácidos.

O algodão é raramente consumido por mamíferos, aves e outras espécies de animais silvestres presentes na área de cultivo. Organismos não-alvo como predadores e presas das pragas do algodão presentes em plantações de algodão serão expostos a níveis mais baixos da proteína 2mEPSPS por meio de transferência trófica. Entretanto, não há qualquer evidência de efeitos negativos da proteína sobre estas populações. Como o algodão GlyTol evento GHB614 demonstrou ser equivalente à planta de algodão convencional, com exceção a sua característica de tolerância ao glifosato, suas interações básicas com microorganismos presentes no meio ambiente não mostraram diferenças das interações do algodão convencional.

Utilizaram frangos durante a fase de crescimento. Cento e quarenta aves em dois subgrupos (machos e fêmeas), com sete repetições (10 aves cada) testando-se um algodão comercial, a iso-linha Coker 312 e o evento GHB614. O experimento teve duração de 40 dias e foram avaliados os parâmetros de desempenho dos animais, conversão alimentar e características gerais de saúde da ave. Não se observou qualquer alteração que pudesse ser atribuída a presença de algodão geneticamente modificado.

Não houve diferenças significativas quanto à mortalidade ou alterações patológicas em órgãos diversos.

A degradabilidade da proteína foi testada num sistema que simulou o fluído gástrico humano. Foi realizado um ensaio *in vitro* seguindo a metodologia descrita por THOMAS et al (2004) que estabeleceu o protocolo utilizando pH 1,2, adição da enzima pepsina (Sigma), incubação a 37oC durante 0,5 a 60 minutos e uso de controles positivo e negativo com as proteínas peroxidase e

ovalbumina, respectivamente. As soluções contendo os peptídeos resultantes dos ensaios foram submetidas à análise por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e corados com Comassie blue (NEUHOFF et al., 1988).

As figuras 19 e 20 ilustram os géis SDS-PAGE em que a proteína 2mEPSPS foi rapidamente e completamente degradada nestas condições de ensaio. A proteína controle peroxidase foi digerida rapidamente, enquanto a ovalbumina, lentamente, como esperado (HEROUET-GUICHENEY, *et al.*, 2009). A simulação é, provavelmente, uma imitação simplificada da condição reinante dentro do tubo digestivo quando várias enzimas atuam simultânea e seqüencialmente, levando à degradação completa. O resultado é garantia adicional de não absorção da proteína intacta e ausência de interferência sistêmica e já indica baixo potencial alergênico desta proteína.

No estudo de toxicidade aguda em que altas concentrações das proteínas 2mEPSPS e BSA (albumina de soro bovino) foram administradas por via oral em animais e ao final de 15 dias de ensaio, os indivíduos foram sacrificados e necropsiados para análise macroscópica. Os animais foram anestesiados através de inalação com isoflurano antes da necropsia e posteriormente submetidos ao exame das cavidades torácica e abdominal e dos principais órgãos e tecidos. Os resultados mostraram que não há correlação entre as anormalidades encontradas para ambos os tratamentos. Essas alterações são comuns devido à raça do animal, idade e condições do teste, portanto, considerada como sendo variações espontâneas e sem relação de efeito causado pela proteína 2mEPSPS. Além disso, o acompanhamento dos sinais clínicos, os dados de peso corporal e ganho de peso dos animais oriundos do mesmo ensaio, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, indicando que a administração oral em alta concentração da proteína 2mEPSPS não resulta em qualquer evidência de risco à saúde humana/animal devido ao seu uso na alimentação (ROUQUIE, 2006).

Posteriormente, outro estudo de toxicologia aguda também foi realizado com roedores, sendo injetado até 10mg de proteína purificada diretamente na corrente sanguínea destes animais. A metodologia empregada baseou-se nos guidelines *US-EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100* e no *OECD Test Guideline 425*, utilizando-se como controles negativo e positivo, os componentes aprotinina e melitina, respectivamente. Os animais tratados com 1mg e 10mg de 2mEPSPS não apresentaram mortalidade, nem sintomas de toxicidade mesmo ao final de 15 dias do tratamento. No final do experimento, quando os roedores foram submetidos à necropsia e exame macroscópico nos órgãos e tecidos, nenhuma alteração ou anormalidade foram encontradas mesmo nos indivíduos submetidos a 10mg de 2mEPSPS por via intravenosa (ROUQUIE, 2008).

Na avaliação do potencial de alergenicidade, a fonte dos genes, o histórico de exposição, a digestibilidade das proteínas e uma comparação com seqüências de proteínas reconhecidas

alergênicas foram considerados. O gene *2mEPSPS* foi obtido de fontes sabidamente não causadoras de reações alérgicas e as proteínas têm um longo histórico de uso seguro, inclusive em outros OGMs ou derivados já aprovados para comercialização no Brasil.

Como demonstrado na literatura científica, um fator que contribui para a alergenicidade de proteínas é a sua presença em alta concentração nos alimentos. A maioria das proteínas alergênicas está presente em altas concentrações em alimentos específicos, geralmente representando de 2% a 3% ou até 80% das proteínas totais (ASTWOOD E FUCHS, 1996). Ao contrário, a proteína *2mEPSPS* é detectada em níveis extremamente baixos nos tecidos estudados, da ordem de 100ng por mg de sementes, com percentuais que variam de 0,5% a 0,00016% do conteúdo protéico da planta, dependendo do estadio da planta e da parte analisada. Além disso, as moléculas produzidas pelo gene *2mEPSPS* são prontamente degradadas quando ingeridas. Como é sabido, os produtos de algodão (óleo do caroço e fibras curtas) utilizados para o consumo humano ou animal são altamente processados e assim, a proteína *2mEPSPS* não é detectada nestes materiais.

Mesmo considerando a imediata degradação da proteína *2mEPSPS* após ingestão e a não detecção destas proteínas em produtos derivados do algodão GlyTol, a existência de possíveis seqüências de aminoácidos com similaridade a alérgenos já descritos foi investigada. Nos dados apresentados no trabalho de HEROUET et al (2009) fica claro que a proteína *2mEPSPS* apresenta similaridade apenas com outras enzimas EPSPS de diferentes espécies. Além disso, não apresenta nenhuma similaridade com compostos reconhecidamente alérgenos ou tóxicos, nem apresenta similaridade com epítomos e sítios de glicosilação. Considera-se positivo o resultado da similaridade da seqüência quando for obtida identidade superior a 35% entre as seqüências de aminoácidos, ou quando for observada identidade numa seqüência de 6 (seis) aminoácidos contíguos. Este número de aminoácidos tem sido objeto de discussão, havendo proposta de que sejam 8 (oito) aminoácidos para evitar resultados falso-positivos (ILSI, 2001). Buscas *in silico* foram realizadas para identificar todos os alérgenos conhecidos apresentando uma identidade de aminoácido > 35% com a proteína *2mEPSPS* em uma janela de 80 aminoácidos. A seqüência completa de aminoácidos da proteína *2mEPSPS* foi comparada ao AllergenOnline (versão 8.0, 1313 seqüências). O AllergenOnline (<http://www.allergenonline.com>) é uma lista de recursos voltada para alérgenos conhecidos e putativos. Esse banco de dados sobre alérgenos foi especificamente desenvolvido para prever a alergenicidade de novas proteínas pelo Food Allergy Research and Resource Program (FAR-RP). O banco de dados é atualizado anualmente por buscas da NCBI e International Union of Immunological Societies (IUIS), bem como pela avaliação da entrada de candidatos por evidência de alergenicidade. Adições e subtrações no banco de dados são feitas por um painel de revisão de especialistas internacionais em alergia para julgar se as proteínas são alérgenos ou alérgenos putativos com base em critérios predefinidos. Os critérios e referências para evidência de

alergenicidade dos grupos são fornecidos no website. Em março de 2009, outra procura *in silico* foi realizada em uma tentativa de determinar se a proteína 2mEPSPS compartilha as identidades do aminoácido com toxinas conhecidas. A seqüência de aminoácidos completa da proteína 2mEPSPS foi então comparada a todas as seqüências da proteína (incluindo toxinas potenciais) presentes em seis amplos bancos de dados públicos de referência: Uniprot-Swissprot (versão 56.7, 2009; 408.099 seqüências), Uniprot-trEMBL (versão 39.7, 2009; 7.001.017 seqüências), PIR (Protein Identification Resources, versão 80, 2004, 283.416 seqüências), Nrl-3D (2007, 56,020 seqüências), DAD (DDBJ Aminoacid sequence Database, 44.0, 2008; 2.561.319 seqüências), e Genpept (versão 169, 2009, 6.185.784 seqüências). Para todas as buscas, o algoritmo de comparação usado foi BLASTP (programa de ferramenta de busca de alinhamento local padrão proteína-proteína básica), que é mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI, ALTSCHUL et. al., 1997). A matriz de pontuação BLOSUM62 permitiu a comparação de seqüências com divergência de não menos que 62% (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992). A busca de sítios putativos para N-glicosilação na proteína 2mEPSPS também foi examinada com base na sua seqüência de consenso conhecida. As seqüências foram Asparagina-Xaa-Serina/Treonina (onde Xaa representa qualquer aminoácido exceto Prolina) e Asparagina-Xaa-Cisteína. O algoritmo usado para realizar análises foi o programa FindPatterns do software integrado CGC. O resultado geral do BLAST de similaridade, feita em 2009, não mostrou evidências de nenhuma semelhança entre a proteína 2mEPSPS e qualquer proteína alergênica conhecida. A análise FindPatterns de similaridade para epítomos confirmou que não houve evidências de qualquer semelhança com alérgenos, ou seja, sem identidade com oito aminoácidos contínuos com alérgenos conhecidos, usando-se o banco de dados AllergenOnline.

Os resultados também mostraram que não houve semelhança com toxinas conhecidas, ou que possa identificar homologia funcional entre a proteína 2mEPSPS e toxinas conhecidas. Conforme esperado, os resultados do BLAST mostraram que a proteína 2mEPSPS apenas apresenta alta semelhança estrutural com outras proteínas EPSPS, inclusive a proteína do milho (>99%). A alta similaridade das proteínas 2mEPSPS e EPSPS tipo selvagem indica um perfil de segurança. Finalmente, os locais putativos de N-glicosilação presentes na seqüência da 2mEPSPS, nas posições 118 e 394, foram idênticos aos locais na proteína EPSPS do milho, com isso, pode-se concluir que os dois locais putativos não apresentam problemas de segurança (HEROUET et al., 2009). Em resumo, os dados apresentados pela solicitante sustentam a conclusão de que a proteína 2mEPSPS, nas condições encontradas nos derivados do algodão GlyTol não apresenta riscos maiores de alergenicidade para humanos e animais que as variedades não transgênicas.

V. Aspectos Ambientais

Segundo dados levantados pela ABRAPA (Associação Brasileira de Produtores de Algodão), o Brasil cultivou 1,07 milhões hectares na safra 2008/09, dos quais 300mil hectares foram plantados com algodão geneticamente modificado (SILVEIRA et al., 2009). A expectativa da Abrapa para a safra 2009/10 é de uma redução ao redor de 23%, para 850 mil hectares, com produção de 1,2 milhão de toneladas de pluma.

Os resultados experimentais no Brasil gerados em ensaios autorizados pela CTNBio e MAPA demonstram sensível redução no uso de herbicidas nas lavouras, o que simplifica o sistema de controle de plantas daninhas quando comparado ao algodão convencional. Um bom exemplo da alta penetração do produto são os índices de adesão à tecnologia nos Estados Unidos e na Austrália: em 2006, nove anos após a primeira plantação comercial de Algodão tolerante ao glifosato (Evento MON1445) nas lavouras americanas, 65% da área plantada de algodão no país já era com o respectivo Evento. Na Austrália, a primeira área comercial foi em 2000 e em apenas seis anos a área plantada com o produto já representava 75% da área de algodão plantada no País. Nestes países que já apresentam, portanto, um longo histórico de uso no meio ambiente, não existe nenhuma referência quanto a efeitos adversos ou degradação ambiental em decorrência desta tecnologia que permite o manejo de plantas daninhas com glifosato.

Num outro estudo, CHIAVEGATO (2009b) avaliou a resposta do Evento a diferentes doses do herbicida e em diferentes estágios de crescimento, possibilitando avaliar se o nível de expressão do gene *2mepsps* era suficiente para a proteção da planta, bem como avaliar a especificidade do gene em atribuir seletividade apenas ao herbicida glifosato. No anexo II do processo está descrito na íntegra os protocolos e tratamentos utilizados nos ensaios realizados no Brasil. Os resultados obtidos pela análise dos dados fenológicos indicaram que as plantas derivadas do Evento GHB614 mostraram-se tolerantes ao Glifosato, inclusive em altas doses do herbicida, uma vez que os parâmetros avaliados não diferiram estatisticamente dos dados analisados nas plantas manejadas sem o herbicida. Isso indica que a proteína 2mEPSPS foi expressa em nível suficiente para a devida proteção da planta permitindo a manutenção do seu crescimento e desenvolvimento normais.

Quando as plantas foram submetidas a aplicações do herbicida *Glufosinato de Amônio* com o objetivo de avaliar a especificidade do Evento para a seletividade apenas ao ingrediente ativo glifosato, tanto as plantas VGM (algodão GlyTol) como NM mostraram-se altamente sensíveis, levando à injúria total das plantas aos 14 dias após a aplicação, demonstrando que o gene *2mepsps* atua unicamente na tolerância ao glifosato, sem qualquer atributo adicional de sobrevivência ou de vantagem adaptativa ao algodão GlyTol. Esse teste demonstrou ainda que, se houver necessidade

de erradicação de plantas derivadas do Evento GlyTol, o uso de outros herbicidas não seletivos à cultura, continua sendo eficiente para tal fim.

Segundo FREIRE (2000), a possibilidade de fluxo gênico entre o algodão GM e os algodoeiros silvestres é remota devido ao isolamento da distribuição espacial prevista para os cultivos comerciais (distribuídos nas lavouras de alta tecnologia do cerrado) em áreas reconhecidamente isentas de tipos silvestres. Caso a transferência ocorra, a vantagem adaptativa representada por uma tolerância a um herbicida específico será nula, uma vez que estes algodoeiros são cultivados em pequenas áreas e capinados manualmente.

Adicionalmente, nenhuma alteração bioquímica/fisiológica que influencie na capacidade de sobrevivência natural das plantas no ambiente foi detectada. O novo atributo que permite o uso seletivo de um herbicida de amplo espectro em pós-emergência, não insere qualquer vantagem competitiva ou adaptativa ao indivíduo, mesmo em situações de estresses, como infestação de patógenos ou competição com plantas daninhas. O fenótipo diferenciado das plantas que expressam o gene *2mepsps* só é percebida nas condições de manejo de invasoras onde se utiliza o herbicida glifosato.

Finalmente, nas condições brasileiras, as regiões de cultivo com algodão não apresentam qualquer planta daninha que seja sexualmente compatível com as espécies de *Gossypium* cultivadas. Aparentemente, as possibilidades de cruzamento entre espécies de algodão e outras Malváceas cultivadas (como o quiabo, *Hibiscus esculentus*, ou *Hibiscus cannabinus* e a vinagreira *Hibiscus sabdariffa*) são muito remotas.

Não é esperado que ocorra qualquer alteração significativa nos organismos presentes no ecossistema agrícola onde se pretende efetuar o cultivo do algodão GlyTol, uma vez que este OGM só é diferenciado dos parentais convencionais pela presença do gene *2mepsps*, que atua na seletividade ao glifosato e não apresenta nenhum efeito pleiotrópico, nem epistático.

A proteína 2mEPSPS expressa no Evento GHB614 tem como origem a proteína EPSPS de milho, contendo 2 modificações na sua sequência de aminoácidos, quais sejam a substituição de uma treonina por isoleucina na posição 103 e de prolina por uma serina na posição 107. Ainda assim, a 2mEPSPS apresenta 99,5% de homologia com a EPSPS de milho, 86% com arroz, 79% com uva, 77% com arroz e 75% com tomate (HEROUET-GUICHENEY ET al., 2009). Até o presente, nenhuma referência bibliográfica aponta para qualquer efeito adverso em simbioses, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores devido a expressão da proteína EPSPS.

Os organismos que interagem com a cultura do algodão, tais como pragas, roedores e pássaros, podem sofrer algum dano devido a presença do composto gossipol (BELL, 1986; ABOU-DONIA,

1989), que ocorre em níveis similares tanto no GlyTol como nos seus parentais convencionais, portanto, não tem nenhuma relação com a modificação genética em questão.

No Brasil, um dos tratamentos aplicados ao algodoeiro GlyTol e na isolinha convencional, cultivados no meio ambiente, foi o estresse biótico, onde não houve nenhum controle de pragas e doenças ao longo do ciclo de cultivo da cultura. Os dados coletados e apresentados por CHIAVEGATO (2009a) mostram que as pragas curuquerê, Spodoptera, lagarta das maçãs, pulgão e mosca branca, e os fitopatógenos ramularia, ramulose e doença azul (virose) infestaram tanto o algodão Glytol como a linhagem não modificada. Isto indica que nenhuma espécie de praga e fitopatógeno tiveram preferência diferencial por um dos genótipos, ou tenha sido favorecido seu aumento de população.

CURRIER (2006) fez um estudo comparando a morfologia, viabilidade e taxa de sobrevivência do pólen de algodão dos genótipos GlyTol (GM) e Coker312 (convencional). Para isso, 14 plantas derivadas do Evento GHB614 e 10 oriundas do parental convencional foram cultivadas em vasos dentro de casa de vegetação nas instalações da Bayer Cropscience (Research Triangle Park, Raleigh, NC, USA). Amostras de pólen foram coletadas manualmente e transferidas para meios específicos para que se procedessem as análises. A viabilidade foi medida pelo método descrito por BARROW (1981), o qual analisa o crescimento de estruturas iniciais do tubo polínico por microscopia. Esta análise foi repetida várias vezes durante 3 dias. Os resultados mostraram que a viabilidade inicial dos polens do algodão GHB614 e de Coker312 foi maior que 90%. O decréscimo da viabilidade apresentou uma cinética ao longo do tempo similar entre os genótipos, sem diferenças estatísticas.

Com base nos dados e no referencial bibliográfico, não é esperado que o algodão GlyTol tenha maior capacidade de reprodução e sobrevivência em qualquer ambiente de forma diferenciada às cultivares que já estão em comercialização. A vantagem adaptativa do Evento GHB614 é observada apenas quando a cultura é pulverizada com o herbicida glifosato, onde as plantas que contém o gene *2mepsps* mantém seu desenvolvimento de forma normal, sem injúrias ou fitotoxicidade.

O uso do algodão GlyTol, Evento GHB614, tem por objetivo incrementar o manejo de plantas daninhas no cultivo do algodão em pós-emergência, utilizando um herbicida de amplo espectro de ação. Esta característica do Evento não resulta em tolerância a nenhum elemento biótico do ambiente, portanto, não existe organismo alvo da tecnologia.

As plantas invasoras que normalmente ocorrem nas áreas de produção de algodão e que têm causado grandes prejuízos e/ou têm reduzido a qualidade intrínseca do produto colhido são: *Bidens pilosa* (picão preto), *Cenchrus echinatus* (carrapicho), *Ipomoea* spp (corda-de-viola) e guanxumas perenes (*Sida* spp). A infestação de daninhas na cultura do algodão resulta também em aumento de danos causados por pragas e doenças, por servirem de hospedeiras; aumentam a dispersão de sementes de invasoras; aumentam a necessidade de práticas de cultivo e de controle químico e

reduzem a estrutura e umidade do solo devido ao aumento do preparo do solo (gradagens) em pré-plantio para reduzir a infestação inicial. O uso do cultivo mínimo ou do plantio direto têm sido medidas importantes para a conservação de solos em áreas com maiores riscos de erosão.

Dessa forma, o controle de daninhas através da aplicação em pós-emergência com glifosato será provavelmente um importante componente para os sistemas que visam uma melhor conservação do solo, pelo fato de reduzir a movimentação em pré-plantio e por aumentar a estrutura do solo devido à manutenção de raízes e restos vegetais (FAWCETT e TOWER, 2004; SANKULA, 2006).

Nos estudos a campo realizados no exterior, os técnicos da requerente fizeram visitas freqüentes às áreas experimentais para a coleta de dados e manejo da cultura, sendo observados a infestação por pragas, doenças e a presença de inimigos naturais. Em nenhum dos casos foram percebidas variações em relação ao aumento ou diminuição de pragas, doenças, insetos polinizadores, predadores ou qualquer outro organismo benéfico presente nos experimentos, comparativamente ao cultivo com algodão convencional (Van DUYN, 2007).

Os resultados do estudo ambiental realizado por CHIAVEGATO (2009a) indicaram que nenhuma espécie de praga ou fitopatógeno teve preferência diferencial por um dos genótipos (VGM ou NM), ou tenha sido favorecido ao aumento de população.

Entre as hipóteses de risco da liberação comercial de uma cultura geneticamente modificada existe a hipótese de que estes VGM possam se tornar plantas daninhas, com maior capacidade de sobrevivência e invadir *habitats* naturais, e como consequência, comprometer sua biodiversidade. Assim, é importante avaliar se os genótipos GM apresentam características fenotípicas diferenciadas, que possam torná-los mais invasivos (WILLIAMSON, 1993). Alguns atributos marcantes de plantas daninhas como dormência, plasticidade fenotípica, crescimento indeterminado, florescimento contínuo e fácil dispersão de sementes (BAKER, 1974) têm sido eliminados da maioria das culturas agrícolas ao longo de gerações durante o melhoramento genético. Esses caracteres não são buscados para a transferência de genes nas cultivares, seja através da biotecnologia (DNA recombinante) seja através do melhoramento clássico, uma vez que tais atributos reduzem drasticamente o desempenho agrônomo das variedades modernas.

Além disso, estas características são, em geral, comandadas por vários genes. CRAWLEY et al., (2001) discute os resultados obtidos do estudo de longo prazo avaliando o desempenho de culturas GM em *habitats* naturais. Quatro culturas (canola, batata, milho e beterraba) apresentando os atributos adicionais de tolerância a herbicida ou resistência a insetos, foram cultivadas em 12 diferentes *habitats* e monitoradas ao longo de 10 anos. Em nenhum dos casos as plantas geneticamente modificadas se mostraram mais invasivas ou mais persistentes que as parentais convencionais. Não era esperado que tais características adicionais dos Eventos fossem incrementar

o desempenho das plantas naqueles *habitats*. Por outro lado, estes resultados não descartam a hipótese de que outras modificações genéticas possam alterar a capacidade de invasividade de um VGM, mas também não indicaram que estas plantas possam sobreviver por longos períodos fora das condições de cultivo da cultura.

LEMAUX, (2009) numa extensa revisão onde ele analisou as publicações científicas que tratam de análise de risco do uso de produtos geneticamente modificados, conclui que embora nenhuma atividade humana possa garantir 100% de segurança, as cultivares geneticamente modificadas e seus produtos disponíveis atualmente para a comercialização são tão seguros quanto àqueles oriundos de métodos convencionais.

VI. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

Pareceres técnicos referentes ao desempenho agrônômico concluíram que há equivalência entre plantas transgênicas e convencionais. Assim, as informações indicam que as plantas transgênicas não diferem fundamentalmente dos genótipos de algodão não transformado, à exceção da tolerância ao herbicida glifosato. Adicionalmente, não há evidência de reações adversas ao uso do Algodão Glytol® evento GHB614. Por essas razões, não existem restrições ao uso deste algodão ou de seus derivados seja para alimentação humana ou de animais.

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, "*ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação*".

VII. Considerações sobre particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização):

Não existem variedades crioulas de algodoeiros e as cadeias de algodoeiros especiais, convencionais e transgênicos têm convivido de modo satisfatório, sem que tenham sido divulgados relatos de problemas de coexistência.

As zonas de restrição ao plantio de algodão GM, deste evento e de outras transformações, devem ser rigorosamente observadas pelos órgãos de fiscalização, tanto no comércio de sementes em tais áreas, quanto na orientação técnica e monitoramento da empresa requerente. São áreas ao sul do Rio Grande do Norte e no nordeste baiano, em toda região Amazônica, no Pantanal, no sudeste do Piauí e no oeste de Pernambuco, e na Mata Atlântica, compreendendo os estados RN, PB, AL, SE, BA, MG e ES.

VIII. Conclusão

Considerando que:

1. O Algodão evento GHB614 é tão seguro para o consumo humano e animal quanto o seu equivalente convencional.
2. A proteína 2mEPSPS não tem homologia com nenhum composto tóxico ou alergênico e não apresenta sítios de glicosilação adicionais aos já existentes na EPSPS de milho.
3. A proteína 2mEPSPS é rapidamente degradada na presença de enzimas do sistema digestivo.
4. Nenhum efeito adverso foi observado nos estudos de toxicologia aguda ou de alimentação animal contendo a proteína 2mEPSPS.
5. As plantas derivadas do Evento GHB614 apresentam a mesma capacidade de sobrevivência e adaptabilidade ao ambiente que o algodão convencional.
6. As características agrônômicas do algodão Glytol só são diferenciadas pela seletividade ao glifosato, em relação às variedades convencionais.
7. O uso de algodão e seus derivados produzidos a partir do algodão GlyTol® (Evento GHB614) implica na mesma segurança para a saúde humana/animal e meio ambiente que as linhagens comerciais convencionais, ou mesmo, variedades geneticamente modificadas já aprovadas e disponibilizadas no mercado contendo seletividade ao glifosato.
8. O uso de sementes ou subprodutos derivados do Evento GHB614, atendendo as mesmas recomendações e critérios de segurança já usuais para as variedades de algodão comercial, não representa maior exposição a qualquer situação de risco.

A CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas ao disposto na Portaria 21/05 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que o Algodão GHB614 (Glytol®) é substancialmente equivalente ao algodão convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, A CTNBio concluiu que o Algodão GHB614 (Glytol®) não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao algodão convencional.

Com relação ao plano de monitoramento pós-liberação comercial a CTNBio determina que sejam seguidas as instruções e executadas as ações técnicas de monitoramento abaixo relacionadas:

- a) O monitoramento deve ser realizado em lavouras comerciais e não em experimentais. As áreas escolhidas para serem monitoradas não devem ser isoladas das demais, possuir bordaduras ou qualquer situação que seja fora do padrão comercial.
- b) O monitoramento deve ser realizado em modelo comparativo entre o sistema convencional de cultivo e o sistema de cultivo do OGM, sendo a coleta de dados realizada por amostragem.
- c) O monitoramento deverá ser conduzido em biomas representativos das principais áreas de cultura do OGM e, sempre que possível, contemplar os diferentes tipos de produtores.
- d) O monitoramento deve ser realizado pelo período mínimo de 5 anos.
- e) Para todos os monitoramentos, a proponente deve detalhar as informações sobre todas as atividades realizadas no pré-plantio e plantio, sobre sua execução, com relato das atividades conduzidas nas áreas de monitoramento durante o ciclo da cultura, sobre as atividades de colheita e das condições climáticas.
- f) Deverá haver também acompanhamento de eventuais agravos à saúde humana e animal por meio dos sistemas oficiais de notificação de efeitos adversos, como por exemplo, o SINEPS (Sistema de Notificação de Eventos Adversos relacionados a Produtos de Saúde) regulamentado pela ANVISA.
- g) Os métodos analíticos, resultados obtidos e suas interpretações devem ser desenvolvidos em conformidade com princípios de independência e transparência, ressalvados aspectos de sigilo comercial previamente justificados e definidos como tal.
- h) Com base em justificativas técnicas e científicas a CTNBio reserva-se o direito de rever este Parecer a qualquer momento.

Ações técnicas de monitoramento a serem executadas:

- a) Estado nutricional e sanidade das plantas OGM.
- b) Atributos químicos e físicos do solo relacionados à fertilidade e outras características pedológicas básicas.
- c) Diversidade microbiana do solo.
- d) Banco de diásporos do solo.

- e) Comunidade de plantas invasoras.
- f) Desenvolvimento de resistência ao herbicida em plantas invasoras.
- g) Resíduos do herbicida no solo, nos grãos e na parte aérea.
- h) Fluxo Gênico.

IX. Referências Bibliográficas

- ABOU-DONIA, M. B. 1989. Gossypol. In: P. R. Cheeke (ed.) Toxicants of Plant Origin. vol. 4:Phenolics. pp 1–22. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRUCKEN, H.C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate.II – Interference of glyphosate with chorismate formatin in vivo and in vitro. *Plant Physiol.*, v.66, p.830-834, 1980.
- ASTWOOD JD, FUCHS RL. Allergenicity of foods derived from transgenic plants. *Monogr Allergy.* 1996;32:105-20.
- BAKER, H.G. The evolution of weeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5, 1–23. 1974.
- BATISTA R, SAIBO N, LOURENÇO T, OLIVEIRA MM (2008) Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:3640-3645.
- BELL, A.A. 1986. Physiology of Secondary Products. Chapt. 38. Pages 597-621 in *Cotton Physiology*. J.R. Mauney and J. McD. Stewart, ed. The Cotton Foundation, Memphis, TN.
- BOULANGER J.; PINHEIRO D. 1972. Conseqüências genéticas da evolução da cultura algodoeira do Nordeste do Brasil. *Pesquisas Agropecuárias no Nordeste*, v.4, n.1, p.5-52.
- BUSSE, M. D. et al. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control and soil on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p. 1777-1789, 2001.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, Animal Feed Division. Decision Document DD2008-72 Determination of the Safety of Bayer CropScience's GlyTol™ Cotton Event GHB614.
- CERA Center for Environmental Risk Assessment - http://cera-gmc.org/index.php?evidcode=GHB614&hstIDXCode=&qType=&AbbrCode=&atCode=&stCode=&coIDCode=&action=gm_crop_database&mode=Submit. Consultado em 11/12/2010.
- CERNY, R.E. et al. Development and characterization of a cotton (*Gossypium hirsutum* L.) event with enhanced reproductive resistance to glyphosate. *Crop Sci.* v.50, p. 1375–1384, 2010.
- CHIAVEGATO, E. J. Avaliação agrônômica e de biossegurança do algodão Evento GHB614 – GlyTol. Relatório Técnico. Bayer Cropscience. 44p. 2009a.
- CHIAVEGATO, E. J. Avaliação da tecnologia e aspectos agrônômicos do algodão Evento GHB614. Relatório Técnico. Bayer Cropscience. 39p. 2009b.
- COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H. Complexos metálicos com herbicida glifosato: Revisão. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 6, 1038-1045, 2005.

- CRAVEN, L.A.; STEWART, J. MCD; BROWN, A.H.D.; GRACE, J.P. The Australian wild species of *Gossypium*. In: Proceedings of the world cotton research conference, 1. Brisbane, Australia. Challenging the future. P. 278-281. 1994.
- CRAWLEY, M.J.; BROWN, S.L.; HAILS, R.S.; KOHN, D.D.; REES, M. Transgenic crops in natural habitats. *Nature*, v.409, n.8, p.382-683, 2001.
- CURRIER, T. C. Pollen morphology, viability and survival rate of 2mEPSPS cotton event GHB614 and its non-transgenic counterpart Coker 312. Bayer CropScience. Internal Report. 27p. 2006. M-274210-01-1.
- EFSA European Food Safety Authority. EFSA Application: Part II Summary.
- EFSA European Food Safety Authority. Scientific Opinion: Application (Reference EFSA-GMO-NL-2008-51) for the placing on the market of glyphosate tolerant genetically modified cotton GHB614, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Bayer CropScience.
- FAWCETT, R., TOWERY, D. 2004. Conservation Tillage and Plant Biotechnology: How New Technologies Can Improve the Environment By Reducing the Need to Plow. Conservation Technology Information Center. 1220 Potter Drive, Suite 170, West Lafayette, IN 47906. www.ctic.purdue.edu. 24 pages. #M-291021-01-1.
- FEDOROFF N E BROWN NM (2004) Mendel in the kitchen – a scientist’s view of genetically modified foods – Joseph Henry Press – Washington, DC.
- FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND. Final Assessment Report Application A614: Food Derived from Glyphosate-Tolerant Cotton Line GHB614.
- FREIRE, E.C.. Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. Embrapa- CNPA. Documentos, 78. Campina Grande. 22p. 2000.
- FREIRE, E.C.; MOREIRA, J.A.N.; MIRANDA, A.R.; PERCIVAL, A.E. E STEWART, J.M. Identificação de novos sítios de ocorrência de *Gossypium mustelinum* no Brasil. *Pesquisa em Andamento*, 10, 7p. 1990.
- FRYXELL, P.A., CRAVEN, L.A. E STEWART, J.MCD. 1992. A revision of *Gossypium* Sect. *Grandicalyx* (Malvaceae) including the description of six new species. *Systematic Botany*, v.17, n.1, p.91-114.
- FRYXELL, P.A. 1979. The natural history of the cotton Tribe Malvaceae (Tribe Gossypieae). Texas A&M University Press, College Station.
- FUNKE T, YANG Y, HAN H, HEALY-FRIED M, OLESEN S, BECKER A, SCHONBRUNN E (2009) Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 Ile and Pro101 Ser in 5-Enolpyruvylshikimate -3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284:9854-9860.
- GRIDI- PAPP, I.L. Botânica e genética. In: Instituto Brasileiro de Potassa. Cultura e adubação do algodoeiro. São Paulo. P.117-160. 1965.
- GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A.; *Inhibitors of Tryptophan, Phenylalanine and Tyrosine Biosynthesis as Herbicides*, Dekker: New York, 1999.
- HAMMOND, B.G. et al. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *J.Nutr.*, v.126, n.3, p.717-727, 1996.
- HARRIGAN, G.G. et al. Natural variation in crop composition and the impact of transgenesis. *Nature Biotechnol.*, v. 28(5), 402-404, 2010.

- HARRISON, L.A. et al. The expressed protein in glyphosate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J.Nutr.*, v.126, n.3, p.728-740, 1996.
- HENIKOFF, S., HENIKOFF, J.G., 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915-10919.
- HEROUE-GUICHENEY, C.; ROUQUIE, D.; FREYSSINET, M.; CURRIER, T.; MARTONE, A.; ZHOU, J.; BATES, E.E.M.; FERULLO, J.M.; HENDRICKX, K. ROUAN, D. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Reg. Tox.Pharmacology*, v.54, p.143-153, 2009.
- HEROUE-GUICHENEY, C.; ROUQUIE, D.; FREYSSINET, M.; CURRIER, T.; MARTONE, A.; ZHOU, J.; BATES, E.E.M.; FERULLO, J.M.; HENDRICKX, K. ROUAN, D. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Reg. Tox.Pharmacology*, v.54, p.143-153, 2009.
- HERRMANN, K.M. the shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.*, v.107, p.7-12, 1995.
- HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Bio.* v.50, p.473-503, 1999.
- HORAK, M.J. et al. Characterization of Roundup Ready flex cotton, 'MON 88913', for use in ecological risk assessment: evaluation of seed germination, vegetative and reproductive growth, and ecological interactions. *Crop Sci.* v.47, p.268-277, 2007.
- ILSI. Allergenicity assessment for foods derive from genetically modified crops. Washington, DC, 2001, 17p. (HESI Codex comments, July 19, 2001).
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2008.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LEBRUN M., SAILLAND A., Freyssinet G. 1997. Mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene encoding for said protein and transformed plants containing said gene. International patent publication W0 97/04103-A2. 06.02.97. 25 pages
- LEE, J.A Cotton as a world crop. In: RHOEL, R.J.; LEWIS, C.F. (eds). *Cotton*. Madison: American Society of Agronomy p.1-16. 1984.
- LEMAUX, P.G. Genetically Engineered plants and foods: a scientist's analysis of the issues (part II). *Annu. Rev. Plant Biol.* V.60, p.511-559, 2009.
- LI, M. et al. Evaluation of cottonseed meal derived from genetically modified cotton as feed ingredients for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquacult. Nutr.*, v. 14, n. 6, 2008.
- MUNRO, J.M. 1987. *Cotton*. 2nd Ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- OBERDORFER, R. Nutritional Impact Assessment report on glyphosate tolerant cotton transformation Event GHB614. Bayer Cropscience. Internal Report, 97p. 2010. M-289161-04-1.

- OECD. 2002. Task Force for the Safety of Novel Foods and Feeds. Draft Consideration for the Safety Assessment of Animal Feedstuffs Derived from Genetically Modified Plants. ENV/JM/FOOD(2001)8/REV1. France.
- PENNA, J.C.V. Melhoramento de algodão. *Inc: Melhoramento de espécies cultivadas*. Borém, A (Ed.) Viçosa; Ed. UFV.p. 15-53.2005.969p.
- ROUQUIE, D. 2mEPSPS protein. Acute toxicity by intravenous injection in mice. Internal report, bayer CropScience, 51p. 2008.
- ROUQUIE, D. 2mEPSPS protein. Acute toxicity by oral gavage in mice. Internal Report. Bayer CropScience, 64p. 2006.
- SANKULA S. 2006. Quantification of the impacts on US agriculture of biotechnology-derived crops planted in 2005. National Center for Food and Agricultural Policy. Washington, DC 20036. 110 pages. www.ncfap.org. # M-291016-01-1.
- SILVEIRA, D. et al. Fibras são saudáveis. In: Anuário brasileiro do algodão 2009. Ed. Gazeta Santa Cruz, 2009, 128p.
- STEINRÜCKEN H.C., AMRHEIN N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 94(4): 1207-1212.
- THOMAS, K., AALBERS, M., BANNON, G.A., BARTELS, M., DEARMAN, R.J., ESDAILE, D.J., FU, T.J., GLATT, C.M., HADFIELD, N., HATZOS, C., HEFLE, S.L., HEYLINGS, J.R., GOODMAN, R.E., HENRY, B., HEROUET, C., HOLSAPPLE, M., LADICS, G.S., LANDRY, T.D., MACINTOSH, S.C., RICE, E.A., PRIVALLE, L.S., STEINER, H.Y., TESHIMA, R., THOMAS, K., VAN REE, R., WOOLHISER, M., ZAWODNY, J., 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. Regul. Toxicol. Pharmacol. 39, 87–98.
- USDA - U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Petition for Determination of Nonregulated Status for Glyphosate-Tolerant cotton: GlyTol™ cotton Event GHB614.
- USDA - U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service Federal Register Notification: Bayer CropScience; Determination of Nonregulated Status for Cotton Genetically Engineered for Glyphosate Herbicide Tolerance.
- U.S. E.P.A. (United States Environmental Protection Agency), 1998. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101), Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100, Acute Oral Toxicology, EPA 712-C-98-190, December 2002, 35 pages.
- Van DUYN, G. USDA Field termination reports for glyphosate tolerant cotton, 32p. 2007.
- WENDEL, J.F.; ROWLEY, R.; STEWART, J.M. Genetic diversity in and phylogenetic relationships of the brazilian endemic cotton, *Gossypium mustelinum* (malvaceae). Plant Systematics and Evolution, v.192, p.49-59, 1994.
- WILLIAMSON, M. Invaders, weeds and the risks from GMOs. *Experientia*, 49, 219–224. 1993
- ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. J.Environ. Qual., v.33, n. 3, p.825-831, 2004.
- ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. J.Environ. Qual., v.33, n.3, p.825-831, 2004.

ZHANG, J. et al. Transgene integration and organization in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. *Transgenic Research*, v. 17, n. 2, p. 293-306, 2008.

Edilson Paiva
Presidente da CTNBio

Assessora: Liana Vasconcelos Braga

Voto divergente:

Os membros da CTNBio Dr. José Maria Gusman Ferraz, Dr. Leonardo Melgarejo, Dr. Paulo Kageyama e Dr^a. Solange Teles, da Subcomissão Setorial Permanente da Área Ambiental, votaram contrariamente à liberação comercial do algodão geneticamente modificado tolerante ao glifosato GHB614 (Algodão GlyTol®). A Dr^a Graziela Almeida da Silva (Subcomissão Setorial Permanente da Área Humana) se absteve da votação.

O relator Dr. José Maria Gusman Ferraz emitiu parecer contrário à aprovação deste produto por considerar que:

- Quando avaliadas as diferenças de composição química e nutricional entre o alimento oriundo do vegetal geneticamente modificado e do vegetal não modificado, in natura ou após processamento e a existência de equivalência substancial entre o OGM e seu organismo parental, foram encontradas alterações.
- Das 22 tabelas apresentadas para estes estudos, em apenas 4 existem comparações com o material GM com aplicação do herbicida, nas demais são apresentadas apenas informações com a PGM e seu parental não modificado, sem aplicação do glifosato.
- O material utilizado para análise foi oriundo de sementes descaroçadas (grãos + linter) de plantas cultivadas em 17 localidades nos Estados Unidos, sabendo-se que dos genes apresentam forte influência do meio, estas análises, deveriam ser repetidas em nossas condições.
- São apresentadas avaliações das possíveis alterações relativas ao desempenho do animal, (frangos, *Gallus gallus domesticus*) alimentado com organismos geneticamente algodão convencional, e isolinha Coker 312 . O grupo alimentado com milho GM, segundo informações da própria requerente, foi estatisticamente diferente dos demais grupos.
- Foram efetuados também estudos com camundongos durante 15 dias, um tempo pequeno para verificar alterações não agudas. Segundo dados da requisitante nenhuma observação ou anormalidade foi verificada durante as análises macroscópicas realizadas, mesmo nos tratamentos contendo altas doses (10mg/kg) da substância teste. Não foram efetuados estudos de longo prazo e tampouco de várias gerações, nos dois estudos.
- Existem aproximadamente 20 estudos publicados na literatura científica sobre o tema, cujos resultados apontam na direção de possibilidade de riscos para a saúde.
- A necessidade de estudos de longo prazo (2 anos) com animais é reconhecida na comunidade científica como necessária para avaliar riscos para a saúde, já que cânceres, doenças imunes

e nervosas, e até perturbações reprodutivas, só são detectadas após um ou dois anos (Clarke et al, 2008; EFSA GMO Panel, 2008).

- A necessidade de trabalhos cooperativos com o Brasil para determinar a extensão desta distribuição (*G. mustelinum* uma espécie "reliquia"), a sua vulnerabilidade e como conservar esta diversidade genética ex situ.
- Que a adoção de cultivares transgênicos inadvertidamente ocupam a maior parte do território americano produtor de algodão com baixa diversidade, levando a um potencial risco devido a vulnerabilidade genética.
- Aproximadamente de 80% das plantas transgênicas hoje liberadas comercialmente são tolerantes a um herbicida, neste caso ao glifosato, tolerância esta dada pela capacidade do novo organismo em acumular o herbicida sem morrer. Assim, a tolerância conferida na planta pela modificação genética permite a aplicação de herbicida total em datas próximas da colheita (Duke *et al.*, 2003), resultando num acúmulo de agrotóxico que dificilmente ocorreria em plantas convencionais no momento do consumo.
- A modificação da LMR de glifosato na soja RR (de 0,2 mg/kg a 10 mg/kg, ou seja, um aumento de 50 vezes) chegando a ser constatado no Paraná até 57 ppm de resíduo na safra de 2009, e a consulta pública da Anvisa para aumentar a LMR de glifosato no milho RR ilustram claramente a especificidade de risco por acúmulo de herbicida no novo organismo e conseqüente riscos à saúde da população. São raros os estudos efetuados de cronicidade utilizando alimentos transgênicos, com prazo superior a 3 meses, e este trabalho não acrescenta dados neste sentido.
- A ocorrência cada vez maior de plantas tolerantes ao glifosato é um dos fatores de aumento da aplicação do produto por área, o que reforça ainda mais o fenômeno, com conseqüente aumento do impacto ambiental nos vários compartimentos, solo, água, ar, assim como nos alimentos e no trabalhador.
- Não foi apresentado um plano de monitoramento pós-liberação comercial.