
PARECER TÉCNICO Nº 3045/2011

Processo: 01200.000614/2011-69

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Avenida das Nações Unidas, 12901 - Torre Norte - 9º andar, 04578-910, São Paulo-SP.

Extrato Prévio: 2724/2011

Reunião: 145ª Reunião Ordinária, ocorrida em 15 de setembro de 2011

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de milho geneticamente modificado MON 89034 × MON 88017, resistente a insetos e tolerante ao herbicida glifosato, bem como todas as progênes dele provenientes, concluiu pelo DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico.

A Monsanto do Brasil Ltda, detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB 003/96, solicitou à CTNBio parecer sobre a biossegurança do milho MON 89034 × MON 88017 para efeito de liberação no meio ambiente, uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a esse milho e progênes dele derivadas. O milho MON 89034 × MON 88017, geneticamente modificado para resistência ao ataque de insetos-praga e tolerância ao herbicida glifosato, é resultante do cruzamento entre o milho MON 89034 e o milho MON 88017 por técnicas de melhoramento genético clássico. O evento MON 89034 produz as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 derivadas de *B.thuringiensis*, as quais são ativas contra lepidópteros-praga importantes nessa cultura. O evento MON 88017, assim como o milho MON 89034 × MON 88017, produz a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 (CP4 EPSPS), a qual confere tolerância ao glifosato, e a proteína Cry3Bb1 modificada de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kumamotoensis* que controla seletivamente coleópteros-alvo, como as larvas de coleópteros do gênero *Diabrotica*. Os eventos MON 89034 e MON 88017 já foram aprovados para liberação comercial pela CTNBio, pareceres técnicos (EPT 2.052/2009) em outubro/2009 e (EPT 2.764/2010) em dezembro/2010, respectivamente. A combinação dos dois eventos tem por objetivo propiciar aos agricultores no Brasil, a possibilidade de reduzir as perdas de rendimento pela pressão de plantas daninhas e pela ocorrência de pragas de raiz do gênero *Diabrotica* e de lepidópteros-praga. Análises moleculares comparativas entre o evento piramidado, os eventos individuais (MON 89034 e MON 88017) e o milho convencional, demonstraram que a estrutura molecular foi preservada durante o processo de melhoramento genético clássico. Estudos demonstraram não haver interação entre as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry3Bb1, sendo seu efeito considerado aditivo no controle de praga, ou seja, que os eventos são independentes na sua contribuição para o controle de insetos. Já, o modo e o local de atividade biológica da proteína CP4 EPSPS são diferentes. Enquanto as proteínas Cry atuam no citoplasma, a proteína CP4 EPSPS é direcionada para o cloroplasto. Não há mecanismo conhecido ou possível de interação entre essas proteínas que pudesse levar a um efeito adverso à saúde animal e humana. Também não foram detectadas alterações na expressão dessas proteínas quando comparadas com os eventos individuais. Dessa forma, para comprovar que o evento piramidado MON 89034 × MON 88017 é equivalente e tão seguro quanto o milho convencional, a requerente apresentou dados da literatura, resultados dos experimentos anteriores com os eventos isolados e resultados de ensaios conduzidos sob contenção e no meio ambiente, seguindo metodologias científicas, com o objetivo de demonstrar a ausência de interação entre os genes introduzidos no milho piramidado. Dados de campo gerados no Brasil permitem concluir que o milho MON 89034 × MON 88017, à exceção das características

determinadas pela modificação genética, não difere do milho controle e, portanto, não apresenta riscos ambientais, maior potencial como planta daninha ou aumento de fluxo gênico para o milho convencional. Foi realizado no Brasil, experimento de campo sobre interações ecológicas do milho MON 89034 × MON 88017 em comparação ao milho controle convencional, bem como outras doze referências comerciais. A análise dos dados médios sobre danos na folha, no cartucho, na espiga, no colmo e na raiz, assim como dados sobre podridão da espiga e do colmo demonstram que, quatro das seis comparações apresentaram diferenças significativas; os danos nas folhas, nas espigas, nos colmos e nas raízes foram significativamente menores no milho em questão. Além disso, avaliações sobre impactos do milho MON 89034 × MON 88017 em organismos não-alvo foram realizadas em quatro Estações Experimentais da Monsanto do Brasil. Os dados apresentados corroboram o histórico de uso seguro das culturas geneticamente modificadas contendo genes derivados de *Bacillus thuringiensis*. Tanto na análise individual por local, quanto na análise combinada da microbiota, não foram verificadas diferenças significativas entre os resultados do milho MON 89034 × MON 88017 e do controle. Assim, conclui-se que a expressão das quatro proteínas heterólogas no milho em questão, não tem potencial para afetar de maneira significativa a microbiota do solo. Em termos de segurança alimentar, o milho MON 89034 × MON 88017 se mostrou substancialmente semelhante ao milho convencional, assim como a outros híbridos comerciais. Os dados de composição centesimal não apontaram diferenças significativas entre a variedade geneticamente modificada e os controles ou as referências, sugerindo a equivalência nutricional entre elas. Os dados apresentados corroboram os resultados encontrados a partir de amostras coletadas no Brasil para os eventos individuais, que também são equivalentes em composição ao milho convencional. Um estudo de campo foi conduzido no Brasil, com o objetivo de gerar amostras para a avaliação dos níveis de expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS no milho MON 89034 × MON 88017, em folhas durante a safra, forragem, grãos e raízes em dois tempos de coleta, utilizando-se o método de quantificação ELISA. A análise conjunta dos dados obtidos no Brasil, Estados Unidos e União Européia indica que os níveis de expressão das quatro proteínas em questão são equivalentes, ou seja, a maioria dos intervalos (valores mínimos e valores máximos) se sobrepõem no milho MON 89034 × MON 88017 cultivado nos diferentes locais, bem como equivalentes aos detectados nos eventos individuais (milho MON 89034 e milho MON 88017). Em termos de alergenicidade e toxicidade, é relevante o fato de que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS são rapidamente digeridas em fluido gástrico simulado. Este fato faz com que seja improvável que as mesmas atuem como alérgenos alimentares. Através de análises de bioinformática, foi verificado também que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS não compartilham nenhuma similaridade significativa na sequência de aminoácidos com alérgenos conhecidos, gliadinas, gluteninas ou proteínas tóxicas, que podem causar efeitos adversos à saúde. Nos estudos de toxicidade oral aguda com camundongos foi demonstrado que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS não apresentam toxicidade aguda e não causam nenhum efeito adverso mesmo nas doses mais altas testadas. Diante do exposto conclui-se que o cultivo e o consumo de milho MON 89034 × MON 88017 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, ou de riscos à saúde humana e animal. Por esta razão, não há restrições ao uso deste milho ou de seus derivados. A CTNBio determina que o monitoramento pós-liberação comercial 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. 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. Deverá também ser conduzido em biomas representativos das principais áreas de cultura do OGM e, sempre que possível, contemplar os diferentes tipos de produtores. O monitoramento deve ser realizado pelo período mínimo de 5 anos. Nos relatórios apresentados deverão ser detalhadas 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. Deverá haver o 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. 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. Um total de 21 ações de monitoramento são propostas: - plantio, manejo e colheita da cultura do milho; - atributos físicos e químicos do solo; - estado nutricional do milho; - sanidade das plantas de milho; - comunidade de plantas daninhas e banco de diásporos no campo; - resistência ao herbicida glifosato; - fluxo gênico do milho MON 89034 X MON 88017 para o milho convencional; - resíduos de glifosato e AMPA em grãos de milho e no solo; - resíduo das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry3Bb1 na palhada e no solo; - diversidade microbiana associada ao solo; - invertebrados do solo e da superfície do solo; - inspeção visual de artrópodes não-alvo na parte aérea; - avaliação de artrópodes não-alvo na parte aérea por armadilhas; - monitoramento de proteínas Cry na água; - de insetos-alvo e dos agravos à saúde humana e animal; e - atividades agrícolas complementares.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Milho MON 89034 × MON 88017.

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

Espécie: *Zea mays* L.

Característica Inserida: Tolerância ao herbicida glifosato e resistência a insetos.

Método de introdução da característica: O milho MON 89034 × MON 88017, classificado como Classe de Risco I, foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento MON 89034 e o evento MON 88017.

Uso proposto: Liberação no meio ambiente, uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas ao milho MON 89034 x MON 88017 e progênes dele derivadas.

II. Informações Gerais

O milho *Zea mays* L. é uma espécie da família Gramineae, tribo Maydae, subfamília Panicoideae que está separada dentro do subgênero *Zea* e apresenta número cromossômico $2n = 20, 21, 22, 24$. A espécie silvestre mais próxima do milho é o teosinte o qual é encontrado no México e em algumas regiões da América Central, onde pode cruzar com o milho cultivado em campo de produção.

O milho possui uma história de mais de oito mil anos nas Américas, sendo cultivado desde o período pré-colombiano. É uma das plantas superiores mais bem caracterizadas cientificamente, sendo hoje a espécie cultivada que atingiu o mais elevado grau de domesticação e somente sobrevive na natureza quando cultivado pelo homem. Existem atualmente cerca de 300 raças de milho identificadas e, dentro de cada raça, milhares de cultivares.

Uma das mais importantes fontes de alimento no mundo, o milho é insumo para a produção de uma ampla gama de gêneros alimentícios, rações e produtos industriais. O

Brasil é um dos maiores produtores mundiais de milho, cujo cultivo é realizado praticamente em todo território nacional.

A ocorrência de insetos na Terra é maior nos trópicos em comparação às regiões temperadas onde os danos causados por esses animais são mais acentuados. Dentre as pragas mais importantes do milho destaca-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Cruz e colaboradores (1999) estimaram que no Brasil as perdas em função da infestação por *S. frugiperda* estavam em torno de 400 milhões de dólares por ano. Outras espécies da ordem Lepidoptera também são pragas importantes da cultura do milho, como a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e a lagarta do colmo (*Diatraea saccharalis*).

A principal medida de controle de insetos na cultura do milho tem sido o uso de inseticidas. Em algumas áreas do Centro-Oeste brasileiro, por exemplo, são necessárias dezenas de pulverizações com inseticidas em um único ciclo da cultura. Outra medida de controle de pragas seria o uso de cultivares resistentes.

O uso de cultivares contendo eventos combinados é crescente a nível mundial. Representa uma tendência que busca atender a demanda de produtores ao combinar duas características de importância agrônômica em um mesmo híbrido. Nesse sentido, diversos híbridos de milho contendo eventos combinados *via* melhoramento genético clássico estão aprovados em diversos países.

A combinação de dois eventos para o controle de pragas da mesma ordem entomológica tem por objetivo somar o espectro de ação das duas proteínas provenientes de *Bacillus thuringiensis*, bem como servir como mais uma ferramenta para o manejo de resistência das pragas às proteínas individuais.

III. Descrição do OGM e Proteínas Expressas

O milho MON 89034 × MON 88017 é resultante do cruzamento convencional entre o milho MON 89034 e o milho MON 88017 por técnicas de melhoramento genético clássico. O milho MON 89034 foi aprovado pela CTNBio em outubro/2009 (EPT 2.052/2009) e o milho MON 88017 foi aprovado em dezembro/2010 (EPT 2.764/2010).

No exterior, a combinação dos dois eventos individuais encontra-se aprovado nos Estados Unidos, na Argentina (2010), no Japão (2008), no México (2010), na Coreia do Sul (2009), nas Filipinas (2009) e em Taiwan (2009). Recebeu também aprovação da European Food Safety Authority (EFSA) para uso na União Européia em março de 2010.

O milho MON 89034 produz as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 derivadas de *B. thuringiensis*, as quais são ativas contra lepidópteros praga importantes nessa cultura. O milho MON 88017 produz a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 (CP4 EPSPS), distinta das demais EPSPS de plantas pois não é inibida pelo herbicida glifosato, conferindo deste modo, tolerância ao glifosato. Este evento produz ainda a proteína Cry3Bb1 modificada de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kumamotoensis* que controla seletivamente coleópteros alvo, como as larvas de coleópteros do gênero *Diabrotica*, que são pragas de solo na cultura do milho.

Portanto, o milho MON 89034 × MON 88017 produz as proteínas Cry1A.105 (Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1F) e Cry2Ab2, as quais são ativas no controle eficaz contra a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), na proteção significativa contra a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e no controle de espécies de *Ostrinia* (broca européia do milho e a broca asiática do milho) e *Diatraea saccharalis*, praga de cana e milho. Produz ainda a proteína CP4 EPSPS, que confere tolerância ao glifosato, e a proteína Cry3Bb1 que controla coleópteros.

No milho MON 89034 a estabilidade do DNA integrado foi demonstrada por análises moleculares com resultados reproduzidos em sete gerações. A análise molecular indicou que não existem elementos genéticos diferentes dos descritos no inserto contendo os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*. No caso do milho MON 88017, as análises de

segregação em 10 gerações confirmaram a herdabilidade e a estabilidade dos genes *cp4 epsps* e *cry3Bb1* nessas gerações.

O genoma do milho MON 89034 × MON 88017 contém dois insertos diferentes, um derivado do milho MON 89034 e outro derivado do milho MON 88017. O inserto de DNA único do genoma do milho MON 89034 é composto dos seguintes elementos: a) cassete do gene *cry1A.105* consistindo do promotor *e35S* e sequência líder (0,30 kb), a sequência líder *Cab* (0,06 kb), o íntron *Ract1* (0,48 kb), a sequência codificadora *cry1A.105* (3,53 kb) e a sequência finalizadora da transcrição *Hsp17 3'* (0,21 kb); b) cassete do gene *cry2Ab2* consistindo do promotor *FMV* (0,56 kb), o íntron *Hsp 70* (0,80 kb), a sequência codificadora *cry2Ab2* (1,91 kb), a sequência alvo *TS-SSU-CTP* (0,40 kb) e a sequência finalizadora da transcrição *nos* (0,25 kb). O inserto de DNA único do genoma do milho MON 88017 é composto dos seguintes elementos: a) cassete do gene *cp4 epsps* consistindo do promotor *Ract1* (0,93 Kb), o íntron *Ract1* (0,48* Kb), a sequência alvo *CTP 2* (0,23 Kb), a sequência codificadora *cp4 epsps* (1,37 Kb) e a sequência finalizadora da transcrição *nos* (0,25* Kb) que também direciona a poliadenilação; b) cassete do gene *cry3Bb1* consistindo do promotor *e35 S* (0,61 Kb), a sequência líder *Cab* (0,06* Kb), o íntron *Ract1* (0,48* Kb), a sequência codificadora *cry3Bb1* (1,96 Kb) e a sequência finalizadora da transcrição *Hsp17* (0,21* Kb) que também direciona a poliadenilação.

A caracterização molecular do milho MON 89034 × MON 88017 consistiu da confirmação da presença dos dois insertos no híbrido por análise de *Southern blot*. As análises moleculares demonstraram que os insertos correspondem àqueles dos respectivos eventos individuais e que, portanto, é altamente provável que as sequências inseridas nos eventos individuais MON 89034 e MON 88017 estejam conservadas em suas propriedades de herdabilidade também no produto combinado. Não há evidências científicas de que essas sequências seriam instáveis quando combinadas por melhoramento genético clássico.

A avaliação das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 expressas no milho MON 89034 e das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS expressas no milho MON 88017 foi apresentada à CTNBio quando do requerimento de liberação comercial de cada um destes produtos e incluiu: (a) a equivalência das proteínas produzidas em planta com as proteínas produzidas em *Escherichia coli* recombinante; (b) os níveis de expressão das proteínas determinados em tecidos de milho; e (c) um resumo da avaliação de segurança alimentar das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 Cry3Bb1 e CP4 EPSPS.

No Brasil, um estudo de campo foi conduzido com o objetivo de gerar amostras para a avaliação dos níveis de expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS no milho MON 89034 × MON 88017, em folhas durante a safra, forragem, grãos e raízes em dois tempos de coleta, utilizando-se o método de quantificação ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Os tecidos foram coletados na safra 2008/2009 em experimentos conduzidos em quatro locais: Cachoeira Dourada/MG; Não-Me-Toque/RS; Sorriso/MT; Rolândia/PR. Os níveis de expressão dessas quatro proteínas no milho MON 89034 × MON 88017 foram também analisados em amostras de milho coletadas em experimentos conduzidos em cinco locais nos Estados Unidos (2005) e em sete locais na União Européia (2007). A análise conjunta dos dados obtidos no Brasil, Estados Unidos e União Européia indica que os níveis de expressão das proteínas em questão são equivalentes, ou seja, a maioria dos intervalos (valores mínimos e valores máximos) se sobrepõem no milho MON 89034 × MON 88017 cultivado nos diferentes locais, bem como equivalentes aos detectados nos eventos individuais, ou seja o milho MON 89034 e o milho MON 88017.

A requerente apresenta dados da literatura, resultados dos experimentos anteriores com os eventos isolados e resultados de ensaios conduzidos sob contenção e no meio ambiente, com o objetivo de demonstrar a ausência de interação entre os genes introduzidos no milho piramidado.

A requerente apresenta os seguintes dados e análises do milho piramidado:

- i) Taxonomia do milho;
- ii) Caracterização molecular;
- iii) Análise da expressão das proteínas;
- iv) Herança, segregação genética e grau de estabilidade genotípica;
- v) Interação das proteínas heterólogas expressas;
- vi) Metodologia para identificação;
- vii) Potencial do milho piramidado como planta daninha em avaliações de campo realizadas no Brasil;
- viii) Avaliações agronômicas e fenotípicas em avaliações de campo realizadas no Brasil;
- ix) Avaliações bromatológicas;
- x) Avaliações alergenicidade;
- xi) Avaliações de toxicidade; e
- xii) Avaliações de biossegurança ambiental.

Foram realizados estudos para caracterizar o potencial de interação entre as proteínas Cry. Em um primeiro estudo, as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 purificadas, foram testadas sozinhas e em combinação, em bioensaios com incorporação das mesmas em dieta, contra duas espécies de lepidópteros sensíveis, a broca européia do milho (*Ostrinia nubilalis*) e a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*). Os dados foram consistentes com os de outro estudo realizado previamente, mostrando atividade inseticida aditiva e ausência de interação.

Um segundo estudo foi realizado para caracterizar o potencial de interação entre as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 ativas contra lepidópteros e a proteína Cry3Bb1 ativa contra coleópteros. A atividade combinada das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 testadas em bioensaios utilizando dieta artificial contra a broca européia do milho e a lagarta da espiga, não foi significativamente alterada pela presença da proteína Cry3Bb1. Da mesma forma, a atividade da proteína Cry3Bb1 testada em bioensaios utilizando dieta artificial contra o besouro da batata do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), não foi alterada pela presença das proteínas Cry1A.105 e/ou Cry2Ab2.

Com base nesses resultados, conclui-se que não há interação entre as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry3Bb1 que poderia resultar em alterações nas suas atividades funcionais.

A proteína CP4 EPSPS, por sua vez, pertence à família das 5 enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintases, que são enzimas envolvidas na via bioquímica do chiquimato. Esta via produz aminoácidos aromáticos nos cloroplastos das plantas e de microrganismos. Os modos e locais de atividade biológica são diferentes para proteínas Cry e CP4 EPSPS. As proteínas Cry atuam no citoplasma e a proteína CP4 EPSPS é direcionada para o cloroplasto. Não há mecanismo conhecido ou possível de interação entre essas proteínas que pudesse levar a um efeito adverso à saúde animal e humana.

IV. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

Em termos de segurança alimentar, o milho MON 89034 × MON 88017 se mostrou substancialmente semelhante ao milho convencional, assim como a outros híbridos comerciais. As amostras analisadas foram coletadas em experimentos conduzidos na safra 2008/2009, em quatro locais representativos das regiões de cultivo do milho no país. Para cada local, os níveis médios dos componentes centesimais (cinzas, gorduras, umidade, proteínas e carboidratos) determinados em forragem e grãos do milho MON 89034 × MON 88017 foram comparáveis aos valores médios do controle e ficaram ou dentro dos intervalos dos controles ou das referências, ou de ambos, além de ficarem dentro dos intervalos encontrados no banco de dados de composição do ILSI *Crop Composition Database*. Os dados apresentados corroboram os resultados encontrados a

partir de amostras coletadas no Brasil para os eventos individuais, que também são equivalentes em composição ao milho convencional.

Em termos de alergenicidade e toxicidade, salienta-se que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS são rapidamente digeridas em fluido gástrico simulado (SGF). Entre 95% e 99% das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 foram digeridas em menos de 30 segundos em SGF; enquanto mais de 99,8 e 95% das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS, respectivamente, foram digeridas em 15 minutos de incubação. O fato das quatro proteínas serem prontamente digeridas em fluido gástrico simulado faz com que seja improvável que as mesmas atuem como alérgenos alimentares, pois na prática, é garantia adicional de não absorção de proteína intacta, ausência de interferência sistêmica e também corrobora o baixo potencial alergênico destas proteínas. Além disso, estas proteínas representam uma fração pequena da proteína total do grão. A proteína CP4 EPSPS comparece no grão como 0,046% da proteína total; Cry1A.105 como 0,0047%; Cry2Ab2F como 0,0010% e Cry3Bb1 como 0,0119%. A análise segue o Codex e a literatura relevante.

Através de análises de bioinformática, foi verificado que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS não compartilham de nenhuma similaridade significativa de seqüência de aminoácidos com alérgenos conhecidos, gliadinas, gluteninas ou proteínas tóxicas, que podem causar efeitos adversos à saúde.

Foi demonstrado nos estudos de toxicidade oral aguda com camundongos que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS não apresentam toxicidade aguda e não causam nenhum efeito adverso mesmo nas doses mais altas testadas.

Há um grande volume de informações geradas nos últimos anos sobre a segurança dos organismos doadores dos genes *cry* e *cp4 epsps*, *Bacillus thuringiensis* e *Agrobacterium* sp cepa CP4, respectivamente.

As culturas geneticamente modificadas resistentes a insetos, que produzem proteínas Cry, e tolerantes ao glifosato, que produzem a proteína CP4 EPSPS, têm sido cultivadas de forma segura há mais de 15 anos em vários países, sem relato de alergia ou toxicidade. Estudo com pacientes japoneses com alergia a alimentos não detectou níveis significativos de IgE específica contra as proteínas CP4 EPSPS ou a proteína homóloga Cry9C no soro destes pacientes pelo método de ELISA.

Numa ampla revisão sobre a segurança alimentar das culturas geneticamente modificadas contendo genes derivados de *Bacillus thuringiensis*, Raybould & Quemada (2010) salientam que as mesmas, além de mais produtivas e mais rentáveis aos agricultores, estão associadas a melhorias no ambiente e saúde humana, resultante do reduzido uso de inseticidas sintéticos.

V. Aspectos Ambientais e Agronômicos

A requerente apresenta resultados de experimentos de campo no Brasil referentes à dormência e germinação de sementes; características agronômicas e fenotípicas; e interações ecológicas simbióticas do milho MON 89034 × MON 88017.

O vigor e a porcentagem de germinação dos grãos foram determinados em amostras coletadas das parcelas com milho MON 89034 × MON 88017, milho controle convencional e 12 referências comerciais cultivados na safra 2008/2009 em quatro Estações Experimentais da Monsanto do Brasil Ltda., localizadas em áreas representativas para a cultura do milho. Os dados demonstraram não haver diferenças significativas entre o milho MON 89034 × MON 88017, o milho controle e as referências quanto ao vigor e à germinação dos grãos recém colhidos.

Em experimentos de campo (safra 2008/2009), o milho MON 89034 × MON 88017 foi comparado ao milho controle e a 12 referências comerciais quanto às seguintes características: emergência (estande inicial); vigor; 50% de plantas com pendão exposto; 50% de plantas com pólen; altura da planta; altura da espiga; maturação

fisiológica; *staygreen*; estande final; rendimento de grãos; peso de 1000 grãos e peso hectolítrico. Os resultados da avaliação do estágio de crescimento mostraram que as plantas de milho MON 89034 × MON 88017 se desenvolveram de forma semelhante ao milho controle e às referências comerciais. Na análise conjunta, os dados médios do milho MON 89034 × MON 88017 foram comparados aos do milho controle e nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Foram avaliados os percentuais de plantas voluntárias por meio do replantio dos grãos produzidos nos experimentos conduzidos durante a safra 2008/2009 em quatro Estações Experimentais da Monsanto do Brasil Ltda. Amostras de grãos coletadas nesses locais foram semeadas e incorporadas ao solo por meio de gradagem leve, o que simulou o processo de incorporação de restos culturais utilizado em plantio convencional para limpeza da área após a colheita. A análise individual por local e a análise combinada por região demonstraram que o número de plantas voluntárias não diferiu significativamente nas comparações realizadas entre o milho MON 89034 × MON 88017 e o milho controle.

As observações fenotípicas e agronômicas realizadas permitiram concluir que o milho MON 89034 × MON 88017, à exceção das características determinadas pela modificação genética, não difere do milho controle e, portanto, não apresenta riscos ambientais, maior potencial como planta daninha ou aumento de fluxo gênico para o milho convencional ou espécies sexualmente compatíveis.

O experimento de campo realizado no Brasil na safra 2008/2009 gerou também informações sobre interações ecológicas do milho MON 89034 × MON 88017 em comparação ao milho controle convencional, bem como outras 12 referências comerciais.

Foram coletados dados sobre danos na folha, no cartucho, na espiga, no colmo e na raiz, assim como dados sobre podridão da espiga e do colmo. Os resultados mostraram que os danos foram significativamente menores no milho MON 89034 × MON 88017. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 expressas no milho MON 89034 conferem à planta a característica de resistência ao ataque de lepidópteros praga nas folhas (lagartas), espigas e colmos, enquanto que a proteína Cry3Bb1 confere resistência aos danos em raízes causados por larvas de coleópteros do gênero *Diabrotica* (crisomelídeos).

Não foram detectadas variações na abundância de organismos não-alvo da parte aérea e da superfície do solo no milho MON 89034 × MON 88017, quando comparado ao controle. Os resultados obtidos indicaram que a característica de resistência não interfere na visitação de organismos não-alvo no milho MON 89034 × MON 88017. Os dados apresentados confirmam também os inúmeros resultados obtidos até o presente momento, em mais de uma década, que demonstram que as culturas transgênicas resistentes a insetos não causam efeitos adversos para a diversidade de insetos não-alvo incluindo predadores, parasitóides e outros insetos não-alvo ecologicamente importantes.

No Brasil a avaliação da microbiota do solo - Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, fungos e actinomicetos – foi realizada em amostras de solo de um experimento com o milho MON 89034 × MON 88017, coletadas de quatro locais em áreas representativas para a cultura. Na análise individual por local, bem como na análise combinada, não foram verificadas diferenças significativas na comparação entre os resultados do milho MON 89034 × MON 88017 em relação ao controle. Assim, conclui-se que a expressão das quatro proteínas heterólogas no milho MON 89034 × MON 88017 não tem potencial para afetar de maneira significativa a microbiota do solo.

VI. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

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, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental”.

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

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”.

VIII. Conclusão

Considerando que a variedade de milho (*Zea mays*) MON 89034 × MON 88017 pertence à espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano e animal, e que os genes *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cp4 epsps* e *cry3Bb1* introduzidos nessa variedade codificam proteínas ubíquas na natureza, presentes em plantas, fungos e microrganismos que também apresentam longo histórico de uso seguro para seres humanos e animais;

Considerando que a construção deste genótipo ocorreu através de melhoramento genético clássico, e que resultou na herança de uma cópia estável e funcional dos genes *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cp4 epsps* e *cry3Bb1*, os quais proporcionaram resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato;

Considerando que a CTNBio avaliou os eventos isoladamente e emitiu parecer favorável à sua liberação comercial;

Considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas no que tange a eventos piramidados;

Considerando ainda que:

1. Por meio de análises de *Southern blot* foi atestada a manutenção da integridade das construções gênicas herdadas dos parentais MON 89034 e MON 88017 durante o processo de melhoramento genético clássico;
2. A expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS no milho MON 89034 × MON 88017 não é significativamente diferente da expressão observada nos eventos parentais separadamente;
3. Não foram identificados efeitos não esperados advindos de interações não previstas quando da combinação, por cruzamento convencional, dos eventos MON 89034 e MON 88017;
4. Não há indícios de que as proteínas expressas possam causar alergia ou intoxicação em humanos e animais;
5. Os níveis das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e CP4 EPSPS foram determinados em amostras de folhas, forragem, grãos e raízes cultivados em liberações planejadas realizadas em quatro regiões no Brasil e não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as concentrações médias das proteína em questão, em amostras de folhas, plantas, forragens, grãos e raízes derivados do milho MON 89034 × MON 88017.
6. O processo de cruzamento natural não alterou a integridade e estabilidade dos insertos no evento piramidado;
7. Em condições de campo os níveis de expressão das proteínas inseridas são similares aos eventos individuais;

8. Os dados de composição centesimal não apontaram diferenças significativas entre as variedades geneticamente modificadas e as convencionais, sugerindo a equivalência nutricional entre elas.

9. As características agronômicas e fenotípicas do evento piramidado são mantidas nas avaliações de campo, pode-se inferir sobre a inexistência de interações detectáveis entre os genes ou as proteínas expressas no evento combinado, bem como à expressão de qualquer outra característica diferente de resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato;

10. Com relação ao controle de insetos o evento combinado MON 89034 × MON 88017 não diferiu dos eventos isolados MON 89034 e MON 88017, mas foi distinto do controle convencional.

Diante destas considerações, o plenário da CTNBio concluiu que o milho MON 89034 × MON 88017 é tão seguro quanto seu equivalente convencional. Assim, no âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo Art. 14 da Lei nº 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 milho MON 89034 × MON 88017 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, a CTNBio concluiu que o milho MON 89034 × MON 88017 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional.

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 Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007.

A CTNBio analisou, para elaboração deste parecer, documentos fornecidos pela requerente e literatura científica independente.

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.

Ações técnicas de monitoramento a serem executadas:

- plantio, manejo e colheita da cultura do milho;
- atributos físicos e químicos do solo;
- estado nutricional do milho;
- sanidade das plantas de milho;
- comunidade de plantas daninhas e banco de diásporos no campo;
- resistência ao herbicida glifosato;
- fluxo gênico do milho MON 89034 X MON 88017 para o milho convencional;
- resíduos de glifosato e AMPA em grãos de milho e no solo;
- resíduo das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry3Bb1 na palhada e no solo;
- diversidade microbiana associada ao solo;
- invertebrados do solo e da superfície do solo;
- inspeção visual de artrópodes não-alvo na parte aérea;
- avaliação de artrópodes não-alvo na parte aérea por armadilhas;
- monitoramento de proteínas Cry na água;
- de insetos-alvo e dos agravos à saúde humana e animal;
- atividades agrícolas complementares.

Com base em justificativas técnicas e científicas a CTNBio reserva-se o direito de rever este Parecer a qualquer momento.

IX. Bibliografia

- Bahia Filho, A.F.C.; Garcia, J.C. 2000. Análise e avaliação do mercado brasileiro de sementes de milho. In: Udry, C.V.; Duarte, W.F. (Org.) Uma história brasileira do milho: o valor de recursos genéticos. Brasília: Paralelo 15, 167-172.
- 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.
- Betz, F.S., B.G. Hammond, and R.L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Reg. Toxicol. and Pharmacol. 32:156-173.
- Beyene, A., and K. Niemeyer. 2009. Assessment of Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Protein Levels in Corn Tissues collected from MON 88017 and MON 89034 x MON 88017 Produced in Brazilian Field Trials during 2008 - 2009. Relatório interno da Monsanto MSL 22366.
- CERA, 2011 Center for Environmental Risk Assessment. <http://cera-gmc.org> (Acesso em 08 de agosto de 2011).

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. 2007. Milho total (1ª e 2ª safra) Brasil - Série histórica de área plantada: safra 1976-77 a 2009-10. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_11_12_14_45_40_milhototalseriehist.xls.

Cruz, I., Figueiredo, M.L.C., Oliveira, A.C., Vasconcelos, C.A. 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. International Journal of Pest Management 45:293-296.

EFSA Journal 2010; 8(3):1564 (Disponível em: http://www.gmocompass.org/pdf/regulation/maize/MON89034xMON88017_mais_import_efsa-opinion.pdf).

EPA, 2008 http://www.epa.gov/opppbpd1/biopesticides/pips/pip_list.htm (Acesso em 08 de agosto de 2011).

Fedoroff N e Brown NM (2004) Mendel in the kitchen – a scientist's view of genetically modified foods – Joseph Henry Press – Washington, DC.

Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. FAO/WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of joint FAO/WHO consultation.

Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. FAO/WHO – 2000a. Grassland Index. *Zea mays* L. (Disponível em: <http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/agricult/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000342.htm>).

Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. FAO/WHO. 2001b. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology.

Greenplate, J.T., J.W. Mullins, S.R. Penn, A. Dahm, B.J. Reich, J.A. Osborn, P.R. Rahn, L. Ruschke, and Z.W. Shappley. 2003. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. J. Appl. Entomol. 127:340-347.

ILSI-CCD. 2006. International Life Science Institute Crop Composition Database. <http://www.cropcomposition.org/> Version 3.0.

MAGYP, 2010 http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/biotecnologia/55-OGM_COMERCIALES/index.php (Acesso em 08 de agosto de 2011).

McClintock, J.T., C.R. Schaffer, and R.D. Sjobald. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pest. Sci. 45:95-105.

Metcalfe, DD (2005) Genetically modified foods and allergenicity. Nat. Immunol. 6:857-860.

Naranjo, S.E., 2011 Impacts of Bt Transgenic Cotton on Integrated Pest Management. Journal of Agricultural and Food Chemistry | 3b2 | ver.9 | 21/2/011 | 23:54 | Msc: jf-2010-02939c |(disponível on line).

Pilcher, C.D., M.E. Rice, and J.J. Obrycki. 2005. Impact of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn and Crop Phenology on Five Nontarget Arthropods. Environ. Entomol. 34:1302-1316.

Raybould A & Quemada H. (2010) Bt crops and food security in developing countries: realized benefits, sustainable use and lowering barriers to adoption. Food Sec. 2:247-259.

- Takagi et al. (2006) Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44: 182–188.
- U.S. EPA. 1996. Harmonized OPPTS testing guidelines 712-C-96-280 February 1996 as defined in 40 CRF 152.20. U.S.Environmental Protection Agency.
- U.S. EPA. 1998. *Bacillus thuringiensis* (B.t.) plant-pesticides and resistance management EPA 738-F-98-001. United States Environmental Protection Agency.
- U.S. EPA. 2001a. Biopesticides registration action document, revised risks and benefits section, *Bacillus thuringiensis* plant-pesticides [Online] http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad.htm (verified December 1, 2005).
- U.S. EPA. 2001c. Regulation under the FIFRA for plant-incorporated protectants (formerly plant-pesticides). U.S.Environmental Protection Agency Federal Register 59: 37772-6054737817.
- Wolfenbarger LL, Naranjo SE, Lundgren JG, Bitzer RJ, Watrud LS (2008) Bt Crop Effects on Functional Guilds of Non-Target Arthropods: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 3(5): e2118. doi:10.1371/journal.pone.0002118.
- Wu F, Miller JD, Casman, EA (2004) The economic impact of Bt corn resulting from mycotoxin reduction. *Journal of Toxicology* 23:397-424.
- Xu et al. (2009) Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein. *Food Chemistry Toxicology*, 47, 1459-1465.

Brasília, 15 de setembro de 2011

Edilson Paiva
Presidente da CTNBio

Assessor Técnico: Marcelo Pazos

Votos divergentes:

Os membros da CTNBio Dr. José Maria Gusman Ferraz e Dr. Leonardo Melgarejo, da Subcomissão Setorial Permanente da Área Ambiental, votaram contrariamente à liberação comercial do milho geneticamente modificado MON 89034 × MON 88017 resistente ao ataque de insetos e tolerante ao herbicida glifosato.