

1. APRESENTAÇÃO DA SOLICITAÇÃO DE LIBERAÇÃO COMERCIAL DO MILHO MIR162

A Syngenta Seeds Ltda, por meio de sua Comissão Interna de Biosegurança- CIBio, encaminha para apreciação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, a petição para decisão técnica favorável à liberação comercial, incluindo cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte, do organismo geneticamente modificado milho MIR162 e seus derivados, que apresenta resistência a vários lepidópteros considerados pragas e que afetam negativamente a cultura do milho no Brasil, como a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e a broca do colmo do milho (*Diatraea saccharalis*).

A Syngenta Seeds desenvolveu, por meio de técnicas modernas da biologia molecular, o milho (*Zea mays* L.) transformado contendo o evento MIR162 (doravante descrito como milho MIR162) resistente ao ataque de certos lepidópteros considerados praga nesta cultura. O milho MIR162 contém o gene *vip3Aa20* que codifica a proteína Vip3Aa20 e o gene *manA* que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI). A proteína Vip3Aa20 é uma variante da proteína inseticida nativa Vip3Aa1 de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88. A proteína Vip3Aa20 tem propriedade inseticida contra vários lepidópteros-praga da cultura do milho. O gene *manA* foi obtido a partir de *Escherichia coli* cepa K-12 e a expressão da proteína PMI foi utilizada como marcador de seleção ao longo do processo de desenvolvimento do milho MIR162.

O milho MIR162 foi produzido por transformação de embriões imaturos de milho, via *Agrobacterium tumefaciens*, e com a utilização do plasmídeo pNOV1300 como vetor para transformação. A região entre as bordas esquerda e direita do plasmídeo incluía os cassetes de expressão dos genes *vip3Aa20* e *manA*; sendo este T-DNA então transferido ao genoma do milho pelo processo de transformação especificado. O cassete de expressão de *vip3Aa1* continha a região codificadora de Vip3Aa19, regulada pelo promotor polyubiquitin (ZmUbiInt) do milho e seqüências de poliadenilação 35S do vírus do mosaico da couve-flor. O cassete de expressão *manA* continha a região codificadora *manA*

18 1

regulada pelo promotor ZmUbiInt e a sequência de poliadenilação nopalina sintetase (NOS).

Por meio de análises de Southern Blot e sequenciamento nucleotídico, foi demonstrado que o milho MIR162 contém uma única cópia intacta do inserto do T-DNA no cromossomo cinco do genoma nuclear do milho. Além disso, as análises de Southern Blot demonstraram que este único inserto de T-DNA contém: (a) cópias únicas dos genes *vip3Aa20* e *manA*; (b) duas cópias do promotor ZmUbiInt; (c) uma cópia do terminador NOS; e (d) nenhuma sequência residual do plasmídeo de transformação pNOV1300. O sequenciamento nucleotídico do inserto de T-DNA no milho MIR162 indicou a ocorrência de duas alterações em códons da sequência codificadora de Vip3Aa19, sendo que uma das alterações foi uma modificação silenciosa e, em outro códon, a alteração resultou em uma substituição de aminoácido. Assim, a variante do gene *vip3Aa1* presente no milho MIR162 passou a ser denominada *vip3Aa20*. Adicionalmente, o sequenciamento nucleotídico indicou que o inserto de T-DNA do milho MIR162 não está alocado dentro de nenhuma sequência gênica conhecida de *Z. mays*. Além disso, nenhuma nova “open reading frame” – ORF foi criada de forma que se estendesse nas junções 5’ ou 3’ entre o T-DNA e sequências genômicas de *Z. mays*. As frequências de segregação de *vip3Aa20* e *manA* observadas ao longo de várias gerações do milho MIR162 indicam completa coerência com genes ligados em um único locus no genoma do milho, bem como uma herança estável dos genes inseridos. Também foi observado que nenhuma nova proteína, além de Vip3Aa20 e PMI, é produzida no milho MIR162.

Com base no seu modo de ação, propriedades físico-químicas e resultados de estudos de biossegurança, foi demonstrado que as proteínas presentes no milho MIR162 - Vip3Aa20 e PMI, não representam risco a espécies de mamíferos ou efeitos adversos em uma ampla gama de espécies não-alvo pertencentes ao ecossistema de lavouras de milho. Adicionalmente, vários estudos conduzidos com o milho MIR162 em laboratórios, casas-de-vegetação e em liberações planejadas no meio ambiente, incluindo estudos realizados no Brasil, confirmam que não há modificações adicionais em sua morfologia,



fenologia e outros parâmetros composicionais ou agronômicos, além da esperada expressão das proteínas Vip3Aa20 e PMI.

O milho MIR162 foi desenvolvido para proporcionar aos agricultores uma alternativa prática e eficaz para o controle de danos causados por lepidópteros-praga em todas as fases de desenvolvimento desta cultura, representando um método específico e direto de controle que é ambientalmente sustentável e apresenta benefícios ao ambiente, ao consumidor, e ao sistema de produção da cultura de uma maneira geral, por: (1) reduzir os riscos associados com vazamentos no ambiente ou má aplicação de defensivos químicos; (2) eliminar os efeitos indesejáveis às populações de insetos benéficos, os quais podem ser suscetíveis a estes inseticidas; (3) reduzir o consumo de combustíveis fósseis, (4) proporcionar redução dos custos de produção da cultura e melhoria na qualidade do produto e (5) conferir tranquilidade e facilidade ao produtor no manejo da cultura. Além disso, tendo em vista o modo de ação diferenciado da proteína Vip3Aa20, o milho MIR162 apresenta-se como uma nova opção e alternativa a outros tipos de milhos geneticamente modificados expressando proteínas Cry derivadas de *Bacillus thuringiensis*, esperando-se, dessa forma, uma vida útil estendida desta tecnologia, pela redução da pressão de seleção para resistência entre os insetos lepidópteros que são alvos do produto e considerados praga da cultura.

Desta forma, a Syngenta Seeds Ltda, por meio de sua Comissão Interna de Biosegurança-CIBio, encaminha para apreciação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança –CTNBio esta petição para decisão técnica favorável à liberação comercial, incluindo cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte, do organismo geneticamente modificado milho MIR162 e seus derivados, conforme Lei de Biossegurança 11.105/05.

Ademir Capelaro
Responsavel Legal
Syngenta Seeds Ltda


Lilian Saldanha
Presidente CIBio
Syngenta Seeds Ltda

2. DESCRIÇÃO DO OGM

Ed

2.1 Organismo receptor - Milho

2.1.1 Classificação Botânica e Características da Planta

O milho (*Zea mays* L. spp *mays*) pertence à família das gramíneas (Poaceae), subfamília Panicoideae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *mays*. É diplóide, com $2n = 20$ cromossomos, apresentando, portanto, dez pares de cromossomos. A taxa de autofecundação é, normalmente, inferior a 5%, caracterizando-se, assim, em uma espécie alógama, sendo a sua polinização predominantemente realizada pelo vento (Marcos Filho, 2005). A tribo Maydeae, caracteriza-se por monoecismo, isto é, as flores são unissexuadas, geralmente em inflorescências masculinas e femininas, separadas nas mesmas plantas. Nas demais gramíneas, as flores são hermafroditas. Botanicamente, o milho passou a ser *Zea mays* L. spp. *mays* e o teosinto (planta que deu origem ao milho), *Zea mays*, com suas subespécies: *Zea mays* L. spp. *mexicana*, *Z. mays parviglumis*, *Zea mays* spp. *luxurians*, *Zea mays* spp. *diploperennis*. Com exceção do *Zea mays* spp. *diploperennis*, todos os teosintos são anuais. Existe ainda outro teosinto perene, que é tetraplóide $2n = 4n = 40$ cromossomos: *Z. mays* spp. *perennis* (Paterniani et al., 2001). Entretanto no Brasil não são cultivados nenhuma das espécies de teosinto.

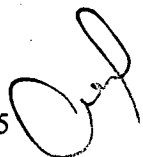
A planta de milho apresenta colmo cilíndrico, com nós e entrenós compactos. Dos nós, abaixo do solo surgem raízes e daqueles situados no nível do solo, ou logo acima, se originam as raízes adventícias, responsáveis principalmente pela fixação da planta no solo. O sistema radicular consta ainda de raízes primárias e secundárias, além das adventícias. As folhas dispõem-se de forma alternada no colmo. A bainha de cada folha envolve o entrenó imediatamente acima do nó de origem. O limbo foliar é longo, largo e plano, apresentando destacada nervura central. Há pêlos na superfície superior das folhas. A inflorescência masculina (pendão), tipo panícula, consiste num eixo central, do qual partem ramificações secundárias e terciárias. Ao longo das ramificações estão localizadas as espiguetas,

4

dispostas aos pares, uma séssil e outra pedunculada. A inflorescência feminina (espiga) corresponde a um colmo com nós e entrenós muito próximos. As palhas são as bainhas das folhas que se originam de cada nó, superpostas envolvendo firmemente a espiga. A semente é um fruto denominado cariopse (Viana *et al.*, 1999).

2.1.2 Origem, Domesticação e Dispersão

A origem do milho despertou o interesse de muitos pesquisadores, e esse interesse é justificado pelo fato do milho ser uma espécie altamente domesticada, pois só sobrevive quando cultivado pelo homem (Paterniani *et al.*, 2001). Basicamente três teorias foram discutidas: 1) a origem divergente, na qual o milho, o teosinto e o tripsacum são descendentes de um ancestral comum, hoje extinto (Weatherwax, 1954); 2) o milho é derivado diretamente do teosinto, que conta com apoio de vários autores, dentre os quais se destacam Galinat (1977) e Beadle (1977, 1978); e 3) O teosinto é originário do cruzamento entre milho e Tripsacum, tese defendida por Mangelsdorf (1964), mas posteriormente abandonada (Mangelsdorf, 1974). As evidências acumuladas indicam que o milho originou-se diretamente do teosinto. Ambos têm $n=10$ cromossomos homólogos, que se cruzam facilmente, o que resulta em produtos férteis; podem-se obter, nas gerações seguintes, tipos semelhantes ao milho e ao teosinto, com diferenças gênicas relativamente pequenas. Partindo dessa teoria, possivelmente, os antigos habitantes do México, onde o teosinto é nativo, devem ter utilizado suas sementes para alimentação. Uma pessoa podia facilmente coletar um quilo de semente/hora, as quais podiam ser moídas e transformadas em farinha, além do fato de que suas sementes secas, sob a ação do calor do fogo, podem pipocar de modo semelhante aos milhos-pipoca atuais (Beadle, 1978). Paterniani *et al.* (1977) salientaram que a grande diversidade genética encontrada na espécie *Zea mays* L., sem dúvida, pode ser considerada um exemplo de evolução, uma vez que a evolução corresponde a mudanças nas frequências gênicas ao longo das gerações. Os fatores que contribuem para essas mudanças são seleção, mutação, oscilação genética, migração e hibridação. Provavelmente, todos

5 

Ed 2

esses fatores desempenharam importância de grau maior ou menor no desenvolvimento das raças de milho. Entretanto, dentre esses fatores, dois são considerados de maior importância, a hibridação e a seleção. O milho hoje está disseminado em todo o mundo, e várias introduções no Brasil foram feitas a partir dos milhos americanos. Na Itália, onde o milho adquiriu especial importância, milhos de grãos duros de cor laranja foram inicialmente os preferidos. Atualmente, milhos semidentados e dentados, originados do Corn Belt, são os mais cultivados. Ainda hoje, diferentes tipos de endosperma e coloração têm importância regional. Nos Estados Unidos, predomina o milho dentado amarelo, pelo seu alto potencial produtivo; no México, porém, a preferência é pelo dentado-branco, usado na fabricação de “tortillas”; e na Venezuela, são preferidos os milhos duros ou semi-duros brancos, empregados na fabricação de “arepa”, um pequeno pão. A Argentina cultiva em maior área os milhos duros, de cor laranja intensa, destinado essencialmente à exportação. O Brasil tem explorado grandemente a heterose resultante de cruzamentos de milhos dentados x duros, obtendo-se um tipo semi-dentado amarelo, embora milhos dentados amarelos também tenham alcançado boa receptividade (Paterniani *et al.*, 2001).

2.1.3 Características da cultura

O milho é uma planta de ciclo vegetativo anual, com período de duração bastante variado, abrangendo desde cultivares extremamente precoces, cuja polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência, até mesmo aquelas cujo ciclo vital pode alcançar 300 dias. Contudo, em condições edafo-climáticas brasileiras, a cultura do milho apresenta ciclo variável entre 110 e 180 dias. Em função do ciclo, os híbridos são caracterizados em superprecoce, precoce e tardio quanto ao período compreendido entre a semeadura e a colheita do grão (Fancelli *et al.*, 2000).

De forma geral, o ciclo da cultura inclui às seguintes etapas de desenvolvimento (Fancelli *et al.*, 1996): i) germinação e emergência: período compreendido desde a semeadura até o efetivo aparecimento da plântula; ii) crescimento vegetativo: período compreendido entre a emissão da segunda

6

folha e o início do florescimento; iii) florescimento: período compreendido entre o início da polinização e o início da frutificação; iv) frutificação: período que se estende da fecundação até o enchimento completo dos grãos; v) maturidade: período compreendido entre o final da frutificação e o aparecimento da camada negra (maturidade fisiológica).

As escalas fenológicas utilizam características morfológicas que são facilmente identificadas para determinar o estágio de desenvolvimento em que se encontra a cultura, associando a morfologia com eventos fisiológicos que estejam ocorrendo num dado momento e que não podem ser visualizados a campo. Existem diversas escalas fenológicas para a cultura do milho. Dentre estas, Sangoi *et al.*, (2007) destaca a escala proposta por Ritchie *et al.* (1993) como uma das mais utilizadas atualmente no Brasil. Na escala de Ritchie *et al.* (1993), o primeiro estágio é denominado de VE (vegetativo – emergência), o qual é caracterizado pela emergência de cultura, e se estende até o estágio R6 (reprodutivo – 6) o qual é caracterizado pela maturidade fisiológica das sementes produzidas.

Por possuir mecanismo fotossintético do tipo C₄, a cultura do milho responde com altos rendimentos à crescente intensidade luminosa. Este mecanismo contribui para que a planta apresente alta eficiência na utilização de luz e gás carbônico, o que se reflete em alta produtividade biológica. O milho é o cereal que apresenta maior potencial de produção de biomassa. A partir de uma cariopse que pesa 0,2-0,3g, num período de 10 a 12 semanas se produz uma planta que alcança entre 2,0 e 3,0m de altura e é capaz de produzir entre 500 e 1000 grãos equivalentes ao que lhes originou. Considerando-se cada grão individualmente, há um aumento no volume do ovário para o grão maduro de aproximadamente 1.400 vezes da fertilidade até a maturação fisiológica (Sangoi *et al.*, 2007).

Inúmeras evidências experimentais demonstram que a temperatura se constitui no fator mais importante e decisivo para o desenvolvimento do milho, embora a água e demais componentes climáticos exerçam diretamente sua influência no processo (Duarte, 2000). Regiões cujo verão apresenta temperatura média diária inferior a 19°C e noites com temperatura média abaixo de 12,8°C, não são recomendadas para a cultura do milho. Temperatura do solo inferior a 10°C e superiores a 42°C prejudicam

Ed

sensivelmente a germinação, ao passo que aquelas situadas entre 25 e 30°C propiciam as melhores condições para o desenvolvimento dos processos de germinação e emergência das plântulas. A temperatura noturna é importante porque é principalmente à noite que ocorre o crescimento. Noites quentes e dias quentes aceleram o ciclo da cultura, diminuindo os rendimentos de grãos (Fancelli, 1990).

A necessidade de adequado suprimento hídrico para o pleno desenvolvimento dos vegetais decorre das múltiplas funções que a água desempenha na fisiologia da planta, uma vez que participa de praticamente todos os processos metabólicos. Para o milho, as maiores exigências em umidade se concentram nas fases de emergência, florescimento e formação de grãos (Duarte, 2000). Todavia, no período compreendido entre 15 dias antes e 15 dias após o aparecimento da inflorescência masculina, o estresse hídrico é crítico. A falta de água no florescimento pode causar a desidratação do grão de pólen, prejudicando o desenvolvimento e penetração do tubo polínico, além de alterar o sincronismo entre a inflorescência masculina e feminina (Fancelli, 1990; Magalhães *et al.*, 1993).

As necessidades nutricionais do milho, assim como de qualquer planta, são determinadas pelas quantidades totais de nutrientes absorvidos, que variam em função da produção obtida. Nas semanas iniciais de crescimento, a planta de milho quase não retira nutrientes do solo, sendo que as reservas contidas nas sementes são suficientes para atender as exigências da plântula. Com o decorrer do tempo, as plantas tornam-se cada vez mais dependentes dos nutrientes contidos no solo, os quais apresentam fases preferenciais de absorção, em virtude de suas funções específicas na fisiologia da planta. Assim, há uma tendência de ritmo semelhante de acúmulo de matéria seca, N, Ca e S, enquanto para o K a exigência cresce em ritmo mais acentuado e para o P o ritmo é mais lento que o acúmulo de matéria seca (MS). Nos grãos, excepcionalmente, o acúmulo de N e K continua crescente, mesmo depois da redução na acumulação de nutrientes na planta toda, demonstrando uma característica redistributiva destes nutrientes (Vitti *et al.*, 2003).

Apesar de todo aparato para produção de grãos e de sua relevância na economia do país, a produtividade média brasileira de milho é normalmente inferior a 4,0 ton ha⁻¹. Este valor é muito baixo, se comparado com os

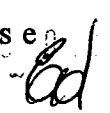
Org

rendimentos superiores a 10 ton ha⁻¹ que têm sido obtidos em condições experimentais, bem como por alguns produtores em nível de campo (Sangoi *et al.*, 2007). A divergência existente entre o rendimento médio obtido nas lavouras e o que é obtido sob condições de alta tecnologia pode ser atribuída a várias causas, dentre as quais, as perdas devido ao ataque de pragas. Deste modo, a utilização de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos constituem uma alternativa economicamente atraente pois, em decorrência da elevada eficácia desta tecnologia no controle de grande parte dessas pragas, os produtores conseguem reduzir custo de produção além de reduzir as perdas causadas por estes agentes e obter melhor qualidade no grão.

2.1.4 Aspectos econômicos da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas cultivadas comercialmente no mundo, sendo que anualmente são semeados cerca de 150 milhões de hectares, que contribuem para a produção de 700 milhões de toneladas de grãos (Fancelli *et al.*, 2000; Brandalizze, 2005). A espécie vem sendo utilizada por alguns séculos diretamente na alimentação humana e de animais domésticos, e sua importância não se restringe apenas ao fato do grande volume mundialmente produzido, mas também ao importante papel sócio-econômico que representa.

A cultura do milho fornece produtos largamente utilizados para o consumo humano, animal e como matéria-prima para a indústria, notadamente em função da quantidade e da natureza das reservas acumuladas nos grãos (Bastos, 1987; Cavalcanti, 1987; Fancelli *et al.*, 2000; Fancelli *et al.*, 2001). Sua importância econômica resulta da utilização na alimentação animal, principalmente suinocultura e avicultura de corte (60 a 80% do milho produzido no Brasil), tendo ainda significativa relevância social, visto se tratar da principal fonte de energia para boa parte da população do Nordeste brasileiro na região do semi-árido (Duarte, 2005). Constitui ainda uma inestimável fonte de matéria prima básica para expressiva série de produtos industrializados, movimentando grandes complexos industriais onde milhares de empregos são criados. Devido ao seu alto conteúdo de carboidratos,

principalmente amido, e de outros componentes tais como proteínas, óleos e vitaminas, torna-se um produto de relevante importância comercial. 

O milho tem sido cultivado em regiões compreendidas entre 58° de latitude norte e 40° de latitude sul, distribuídas nas mais diversas altitudes, encontrando-se áreas cultivadas desde localidades situadas abaixo do nível do mar a até 3600m de altitude (Camargo, 1966). Nos últimos dez anos, a área cultivada com milho no Brasil praticamente se manteve estável com pequena redução da ordem de 11%, chegando a aproximadamente 12.700.000 ha (27% da área total ocupada com lavouras agrícolas), sendo menor apenas que a área ocupada pela cultura da soja. A produtividade obteve um acréscimo de praticamente 40%, chegando a 3,4 t ha⁻¹, fazendo com que a produção, apesar do pequeno decréscimo na área semeada, aumentasse em 14%, atingindo o patamar de 42 milhões de toneladas de grãos (Companhia Nacional de Abastecimento, 2005). Entretanto, na safra agrícola 2005/06 e mais acentuado em 2006/07 houve um aumento na área plantada, atingindo ao redor de 13.900.000 de hectares nesta última. O aumento em área plantada está diretamente relacionado ao aumento da demanda por milho no principal país produtor e exportador (EUA), em função do uso dos grãos para produção de etanol, o qual fez com que o preço externo pago pelo cereal aumentasse, havendo reflexos nos preços em outros países, inclusive no Brasil. A demanda anual por etanol nos EUA para 2006 foi estimada em 22,150 bilhões de litros, mas a perspectiva do mercado é de que alcance 30 bilhões em quatro anos. O país produz atualmente 19,150 bilhões de litros de álcool à base de milho, mas terá de ampliar esse volume e para isso consumirá mais grão. De 2005 para 2006 a demanda por milho para produção de etanol nos EUA cresceu 50%, para 54 milhões de toneladas, conforme dados da Associação Nacional dos Produtores de Milho dos EUA.

O aumento do número de destilarias para produção de etanol nos Estados Unidos - decorrente do maior consumo do combustível - eleva a demanda por milho naquele país e deve abrir espaço para o Brasil ampliar as exportações do grão no médio a longo prazo, o que hoje depende principalmente de um câmbio favorável para ocorrer. Porém, como já comentado, a produtividade média brasileira de milho atual é normalmente inferior a 4,0 ton ha⁻¹. Este valor é muito baixo, se comparado com outros

países produtores como Argentina e EUA, nos quais os rendimentos médios são superiores a 6 ton ha⁻¹ e que já utilizam cultivares de milho geneticamente modificadas. A adoção de cultivares de milho geneticamente modificadas está diretamente relacionada a redução de custos de produção, redução de perdas de produção, aumento da produtividade e qualidade do grão produzido, e conseqüente aumento da competitividade dos países que as utilizam. Brandalizze (2005) comenta que a situação do mercado de milho sinaliza para uma grande crise de abastecimento a médio-longo prazo, tanto para o mercado interno como em âmbito internacional. Isto se deve ao fato de que a produção mundial não tem conseguido atender todo o consumo, o que contribuirá para a redução dos estoques e, possivelmente, para a alta dos preços.

Na Tabela 1 pode-se observar a produção, o consumo e as exportações de alguns países expressivos no mercado internacional. O primeiro fato a destacar refere-se aos países produtores e consumidores, os que são grandes produtores de milho também são grandes consumidores. Nesse caso, a perspectiva de crescimento econômico para os próximos anos, como no caso da China, por exemplo, promoverá o maior consumo de milho, menor área cultivada e menor disponibilidade de mão de obra rural para atender toda a demanda do país. Segundo Brandalizze (2005), a China apresenta potencial para, dentro de alguns anos, deixar o posto de exportador para se tornar importador de milho.

Nos EUA, o aumento do consumo nos últimos anos está diretamente relacionado ao aumento da demanda por milho em função do uso dos grãos para produção de etanol. A estimativa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para 2010 é de que o consumo de milho para produção de álcool será de 66 milhões de toneladas. Mas diante do avanço do último ano, reflexo da alta dos preços do petróleo no mercado internacional e da busca por combustíveis renováveis alternativos nos EUA, a previsão do USDA pode ser conservadora. Com o consumo maior do grão para fabricação de etanol, a demanda doméstica total estimada nos EUA para a safra 2007 é de 238,4 milhões de toneladas ante 231,7 milhões em 2006. O USDA estima que esse número pode chegar a 251 milhões de toneladas em quatro anos. Na hipótese de que a produção americana de milho fique na faixa das 270

milhões de toneladas e o consumo doméstico alcance 251 milhões, haverá menos grão disponível para exportação. O incremento de produção de etanol nos EUA utiliza milho que teria outra finalidade, como produção de açúcar de uso industrial e na fabricação de ração animal. Esse quadro pode ampliar as oportunidades para o Brasil exportar milho, já que os EUA devem ter dificuldade de atender a demanda de seus importadores do grão aliado a isto o Brasil também será favorecido devido ao fato da Argentina - outro grande exportador de milho - estar ampliando a produção de soja em detrimento do cereal. Além disso, a China também está reduzindo as vendas externas de grãos devido à maior demanda interna.

A produção brasileira de milho está concentrada na região Centro-Sul, sendo a região Sul a maior produtora, seguida pelas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Atualmente, o estado que mais produz milho no Brasil é o Paraná, com cerca de 13,9 milhões de toneladas de grãos na safra 2006/07. Bem atrás estão os Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina com produções inferiores a 7,0 milhões de toneladas, respectivamente, para a mesma safra (Tabela 2).

O Brasil é considerado um grande produtor de milho, porém, também apresenta elevado consumo. O consumo nacional é tão representativo que a ausência do cultivo de milho na condição de safrinha teria por consequência a necessidade de importações para o suprimento nacional. Brandalizzi (2005) apresenta dados que confirmam as perspectivas da economia brasileira para o incremento do consumo interno, estabilidade da produção e redução dos estoques (Tabela 3).

Tabela 1. Produção, consumo e exportação em milhões de toneladas dos países mais importantes no comércio internacional de milho.

País	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Part. %
Produção								
Estados Unidos	251,9	241,4	227,8	256,3	299,9	282,3	267,6	38,5
China	106,0	114,1	121,3	115,8	130,3	139,4	143,0	20,6
Argentina	15,4	14,7	15,5	15,0	20,5	15,8	22,0	3,2
Brasil	41,5	35,5	44,5	42,0	35,0	41,7	49,5	7,1
Subtotal	414,8	405,7	409,1	429,1	485,7	479,2	482,1	69,3
Outros	175,2	193,4	193,9	196,6	226,5	216,2	213,7	30,7
Total mundial	590,0	599,0	603,0	625,7	712,2	695,4	695,8	100
Consumo								
Estados Unidos	198,1	200,9	200,7	211,6	224,6	231,7	238,4	32,7
China	120,2	123,1	125,9	128,4	131,0	137,0	141,0	19,4
Argentina	5,6	4,2	4,1	4,4	5,2	6,2	7,0	1
Brasil	34,5	35,0	35,8	36,3	38,5	39,5	41,0	5,6
Subtotal	358,4	363,2	366,5	380,7	399,3	414,4	427,4	58,7
Outros	251,3	259,4	260,9	267,0	285,7	287,2	300,9	41,3
Total mundial	609,8	622,7	627,4	647,7	685,1	701,6	728,2	100
Exportação								
Estados Unidos	48,3	47,3	40,9	48,8	45,3	56,2	57,2	65,1
China	7,3	8,6	15,2	7,6	7,6	3,7	3,5	4
Argentina	12,2	8,6	12,3	10,4	14,6	10,0	14,5	16,5
Brasil	3,7	3,9	3,2	5,8	1,4	4,5	6,5	7,4
Subtotal	71,6	68,3	71,7	72,6	68,9	74,4	81,7	93
Outros	4,8	6,2	6,8	6,6	7,6	8,6	6,2	7
Total mundial	76,4	74,5	78,5	79,2	76,6	83,1	87,8	100

Fonte: USDA (2007)

Tabela 2. Produção de milho, em milhões de toneladas, obtida nos principais estados produtores brasileiros.

Estados	Safras						
Brasileiros	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07
Paraná	12,375	9,363	13,657	11,192	8,344	10,389	13,95
Minas Gerais	4,228	4,788	5,327	6,0	6,172	6,78	6,299
R.Grande do Sul	6,237	3,905	5,283	3,5	1,571	3,33	5,958
São Paulo	4,207	3,942	4,553	4,5	3,985	4,668	3,982
Santa Catarina	3,947	3,106	4,234	3,34	2,818	3,805	3,863

Fonte: IBGE, 2007.

Tabela 3. Milho: oferta e demanda do Brasil em milhões de toneladas.

Safra	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05*
OFERTA				
Estoques Iniciais	4,1	1,8	5,0	2,2
Produção	36,0	47,4	42,4	36,0
Importação	0,7	0,8	0,3	2,0
Oferta Total	40,8	49,9	47,7	40,2
DEMANDA				
Exportação	2,8	3,5	4,8	0,9
Avicultura	11,8	14,3	14,5	15,0
Suinocultura	6,1	7,0	7,2	7,3
Ind. Moageira	5,9	6,6	6,7	6,7
Consumo Rural	8,2	8,2	6,9	4,0
Outros	4,3	5,3	5,4	5,6
Demanda Total	39,1	34,9	45,5	39,5
ESTOQUE FINAL	1,8	5,0	2,2	0,7

Fonte: Brandalizzi (2005).

Assim sendo, com o aumento da demanda internacional por milho e com a possível redução da área cultivada e do estoque mundial deste cereal, têm-se uma perspectiva bastante otimista para o crescimento do setor no Brasil que, contudo, precisa ser fundamentado no aumento da produtividade a ser obtida. O aumento da produtividade exige que o produtor brasileiro seja mais competitivo, e por tanto ele necessita elevar o nível tecnológico de sua propriedade, o que corresponde ao melhor emprego de fertilizantes; escolha consciente do híbrido a ser utilizado; condução da cultura dentro da época

recomendada; uso eficiente de maquinário, adequado manejo de doenças, plantas daninhas e pragas, entre outras.

Nesse contexto, o uso de cultivares de milho geneticamente modificadas é uma tecnologia que contribui para o aumento da produção nacional de milho, por ser, como já relatado, uma tecnologia que reduz custos e perdas e agrega produtividade e qualidade, aumentando, consequentemente, a competitividade dos países que a utilizam. Considerando os benefícios apresentados, a área plantada anualmente das culturas geneticamente modificada (GM) no mundo superou os 100 milhões de hectares em 2006, sendo que o milho GM aumentou em 19% entre 2005 e 2006, chegando a 25,2 milhões de ha. O número de produtores com lavouras GM passou dos 10 milhões (10,3 milhões); e a área plantada acumulada de 1996 a 2006 ultrapassou meio bilhão de hectares, chegando a 577 milhões de hectares, com um aumento sem precedentes de sessenta vezes entre 1996 e 2006, evidenciando que a tecnologia agrícola mais rapidamente adotada pelos produtores nos últimos tempos foi o cultivo de plantas GM (James, 2006).

2.2 Organismo doador – *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis, uma bactéria de solo gram-positiva, que produz diversas proteínas com propriedades tóxicas a determinados tipos de insetos, conhecidas como proteínas Cry e Vip (de “*Vegetative Insecticidal Proteins*”) (Estruch *et al.*, 1996). Diferentemente das proteínas cristais (Cry) de *Bacillus thuringiensis*, as proteínas Vip são produzidas durante o crescimento vegetativo bacteriano e são secretadas como proteínas solúveis em meio extracelular. As culturas de *Bacillus thuringiensis* continuam produzindo proteína Vip durante a fase estacionária de crescimento e esporulação. Em comparação às β -exotoxinas não-proteináceas termoestáveis secretadas por cepas de *Bacillus thuringiensis*, as proteínas Vip são termolábeis (Lee *et al.*, 2003). Vip3A é a denominação utilizada para proteínas nativas descobertas na cepa AB88 de *Bacillus thuringiensis*.

Este organismo de solo produz Cry e Vip como um meio de obtenção de nutrientes a partir de insetos mortos pela ação destas toxinas. O mecanismo com que as proteínas Vip exercem sua atividade inseticida é

similar, porém não idêntica aos mecanismos descritos na literatura para as proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Após a ingestão, as proteínas Vip são proteolizadas em fragmentos ativos de aproximadamente 66kDa que se ligam a receptores do intestino médio de insetos suscetíveis. Ensaio de ligações competitivas demonstraram que as proteínas Vip e Cry ligam-se a receptores distintos (Lee *et al.*, 2003). Após a ligação aos receptores específicos, poros seletivos de íons são formados nas membranas epiteliais que levam a lise e morte celular dos insetos suscetíveis a esta toxina (Yu *et al.*, 1997). Cada uma dessas etapas tem influência na especificidade de uma dada proteína em relação a diferentes espécies de insetos.

2.3 Origem e função da proteína Vip3Aa20

A proteína nativa Vip3Aa1¹ originada de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88 contém 789 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 89 kDa. A variante Vip3Aa20 produzida pelo milho MIR162 apresenta também 789 aminoácidos, porém difere em dois aminoácidos quando comparada com a proteína nativa (nas posições 129 e 284). Uma variante desta proteína (Vip3Aa19) está presente em um produto da Syngenta, algodão COT102, aprovado nos Estados Unidos pelo USDA em 2005 para uso em alimentação humana e animal e na Austrália neste mesmo ano para alimentação humana. A variante Vip3Aa19 difere da proteína nativa em um aminoácido na posição 284, e da Vip3Aa20 em um aminoácido na posição 129. Vip3Aa19 e Vip3Aa20 são denominações aplicadas a duas variantes geneticamente modificadas a partir da proteína nativa, definidas pelo comitê de nomenclaturas de toxinas provenientes de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 2005). Estas diferenças estão apresentadas na tabela 4.

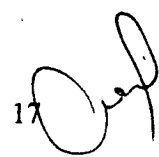
¹ Vip3Aa1 é o nome da toxina designado por Crickmore *et al.* (2005) (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) à proteína natural descoberta por Estruch *et al.* (1996). Vip3Aa19 e Vip3Aa20 são variantes da proteína natural desenvolvida pela Syngenta Biotechnology, Inc.

Tabela 4. Diferenças dos aminoácidos presentes nas posições 129 e 284 entre as proteínas Vip3Aa1, Vip3Aa19 e Vip3Aa20.

Proteína	Organismo de origem	Número de aminoácidos	Posição 129	Posição 284
Vip3Aa1	<i>B. thuringiensis</i> cepa AB88	789	Met	Lis
Vip3Aa19	Algodão COT102 e Milho ICP-4	789	Met	Gln
Vip3Aa20	Milho MIR162	789	Ile	Gln

Ensaio realizado pela Syngenta indicam que as diferenças de aminoácidos entre estas três variantes de Vip3A não tem impacto nas suas atividades inseticidas sobre insetos alvo. A diferença em um único aminoácido entre as variantes Vip3Aa19 e Vip3Aa20 (na posição 129) está fora do sítio tríptico da proteína. Lee *et al.* (2003) demonstraram que a proteína Vip3A é ativada proteoliticamente para formar um sítio ativo de 66kDa nos extratos do intestino médio dos insetos suscetíveis. O sequenciamento N-terminal deste sítio indica que a clivagem ocorre no aminoácido residual 199 (Estruch *et al.*, 2001), sugerindo que a diferença existente no aminoácido 129 não interfere na especificidade da toxina, já que o mesmo seria perdido durante a fase proteolítica no meio intestinal do inseto (figura 1).

Vários métodos analíticos foram utilizados na caracterização da proteína Vip produzida pelo milho MIR162. As substâncias-teste usadas em alguns estudos de biossegurança animal e ambiental consistiram em uma das proteínas Vip3A purificadas: Vip3Aa19, a variante empregada no algodão geneticamente modificado COT102 e milho ICP-4 (Pacha) ou Vip3Aa20, a variante encontrada no milho MIR162. Para alguns estudos, Vip3Aa19 e Vip3Aa20 foram produzidas em cultura de *E.coli* recombinante. Estas proteínas apresentam homologia de aminoácidos acima de 99.7% e sua equivalência bioquímica e funcional foi demonstrada por meio de estudos

17 

realizados pela empresa (anexo 1). Considerando que, para estudos de toxicologia ambiental e animal da proteína purificada, a produção e extração em grande escala de Vip3Aa20 proveniente do milho MIR162 eram inviáveis; esta proteína foi produzida e extraída de *E. coli*. Visando estabelecer a equivalência destes produtos obtidos a partir da planta e do microorganismo efetuou-se a caracterização e as análises bioquímicas que demonstraram que as proteínas Vip3Aa20 provenientes do milho MIR162 e de *E. coli* são bioquimicamente e funcionalmente idênticas. Dessa forma, para os estudos toxicológicos utilizou-se a proteína produzida pelo microorganismo.

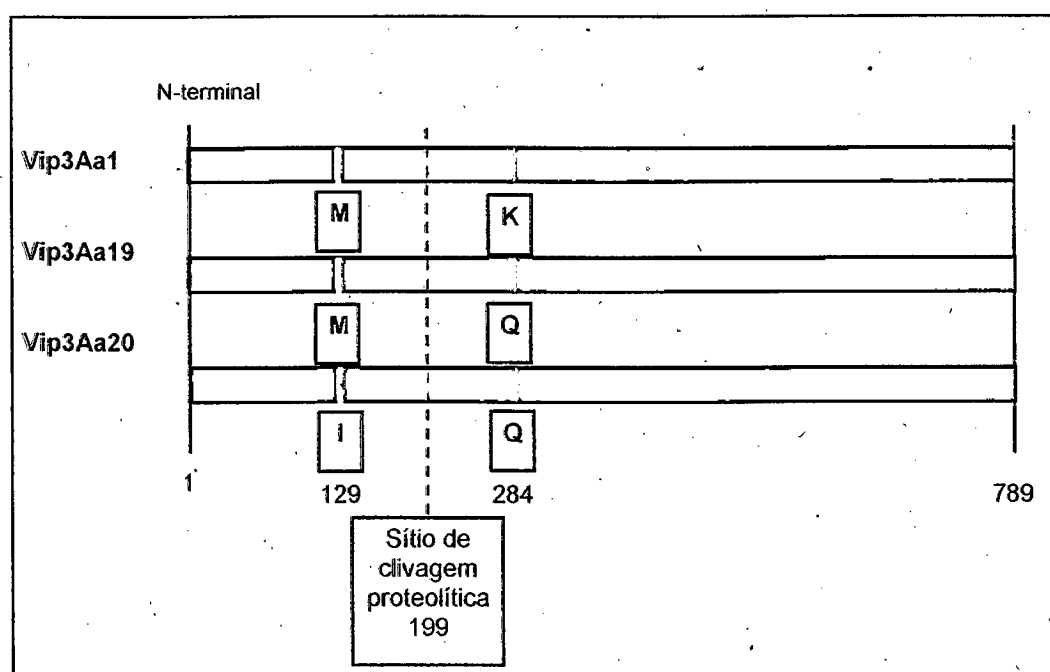


Figura 1. Representação esquemática dos aminoácidos das proteínas Vip3Aa1, Vip3Aa19 e Vip3Aa20 em relação ao sítio de clivagem proteolítica, conforme Lee *et al.*, 2003. (M; metionina, I: isoleucina, Q: glutamina)

Da mesma forma, as propriedades funcionais e bioquímicas da proteína variante Vip3Aa20 foram comparadas à variante Vip3Aa19 em outra bateria de experimentos, tendo em vista a necessidade do uso desta última em estudos de biossegurança ambiental. Estas proteínas diferem em apenas um aminoácido. Além do peso molecular semelhante, ambas apresentam perfis de mobilidade eletroforética e imunoreatividade similares. Adicionalmente,

nenhuma destas variantes é glicosilada, conforme resultados de estudos apresentados no anexo 1.

2.4 Origem e função da proteína Fosfomanose Isomerase (PMI)

O milho MIR162 expressa o gene *manA* (ou gene *pmi*) proveniente de *E. coli* cepa K-12 (Miles *et al.*, 1984). Este gene codifica a enzima PMI que catalisa uma conversão reversível de manose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, permitindo a diversos microorganismos o uso de manose como fonte de carbono e energia.

PMI tem sido utilizado como um marcador de seleção durante o processo de transformação de diversas espécies (Bojsen *et al.*, 1997; Joersbo *et al.*, 1998; Negrotto *et al.*, 2000). As células vegetais transformadas com o gene *manA* que codifica PMI sobrevivem e se desenvolvem em meio de cultura contendo manose como fonte primária e única de energia. Quando expostas a um meio contendo predominantemente ou exclusivamente manose, os tecidos não transformados se mantêm dormentes e são dominados pelo tecido transformado. A manose não é conhecida como tóxica às células vegetais. A inclusão do *manA* no T-DNA do plasmídeo pNOV1300 permitiu a seleção em meio de cultura de plântulas transformadas com o evento MIR162.

Análises de Western Blot foram utilizadas na caracterização da enzima PMI produzida pelo milho MIR162. Para a execução de estudos de toxicologia animal esta proteína foi produzida a partir de cultura de *E. coli*, já que a produção e extração em grande escala de PMI proveniente do milho MIR162 eram inviáveis. Assim, foram realizadas análises bioquímicas a fim de se estabelecer a equivalência entre a PMI proveniente de milho MIR162 e de *E. coli*.

A proteína PMI expressa no milho MIR162 apresenta um peso molecular de aproximadamente 42.8kDa, o que está de acordo com o peso molecular esperado com base na sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica de *manA* contido no T-DNA. O peso molecular observado para PMI proveniente de *E. coli* foi de aproximadamente 44.4kDa,

contendo 16 aminoácidos não funcionais na região N-terminal, adicionados com propósito de purificação (13 aminoácidos T7-Tag e três outros aminoácidos adicionais emergentes da região polylinker). Ambas as proteínas reagem com os mesmos anticorpos anti-PMI. A atividade específica foi medida para ambas fontes da enzima, as quais apresentaram-se dentro da amplitude historicamente observada em estudos realizados pela empresa.

Com base neste conjunto de resultados, pode-se concluir que a proteína PMI derivada do milho MIR162 e de *E. coli* são equivalentes do ponto de vista bioquímico e funcional.

2.5 Evento de transformação

O evento MIR162 foi produzido por meio de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* de embriões imaturos de milho. O método de transformação via *Agrobacterium* é eficiente para o desenvolvimento de transformantes contendo insertos simples e com um baixo número de cópias (Grimsley *et al.*, 1987; Ishida *et al.*, 1996). Este método permite a integração do DNA incluindo as bordas esquerda e direita do plasmídeo de transformação no genoma alvo, enquanto que os elementos genéticos além das bordas do plasmídeo não são inseridos.

O milho MIR162 foi obtido por meio de um sistema de vetor binário (Hoekema, 1983), sendo que plasmídeo pNOV1300 continha o gene *vip3Aa19* (Número de acesso DQ539887 (NCBI, 2006)) que codifica a proteína de controle de insetos Vip3Aa19 (figura 2). A proteína codificada pelo gene *vip3Aa19* no plasmídeo pNOV1300 difere da proteína Vip3Aa1 codificada pelo gene nativo *vip3Aa* de *Bt* cepa AB88 (Estruch *et al.*, 1996) por um único aminoácido na posição 284. O gene *vip3Aa19* codifica glutamina na posição 284 no lugar de lisina, codificada pelo gene nativo. Este cassete foi inserido em *A. tumefaciens* cepa LBA4404, organismo licenciado de Japan Tobacco Inc.

Posteriormente ao processo de incorporação do T-DNA no genoma do milho MIR162, foi verificada uma mudança decorrente do processo de transformação na sequência codificadora de *vip3Aa19*. Esse gene modificado

(número de acesso DQ539888 (NCBI, 2006)) foi denominado *vip3Aa20*, que codifica a proteína que difere de *Vip3Aa19* por um aminoácido (figura 3). O gene *vip3Aa20* codifica isoleucina na posição 129 no lugar da metionina codificada pelo gene *vip3Aa19* (tabela 4).

O milho MIR162 também contém o gene *manA*, proveniente de *Escherichia coli* e codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI). A PMI foi usada como um marcador para seleção durante o processo de regeneração de material vegetal após a transformação (Negrotto *et al.*, 2000). As células de milho que expressam *manA* podem utilizar manose como fonte primária de carbono, enquanto as células que não a expressam não irão proliferar em um meio de cultura contendo manose.

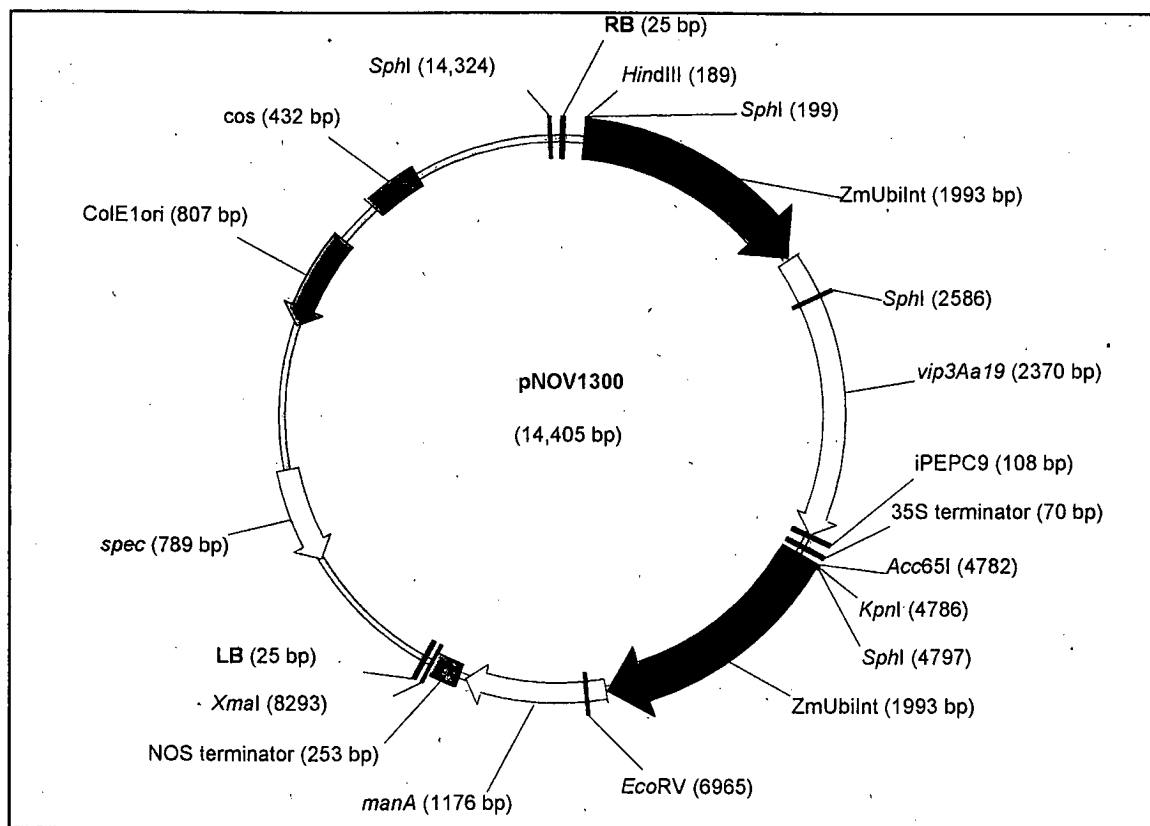


Figura 2. Mapa do plasmídeo-vetor pNOV1300.

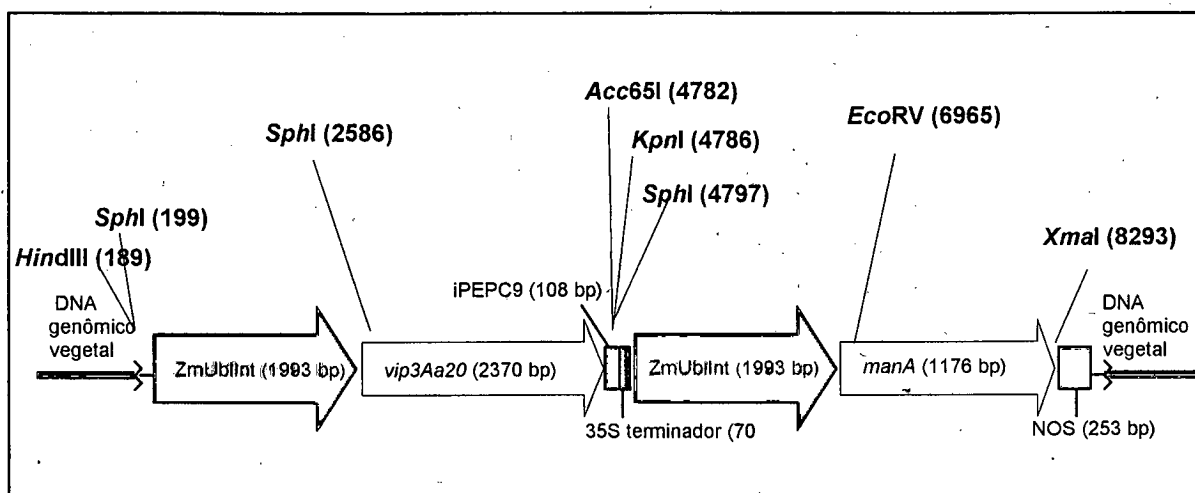


Figura 3. Representação esquemática do inserto evento MIR162, representando a orientação linear dos elementos genéticos e sítios de endonucleases de restrição.

2.6 Gene e sequências reguladoras do doador

Os dados da sequência consensual para o T-DNA inserido no milho MIR162 demonstraram que a inserção está intacta e que a contigüidade dos elementos funcionais dentro da inserção como no pNOV1300, foi mantida (anexo 2). Duas modificações foram observadas dentro da sequência codificadora do gene *vip3Aa* no milho MIR162: a primeira constituiu na substituição de metionina na posição 129 de *Vip3Aa19* por isoleucina. A segunda mudança de nucleotídeos dentro da sequência codificadora de *vip3Aa19* não resultou em mudança de aminoácidos, considerada assim uma modificação silenciosa. O gene *vip3Aa* no milho MIR162 recebeu a designação *vip3Aa20* (Número de Acesso no GenBank DQ539888 (NCBI, 2006)). As sequências de *manA*, os promotores ZmUbiInt, o terminador 35s, e o terminador NOS no milho MIR162 foram idênticas àquelas no plasmídeo de transformação pNOV1300. A análise da sequência revelou que algum truncamento ocorreu na borda direita (RB) e na borda esquerda (LB) do T-DNA durante o processo de transformação. Toda a RB, juntamente com dois pares de bases de sequência não codificadora, foi truncada, e toda a LB,

juntamente com 32 pares de bases de sequência não codificadora, foi truncada. Essas deleções não têm efeito na funcionalidade da inserção T-DNA, como já observado anteriormente na transformação com *A. tumefaciens* (Tinlând *et al.*, 1995).

Dados das análises Southern Blot (anexo 2) demonstram que (1) o milho MIR162 contém uma cópia única do gene *vip3Aa20* e do gene *manA*, (2) o milho MIR162 contém duas cópias do promotor poliubiquitina do milho (ZmUbiInt), correspondendo às duas cópias do promotor presentes no plasmídeo de transformação pNOV1300, além do promotor poliubiquitina endógeno do milho, (3) o milho MIR162 contém uma única cópia do terminador NOS, (4) o milho MIR162 não contém quaisquer das sequências backbone do plasmídeo de transformação pNOV1300, e (4) a inserção T-DNA do milho MIR162 é estável por várias gerações (anexo 2). A análise de sequência de toda a inserção T-DNA presente no milho MIR162 confirmou a integridade da inserção e que a contigüidade dos elementos funcionais foi mantida (anexo 2).

A inserção T-DNA do milho MIR162, ocorrida na região 5.03 do cromossomo cinco do milho, não interfere em nenhum gene endógeno de *Z. mays*. Há uma região de homologia entre a sequência genômica do milho que flanqueia a região 5' da inserção de T-DNA do milho MIR162 e sequências identificadas de elementos transponíveis de milho, mas a homologia fica a uma distância superior a 500pb da inserção. Há uma região de homologia entre a sequência genômica que flanqueia a região 3' da inserção de T-DNA do milho MIR162 e o gene da ciclofilina de *Z. mays*, mas a região fica fora da sequência codificadora da ciclofilina. Além disso, nenhuma nova ORF foi identificada que abrangesse ou a junção 5' ou 3' entre o T-DNA do milho MIR162 e a sequência genômica de *Z. mays*.

Os elementos genéticos e sequências reguladoras presentes no plasmídeo pNOV1300 utilizados no desenvolvimento do milho MIR162 estão detalhadas na tabela 5.

Tabela 5. Genes do doador e sequências reguladoras presentes no plasmídeo pNOV1300 utilizados no desenvolvimento do milho MIR162.

Elemento Genético	Local no pNOV1300 (pb)	Tamanho (pb)	Função
CASSETE DO INGREDIENTE ATIVO			
ZmUbiInt	200 - 2192	1993	Região promotora do gene da poliubiquitina de <i>Zea mays</i> que contém o primeiro intron (Entrez TM número de acesso S94464 (NCBI, 2006)). Fornece expressão constitutiva em monocotiledôneas (Christensen <i>et al.</i> , 1992).
<i>vip3Aa19</i>	2214 - 4583	2370	Uma versão modificada do gene natural <i>vip3Aa</i> (Estruch <i>et al.</i> , 1996) encontrado na bactéria <i>B. thuringiensis</i> cepa AB88. O gene <i>vip3Aa19</i> (Entrez TM Número de acesso DQ539887 (NCBI, 2006) foi modificado para acomodar o codon de uso preferencial em milho (Murray <i>et al.</i> , 1989). As proteínas Vip3Aa conferem resistência a vários lepidópteros-pragas.
iPEPC9	4600 - 4707	108	Intron #9 do gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (Entrez TM número de acesso X15239 (NCBI, 2006)) de <i>Zea mays</i> (Matsuoka <i>et al.</i> , 1989).
35S Terminador	4710 - 4779	70	Sequência terminadora do 35S RNA do genoma do vírus do mosaico da couve-flor (Similar a Entrez TM número de acesso AF140604 (NCBI, 2006)). Sua função é fornecer uma sequência de poliadenilação (Franck <i>et al.</i> , 1980).
CASSETE DO MARCADOR PARA SELEÇÃO			
ZmUbiInt	4798 - 6790	1993	Região promotora do gene da ubiquitina de <i>Zea mays</i> que contém o primeiro intron (Entrez TM Número de acesso S94464 (NCBI, 2006)). Fornece expressão constitutiva em monocotiledôneas (Christensen <i>et al.</i> , 1992).
<i>manA</i>	6803 - 7978	1176	Gene <i>manA</i> de <i>E. coli</i> que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI) (Entrez TM número de acesso M15380 (NCBI, 2006)); Este gene é também conhecido como pmi. Catalisa a isomerização da manose-6-fosfato em frutose-6-fosfato (Negrotto <i>et al.</i> , 2000).
NOS Terminador	8039 - 8291	253	Sequência terminadora do gene da nopalina sintase de <i>A. tumefaciens</i> (Entrez TM número de acesso V00087 (NCBI, 2006)). Sua função é fornecer um sítio de adenilação (Depicker <i>et al.</i> , 1982).

Tabela 5 (continuação). Genes do doador e sequências reguladoras presentes no plasmídeo pNOV1300 utilizados no desenvolvimento do milho MIR162.

Elemento Genético	Local no pNOV1300 (pb)	Tamanho (pb)	Função
COMPONENTES DO VETOR BACKBONE			
LB (borda esquerda)	8362 - 8386	25	Região da borda esquerda do T-DNA do plasmídeo nopalina Ti de <i>A. tumefaciens</i> (Entrez TM número de acesso J01825 (NCBI, 2006)). Repetição curta direta que flanqueia o T-DNA e é necessária para a transferência do T-DNA na célula da planta (Zambryski <i>et al.</i> , 1982).
<i>Spec</i>	9562-10350	789	Gene da espectinomycin adenililtransferase, aadA de <i>E. coli</i> Tn7 (Entrez TM número de acesso X03043 (NCBI, 2006)). Confere resistência à eritromicina, estreptomicina e espectinomycin; usada como um marcador bacteriano para seleção (Fling <i>et al.</i> , 1985).
ColE1ori	11549-12355	807	Origem da duplicação que permite a duplicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> . (Similar a Entrez TM número de acesso V00268 (NCBI, 2006)) (Itoh e Tomizawa, 1978).
Cos	12736-13167	432	A sequência que é cortada para produzir as extensões coesivas de fita única, localizadas no final das moléculas lineares de DNA de certos fagos, tais como lambda (Sanger <i>et al.</i> , 1982).
RB (borda direita)	1 - 25	25	Região da borda direita de T-DNA do plasmídeo nopalina Ti de <i>A. tumefaciens</i> (Entrez TM número de acesso J01826 (NCBI, 2006)). Repetição curta direta que flanqueia o T-DNA e é necessária para a transferência do T-DNA na célula da planta (Wang <i>et al.</i> , 1984).

2.7 Herança Mendeliana

A análise estatística dos padrões de segregação por várias gerações do milho MIR162 confirmou a proporção esperada da herança Mendeliana para ambos os genes *vip3Aa20* e *manA*. A análise qui-quadrado (χ^2) dos dados da herança Mendeliana de três gerações foi feita para testar a hipótese de que a inserção é herdada de uma maneira previsível. A análise qui-quadrado (χ^2) baseia-se na proporção da segregação observada e a proporção esperada de acordo com os princípios Mendelianos. Análises PCR TaqMan® foram

conduzidas em plantas de três gerações do milho MIR162 para determinar as proporções da herança do gene *vip3Aa20* e do gene *manA*. Por se tratarem de gerações de retrocruzamentos, para cada geração testada, a frequência esperada da proporção entre positivos e negativos era de 1:1, e a frequência observada se apresentou muito próxima, sendo estatisticamente não significativa. As frequências esperada e observada da segregação dos genes *vip3Aa20* e *manA* são apresentadas nas tabelas 6 e 7. O valor crítico para rejeitar a hipótese a 5% de probabilidade é de 3.84 (Strickberger, 1976). O valor do qui-quadrado foi inferior a 3.84 para cada geração testada. Ambos os genes *vip3Aa20* e *manA* são herdados de maneira previsível, de acordo com os princípios Mendelianos. Esses resultados são consistentes com os dados de caracterização molecular indicando a estabilidade da integração da inserção em um único sítio do genoma.

2.8 Estabilidade das gerações

A estabilidade das gerações da inserção T-DNA durante o processo de retrocruzamento do milho MIR162 foi determinada por análise de Southern Blot, usando as gerações BC1F₁, BC2F₁, e BC4F₁ (anexo 2). Para essa análise, o milho MIR162 e as amostras de DNA genômico do controle negativo foram digeridos com uma enzima de restrição que efetua uma única digestão na região T-DNA, mas não dentro do elemento funcional. Análises de Southern Blot foram efetuadas usando a sonda específica para *vip3Aa19* para avaliar a estabilidade da inserção. Os resultados desta análise são apresentados no anexo 2. Na análise de Southern Blot foi observado o padrão de hibridização esperado para o gene *vip3Aa20* por várias gerações do milho MIR162. A estabilidade da inserção no milho MIR162 durante o processo de melhoramento convencional por retrocruzamento, portanto, foi bem estabelecida nas múltiplas gerações testadas.

Tabela 6. Proporção de genótipo observado vs. esperado para *vip3Aa20* em múltiplas gerações de retrocruzamento do milho MIR162, determinado pela análise PCR TaqMan®.

Gene <i>vip3Aa20</i>	BC1F ₁		BC2F ₁		BC4F ₁	
	O*	E*	O*	E*	O*	E*
Positivo	21	20.5	45	48.5	148	143.5
Negativo	20	20.5	52	48.5	139	143.5
Total	41	41.0	97	97.0	287	287.0
Valor de χ^2	0.000		0.371		0.223	

* O = Valores observados e E = Valores esperados

χ^2 = soma $[(\text{Observado} - \text{esperado}) - 0.5]^2 / \text{esperado}$

Tabela 7. Proporção de genótipo observado vs. esperado para *manA* em múltiplas gerações de retrocruzamento do milho MIR162, determinado pela análise PCR TaqMan®.

Gene <i>manA</i>	BC1F ₁		BC2F ₁		BC4F ₁	
	O*	E*	O*	E*	O*	E*
Positivo	21	20.5	45	48.5	148	143.5
Negativo	20	20.5	52	48.5	139	143.5
Total	41	41.0	97	97.0	287	287.0
Valor de χ^2	0.000		0.371		0.223	

* O = Valores observados e E = Valores esperados

χ^2 = soma $[(\text{Observado} - \text{esperado}) - 0.5]^2 / \text{esperado}$

Ed 3

3. O MILHO MIR162

A linhagem de milho transformada para produção do evento MIR162 foi Hi-IIxA188, gerada a partir de cruzamentos convencionais de linhagens públicas de germoplasma de milho americano. Este genótipo é bastante usado por apresentar alta frequência de transformação e regeneração a partir de calos. O tecido transformado foi tratado com antibiótico para a eliminação de *A. tumefaciens* e posteriormente as plântulas regeneradas foram triadas por RT-PCR para a presença de *vip3Aa20*, *manA* e *spec*. As plântulas que continham apenas *vip3Aa20* e *manA* foram transferidas para uma casa-de-vegetação para desenvolvimento e multiplicação. A progênie das plantas transformadas foi testada a campo quanto a seu desempenho agrônômico e eficácia na resistência a insetos. Estes estudos foram conduzidos pela Syngenta nos Estados Unidos e seguiram as normas de biossegurança vigentes naquele país.

Vários métodos analíticos foram utilizados na caracterização da proteína Vip produzida pelo milho MIR162. As substâncias-teste utilizadas em alguns estudos de biossegurança animal e ambiental consistiram em uma das proteínas Vip3Aa purificadas: Vip3Aa19, a variante empregada no algodão geneticamente modificado COT102 e milho ICP-4 (Pacha) ou Vip3Aa20, a variante encontrada no milho MIR162. Para alguns estudos, Vip3Aa19 e Vip3Aa20 foram produzidas em cultura de *E.coli* recombinante. Estas proteínas apresentam homologia de aminoácidos acima de 99.7% e sua equivalência bioquímica e funcional foi demonstrada por meio de estudos realizados pela empresa (anexo 1).

3.1 Histórico mundial e nacional de liberações planejadas no meio ambiente do milho MIR162

Várias liberações planejadas no meio ambiente foram conduzidas em diversos países com o objetivo de verificar aspectos agrônômicos, de eficácia contra insetos alvo e de biossegurança da proteína Vip3A. A tabela 8 apresenta um sumário destas liberações.

Original

Tabela 8. Sumário de submissões de liberações planejadas no meio ambiente de milho expressando proteínas Vip3A no Brasil, Estados Unidos e Argentina.

Evento	País	Local (Estado)	Processo
MIR162	Brasil	MG, MT, PR e SC	01200.000785/2006-21
MIR162	Brasil	MG	01200.003982/2005-11
MIR162	Brasil	MG	01200.006748/2002-01
MIR162	Brasil	MG	01200.000262/2005-01
MIR162	Brasil	MG	01200.006209/2006-97
ICP-4	Brasil	MG	01200.000224/1998-74
ICP-4	Brasil	MG	01200.005283/1998-89
ICP-4	Brasil	MG	01200.000486/1999-60
ICP-4	Brasil	MG	01200.002638/1999-87
ICP-4	Brasil	MG	01200.002640/1999-29
ICP-4	Brasil	MG	01200.003722/1999-27
ICP-4	Brasil	MG	01200.004959/2000-39
ICP-4	Brasil	MG	01200.001795/2001-79
ICP-4	Brasil	MG	01200.001692/2001-17
MIR162	EUA	IL	99-032-02r
MIR162	EUA	HI	00-024-02r
MIR162	EUA	AR, FL, ID, IL, MN, PR	01-022-07r/m
MIR162	EUA	IL, MN, MS	02-022-01r/m
MIR162	EUA	HI	02-022-02r/m
MIR162	EUA	AZ, CA, FL, IA, IL, KS, MN, MO, MS, NC, NE, PR, TX, WI	03-021-01r/m
MIR162	EUA	FL, HI, IA, IL, MN, PR, WI	04-072-06n
MIR162	EUA	PR	04-203-05n
MIR162	EUA	AR, CA, FL, HI, IA, IL, IN, KS, KY, LA, MD, MN, MO, MS, NC, NE, NY, OH, PA, PR, TX, VA, WI	05-062-02n

Tabela 8 (continuação). Sumário de submissões de liberações planejadas no meio ambiente de milho expressando proteínas Vip3A no Brasil, Estados Unidos e Argentina.

Evento	País	Local (Estado)	Processo
MIR162	EUA	HI	05-104-09n
MIR162	EUA	OH	05-117-07n
MIR162	EUA	HI	05-255-03n
MIR162	EUA	CA, CO, FL, HI, IA, IL, IN, KS, LA, MN, MS, NE, NY, OH, PR, SD, TX, WI	06-055-08n
MIR162	EUA	IL	06-059-07n
MIR162	EUA	AR, CO, DE, FL, GA, HI, ID, IL, IN, IA, KS, KY, LA, ME, MD, MN, MO, NE, NC, OH, PR, SD, TX, VA, WI	07-043-109n
MIR162	EUA	PR	06-284-101n
MIR162	EUA	HI	06-284-102n
MIR162	EUA	FL, GA, ID, MN	07-032-104n
MIR162	EUA	HI, IA, IL, MN, NE, PR, TN, WI	07-050-101n
MIR162	EUA	IA	07-166-101n
MIR162	Argentina	Santa Fé	800-009511/2001
MIR162	Argentina	Santa Fé	S0: 0215902/02
MIR162	Argentina	Santa Fé, Tucumán, Salta	S01: 203358/03
MIR162	Argentina	Santa fé	S01:253805/04
MIR162	Argentina	Santa Fé, Tucumán	S01: 264292/05
MIR162	Argentina	Santa Fé, Tucumán	S01: 286285/06

3.2 Métodos de detecção

A proteína Vip3Aa20 no milho MIR162 pode ser detectada via ensaio de fluxo imuno-lateral, disponível no kit de diagnóstico *Vip3A ELISA prototype kit* da empresa Strategic Diagnostics, Inc (SDI). O método é baseado em ensaio imunoquímico (ELISA) específico para Vip3A, desenvolvido pela Strategic Diagnostics, Inc. A validação do desempenho do método foi efetuada com base na avaliação da acuidade, limite de

detecção, precisão intra- e inter-ensaios e ocorrência de reação cruzada com outros produtos de milho geneticamente modificado, como Cry1Ab, PAT, mCry3A, PMI expressa em MIR604 e mEPSPS. A precisão inter-ensaio apresentou um coeficiente de variação (%CV) de 16.4% a 19.0%, enquanto que os valores de %CV para precisão intra-ensaio variaram de 8.8% a 21.0%. A acuidade do ensaio, avaliada por meio da análise de sementes moídas de milho MIR162 e de milho convencional foi de 100%. Não ocorreu reação cruzada com outros produtos de milho geneticamente modificado. O ensaio é capaz de detectar uma semente de milho MIR162 em um total de 800 sementes. O resultado deste estudo indica a eficiência deste método para a determinação qualitativa da proteína Vip3Aa20 em sementes de milho. Para avaliação da precisão do ensaio, adicionou-se nas amostras de farinha de milho convencional, farinha de milho proveniente de milho MIR162.

3.3 Avaliação agronômica e de eficácia do milho MIR162

O milho MIR162 foi avaliado em condições de campo e casa-de-vegetação em vários experimentos realizados principalmente nos EUA, Argentina e também no Brasil, em liberações aprovadas pela CTNBio e utilizando-se germoplasma adaptado às condições edafo-climáticas do País. Nestes estudos, vários parâmetros fenotípicos foram analisados comparativamente entre o milho MIR162 e respectivos híbridos isogênicos de milho não GM, com o objetivo de se avaliar o quanto à inserção do evento MIR162 afetou parâmetros agronômicos de interesse da cultura, como a produtividade de grãos ou o seu potencial e capacidade de proliferação no ambiente como erva daninha. Além disso, experimentos avaliaram a eficácia do milho MIR162 para controle dos lepidópteros alvo da proteína Vip3Aa20. O conjunto destas avaliações realizadas confirmou que o milho MIR162 foi eficiente para o controle dos lepidópteros-praga avaliados, apresentou potencial agronômico igual ou superior aos respectivos híbridos não geneticamente modificados (GM) de germoplasma similar, e que nenhuma diferença significativa nos parâmetros fenotípicos foi observada, que pudesse indicar um maior potencial de proliferação do milho MIR162 como erva-daninha, conforme descrito a seguir.

5

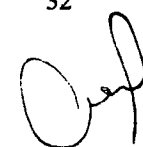

3.3.1 Germinação e dormência das sementes

Uma maior capacidade de germinação ou dormência de sementes são características que podem indicar um maior potencial como erva-daninha. O milho é uma planta anual de baixa capacidade de dormência. Um estudo em laboratório foi conduzido nos EUA de forma a se avaliar as características de germinação e dormência de sementes do milho MIR162, utilizando um procedimento estabelecido pela AOSA (*Association of Official Seed Analysts*). Amostras de sementes de dois híbridos de milho MIR162 e dos respectivos híbridos isogênicos não GM e mais três híbridos comerciais, utilizados como controle, foram submetidas à germinação sob várias condições de temperatura. Ao final dos experimentos, as sementes foram submetidas a testes de tetrazólio para avaliar sua viabilidade (AOSA, 2000). Os resultados obtidos nestes estudos indicaram não haver nenhuma diferença significativa entre a proporção de sementes normais germinadas entre o milho MIR162 e respectivos controles não GM. Adicionalmente, os resultados obtidos para a proporção de sementes viáveis confirmou que não houve nenhum incremento no potencial de dormência das sementes de milho MIR162 analisadas.

Após o cultivo do milho MIR162 em condições de lavoura, da mesma forma que ocorre com o milho convencional não GM, plantas voluntárias poderão ocorrer em condições de umidade e temperatura adequadas. Estas plantas voluntárias podem ser facilmente eliminadas na fase de plântula ou antes do florescimento, pela aplicação de herbicida específico ou por manejo mecânico com máquinas agrícolas.

3.3.2 Desempenho agrônômico do milho MIR162 em condições de campo

Ensaio de avaliação comparativa entre híbridos de milho MIR162 e respectivos híbridos isogênicos não GM foram realizados em várias localidades representativas da área de produção de milho dos EUA, nos anos de 2005 e 2006, em um total de 16 experimentos plantados durante a época de cultivo do milho neste país. Estes híbridos foram avaliados para vários parâmetros agrônômicos importantes da fase vegetativa e



reprodutiva da cultura, incluindo aqueles de interesse direto aos agricultores, como produtividade de grãos, em um delineamento de blocos casualizados com 4 ou 5 repetições. No total, 16 parâmetros agronômicos foram avaliados, e, para cada variável, a significância estatística foi determinada pelo teste F. O conjunto dos resultados destas avaliações fenotípicas comparativas indicaram que o milho MIR162 é fenotipicamente semelhante aos respectivos híbridos convencionais não GM de germoplasma similar, apresentando desempenho agrônômico favorável ao cultivo no país.

Híbridos de milho MIR162 de germoplasma tropical e desenvolvidos para as condições de cultivo do Brasil e Argentina foram também avaliados para uma série de parâmetros agronômicos e de eficácia contra lepidópteros alvos em três localidades da região noroeste da Argentina em 2005/2006, as quais apresentam condições ambientais similares a algumas regiões de cultivo do Sul do Brasil. Estes experimentos foram realizados sob a permissão da Secretaria de Agricultura, Ganaderia y Alimentos (SAGPyA) Argentina, protocolo 264292/05, em delineamento experimental de blocos completos casualizados, utilizando parcelas de 4 linhas de 5 metros, com seis repetições. Os parâmetros avaliados nestes experimentos foram: danos provocados pela lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), florescimento masculino, porcentagem de plantas eretas por ocasião da colheita, índice visual de quebramento das plantas, índice visual de colheita, porcentagem de umidade nos grãos, rendimento de grãos e peso de 1.000 grãos, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Com base nos resultados obtidos, observou-se diferença significativa entre os híbridos de milho MIR62 e os respectivos híbridos isogênicos convencionais (não GM) para o nível de dano causado por *S. frugiperda*, como esperado pela expressão da proteína Vip3Aa20 no milho MIR162. Para os demais parâmetros agronômicos avaliados, os resultados médios de avaliação comparativa entre o grupo de híbridos de milho MIR162 e os respectivos híbridos isogênicos não GM são apresentados na tabela 9, onde observa-se que estes dois grupos de híbridos de milho (MIR162 x Não GM) apresentaram comportamento estatístico similar, e demonstrando que a inserção da modificação genética do evento MIR162 não afetou o fenótipo geral dos híbridos avaliados e o comportamento dos mesmos no campo, para estes parâmetros não associados com a resistência a insetos. Os híbridos não GM avaliados nestes ensaios de avaliação agrônômica realizado na

Ed 6

Argentina correspondem a híbridos comerciais ou pré-comerciais de ampla adaptação no Brasil. O relatório detalhado destes estudos é apresentado no anexo 3.

Tabela 9. Análise agronômica comparativa entre o grupo de híbridos de milho MIR162 e o grupo de respectivos híbridos isogênicos convencionais (não GM), avaliados em três localidades do noroeste da Argentina. Syngenta Seeds Ltda, 2005/06.

Híbridos avaliados	Floresc. Masculino	% Plantas Eretas	Índice Visual Quebram.	Índice Visual Colheita	Umidade Colheita	Rendimento Corrigido 13%	Peso 1.000 grãos
Média Híbridos MIR162	62.8 a	80.1 a	3.3 a	4.4 a	24.3 a	9029 a	175.0 a
Média Híbridos Não GM	62.8 a	79.9 a	3.4 a	4.5 a	24.3 a	8456 a	174.8 a

Média seguida pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O milho MIR162 também foi avaliado para uma série de parâmetros agronômicos e de eficácia em condições de cultivo a campo no Brasil no ano de 2007, sob permissão da CTNBio número nº. 01200.003982/2005-11. Nestes experimentos avaliou-se o híbrido Maximus MIR162 em comparação ao respectivo híbrido isogênico não GM em duas situações: com e sem aplicação de inseticida foliar para controle do dano provocado pela lagarta-do-cartucho. O híbrido Maximus (não GM) representa um híbrido simples comercial registrado e comercializado pela Syngenta Seeds Ltda no Brasil. Nas tabelas 10 e 11 são apresentados os dados médios obtidos na avaliação dos diferentes parâmetros considerando a análise conjunta dos dados. Não foram observadas diferenças significativas entre o milho MIR162 e o respectivo isogênico não GM (com aplicação de inseticida) para os parâmetros agronômicos avaliados, confirmando mais uma vez, em uma condição ambiental diferenciada, que a inserção da construção genética do evento MIR162 não afetou o fenótipo geral do híbrido avaliado e o comportamento do mesmo no campo, para parâmetros não associados com a resistência a insetos. Estes resultados obtidos nos diferentes experimentos realizados eram os esperados, considerando-se que o milho MIR162 avaliado é uma versão isogênica do híbrido convencional não GM, obtido por sucessivos retrocruzamentos, conforme descrito por Fehr (1991), em que, durante o processo de introgressão, procurou-se manter todas as características das linhagens trabalhadas, com o adicional do controle de pragas da ordem Lepidoptera proporcionado pela expressão da proteína Vip3Aa20. Ainda, o híbrido avaliado neste estudo realizado no Brasil corresponde a um híbrido comercial de ampla adaptação ao cultivo no País. O comportamento agrônomo similar

Ed 6

do milho MIR162 evidencia dessa forma o seu potencial para cultivo nas condições edafo-climáticas brasileiras, e os resultados obtidos indicam ainda que a avaliação dos parâmetros fenotípicos não indicou nenhuma alteração inesperada que pudesse conferir alguma vantagem adaptativa como espécie silvestre ao milho MIR162. Um relatório detalhado deste estudo é apresentado no anexo 4.

Tabela 10. Resultados médios da comparação de híbrido de milho MIR162 e respectivo híbrido isogênico não GM (com e sem aplicação de inseticida), em ensaios realizados no Brasil, para os parâmetros: florescimento feminino e masculino, nota para doenças foliares (*Cercospora*, *Phaeosphaeria* e *Physopella*), altura de planta e altura de inserção das espigas. Syngenta Seeds, 2007.

Tratamentos	Flor Feminino (dias)	Flor Masculino (dias)	Nota Cercospora	Nota Phaeosphaeria	Nota Physopella	Alt Planta (cm)	Alt Espiga (cm)
MIR162	63.0 a	62.9 a	2.0 a	2.7 a	2.8 a	239 a	135 a
Não GM + Inseticida	63.1 a	62.9 a	2.1 a	2.5 a	2.8 a	239 a	135 a
Não GM	63.0 a	62.9 a	2.1 a	2.5 a	2.8 a ⁻	235 b	131 b
CV (%)	0.71	0.73	11.63	19.16	16.12	1.67	2.66
Média Geral	63.04	62.9	2.06	2.56	2.77	237.92	136.31

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 11. Resultados médios da comparação de híbrido de milho MIR162 e respectivo híbrido isogênico não GM (com e sem aplicação de inseticida), em ensaios realizados no Brasil, para os parâmetros: stand, porcentagem de plantas eretas, nota para cor e textura dos grãos, peso de espigas, peso de grãos, umidade na colheita e peso de 1000 grãos. Syngenta Seeds Ltda, 2007.

Tratamentos	Stand (pl/parcela)	% Plantas Eretas	Nota Cor Grão	Nota Textura Grão	Peso espigas (kg/ha)	Peso grão (kg/ha)	Umidade grão (%)	Peso 1000 grão (grs)
MIR162	40 a	92.7 a	4 a	3 a	11465 a	8072 a	17.1 a	282 a
Não GM + Inseticida	41 a	93.0 a	4 a	3 a	10944 a	7700 a	17.2 a	283 a
Não GM	41 a	89.3 a	4 a	3 a	8958 b	6236 b	16.8 a	276 a
CV (%)	4.06	6.64	-	-	11.09	10.99	4.66	6.87
Média Geral	40.75	91.63	4	3	10466	7336	17.06	280.09

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

3.3.3 Eficácia do milho MIR162 contra lepidópteros-praga

Um dos principais fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção da cultura do milho no mundo é a incidência de pragas. No Brasil, destacam-se entre os lepidópteros que atacam a cultura a lagarta do cartucho, *S.*

Ed

frugiperda, a lagarta-da-espiga, *Helicoverpa zea* e a broca do colmo, *Diatraea saccharalis*.

A lagarta-do-cartucho é considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil (Cruz *et al.*, 2004). É uma praga de difícil controle devido a sua ampla gama de hospedeiros e sua grande capacidade de dispersão durante o período de cultivo. Já na década de 20, relatou-se a presença dessa praga em vários estados brasileiros, causando severos danos em algumas culturas. Segundo Cruz *et al.* (1999), as perdas causadas pela lagarta do cartucho no Brasil atingiram cerca de US\$ 40 milhões por ano. Gassen (1994) enfatiza que os maiores danos ocorrem na fase em que a planta apresenta de 8 a 10 folhas, podendo ocorrer uma redução de 19% no rendimento de grãos. A presença da lagarta na planta de milho evidencia-se por folhas danificadas, com dejetos no centro da planta. Silva *et al.* (1983) ressaltam que pode ocorrer a destruição completa das plantas em caso de infestação intensa, associada às condições de estresse hídrico. As lagartas recém-eclodidas atacam o parênquima foliar de uma das faces da folha, deixando apenas a epiderme membranosa, o que confere um aspecto transparente à folha e em ínstares mais avançados, os insetos passam a perfurá-las. Quando o ataque ocorre nos estágios iniciais da cultura, pode causar morte de plantas, reduzindo o “stand”. Esta pode também se dirigir para a região da espiga, atacando o pedúnculo e impedindo a formação de grãos. Pode ainda penetrar nas espigas na sua porção basal e danificar diretamente os grãos ou alimentar-se da ponta da mesma. O dano mais severo é causado por lagartas de quinto e sexto ínstares (Bianco, 1991; Valicente *et al.*, 1991).

A *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), é referida como prejudicial a cultura de três formas: atacando os estigmas, impedindo a fertilização e, em consequência, surgirão falhas nas mesmas; alimentando-se de grãos leitosos, os destruindo e; finalmente, os orifícios deixados pelas lagartas nas espigas, por ocasião da fase de pupa, facilitam a penetração de microrganismos que podem causar podridões (Gassen, 1996). *Helicoverpa zea* também é um inseto polífago, incluindo como hospedeiros, além do milho, outras gramíneas, solanáceas, leguminosas, frutíferas e hortaliças. O controle químico desta praga pode apresentar baixa eficiência. Isto se deve ao fato das lagartas encontrarem-se protegidas no interior das espigas. Segundo Fancelli *et al.*, (2000), a lagarta da espiga, além de causar dano direto na espiga e favorecer a

Ed

penetração de microorganismos, assume importância como praga principalmente nas lavouras de milho doce e verde.

Outra praga que tem ocorrido com frequência causando danos à cultura do milho, principalmente na região central do Brasil, é a broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae), que se trata de uma importante praga da cana-de-açúcar (Vendramim *et al.*, 1989). O crescente aumento populacional desta praga nas lavouras de milho pode estar associado a vários fatores, tais como o crescimento da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, mudanças climáticas (invernos menos rigorosos), semeadura do milho no verão e safrinha, e presença de poáceas nativas, entre outros. Durante a fase larval, *D. saccharalis* faz galerias no interior do colmo da planta ocasionando a diminuição do fluxo de seiva e tornando-a mais vulnerável ao tombamento. Os orifícios ocasionados pela broca-do-colmo podem ainda favorecer a penetração e desenvolvimento de microorganismos fitopatogênicos (Gallo *et al.*, 2002). O controle da *D. saccharalis* é dificultado pois a broca fica alojada no interior do colmo da planta.

A proteína Vip3Aa20 expressa no milho MIR162 apresenta atividade contra estes lepidópteros-praga mencionados, de importância econômica para a cultura do milho no país. Em ensaios realizados em campo no Brasil no ano de 2007, a eficácia do milho MIR162 contra *S. frugiperda*, *H. zea* e *D. sacharallis* foi avaliada em condições de campo em dois locais, em delineamento de blocos casualizados com parcelas de 2 linhas de 5 metros, com oito repetições. A avaliação dos danos provocados pela *S. frugiperda* foi realizada em todas as plantas individuais das duas linhas da parcela, nos estádios de desenvolvimento V6 e V8, sendo posteriormente calculada uma nota média por época de avaliação, utilizando uma escala de notas de 1 a 6, adaptada de Carvalho (1970). A avaliação dos danos provocados por *D. sacharallis* foi realizada com base no número médio de furos presentes no colmo do milho e comprimento de galerias (em cm), com a avaliação realizada em 10 plantas da parcela, por ocasião da colheita. A avaliação dos danos de *H. zea* foi realizada por meio da porcentagem de espigas com danos da lagarta, e comprimento médio de dano (em cm) nas espigas atacadas, por ocasião da colheita.

Os resultados obtidos na avaliação do dano de *S. frugiperda* por época de avaliação, por local e conjunta, estão descritos na tabela 12 abaixo.

Ed

Tabela 12. Resultados médios da comparação do híbrido de milho MIR162 e respectivo híbrido isogênico não GM (com e sem aplicação de inseticida), para o parâmetro nota para dano de *Spodoptera frugiperda*. Syngenta Seeds Ltda, 2007.

Tratamentos	Uberlândia-MG		Ituiutaba-MG		Conjunta
	<i>Spodoptera</i>	<i>Spodoptera</i>	<i>Spodoptera</i>	<i>Spodoptera</i>	
	Aval 1	Aval 2	Aval 1	Aval 2	
MIR162	1.3 a	1.1 a	1.0 a	1.0 a	1.1 a
Não GM + inseticida	3.1 b	3.3 b	2.8 b	2.3 b	2.9 b
Não GM	3.9 c	4.8 c	3.7 c	3.7 c	4.0 c
CV (%)	6.61	4.62	6.03	8.26	6.61
Média Geral	2.76	3.03	2.5	2.35	2.66

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

Observa-se que o milho MIR162 foi estatisticamente superior ao milho convencional não GM, com e sem aplicação de inseticida foliar para o controle desta praga, independente da época ou local de avaliação. O híbrido de milho MIR162 apresentou na média das duas avaliações e dos dois locais a nota 1,1, correspondendo praticamente à ausência de danos ou dano muito leve, necessário para infecção e morte da lagarta pela ingestão da proteína Vip3Aa20, e significativamente menor que o nível de dano apresentado pelo híbrido isogênico não GM, mesmo quando realizou-se a aplicação de inseticidas químicos para controle da praga (nota 2,9). Destaca-se ainda que no experimento realizado em Uberlândia-MG, houve uma infestação bastante elevada de *S. frugiperda*, o que pode ser observado pela nota obtida pelo híbrido isogênico não GM sem controle químico, que chegou a atingir a nota média de 4,8. As avaliações realizadas para dano da broca-do-colmo-do-milho (*D. saccharalis*) e da lagarta-da-espiga (*H. zea*) estão apresentadas na tabela 13 a seguir.

Observa-se diferença significativa entre o híbrido de milho MIR162 e o respectivo híbrido isogênico não GM para todos os parâmetros avaliados para as duas pragas, sendo que o milho MIR162 praticamente não apresentou danos provocados pela *D. saccharalis* e *H. zea*. Um relatório com maiores informações destes experimentos realizados é apresentado no anexo 5.

Ed

Tabela 13. Resultados médios da comparação do milho MIR162 e respectivo híbrido isogênico não GM (com e sem aplicação de inseticida), para os parâmetros: dano de *Diatraea saccharalis* - furos por planta e comprimento médio de galeria (cm), dano de *Helicoverpa zea* - % espigas atacadas e comprimento médio do dano na espiga. Syngenta Seeds Ltda, Uberlândia-MG, 2007.

Tratamentos	<i>Diatraea</i> Número Furos		<i>Diatraea</i> galeria (cm)		<i>H zea</i> % espigas		<i>H zea</i> dano medio (cm)	
MIR162	0.0	a	0.0	a	2.5	a	0.08	a
Não GM + inseticida	2.2	b	14.1	b	77.5	b	1.50	b
Não GM	1.8	b	12.0	b	98.7	c	1.64	b
CV (%)	54.2		51.42		9.95		17	
Média Geral	1.33		8.7		59.58		1.07	

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

Em um outro experimento realizado em casa-de-vegetação na estação experimental da Syngenta em Holambra-SP (CQB 001/1996), avaliou-se a eficácia do evento de transformação genética MIR162, no controle de *S. frugiperda* em estágio inicial de desenvolvimento das plantas. Foram comparados um híbrido de milho MIR162 com o respectivo híbrido isogênico não GM, com e sem tratamento de sementes com inseticida (2 tratamentos de sementes: TS1 e TS2), visando o controle desta praga. O parâmetro utilizado para estudo de eficácia foi a porcentagem de plantas cortadas por tratamento, onde variou-se a população de lagartas de instar L3-L4 utilizadas (0,5 e 1,0 lagarta por planta), além de serem realizadas avaliações em diferentes números de dias após a infestação artificial (1, 2, 5 e 8 dias após infestação). Os resultados obtidos para porcentagem de plantas cortadas pelo ataque de *S. frugiperda* instars L3-L3 estão apresentados na tabela 14 a seguir. Os resultados obtidos indicam que o milho MIR162 promove um controle de *S. frugiperda* em estágios L3-L4 tão eficiente quanto os tratamentos de sementes comumente utilizados para a cultura do milho, em fases iniciais de estabelecimento da lavoura. Um relatório completo deste experimento realizado é apresentado no anexo 6.

Tabela 14. Resultados médios da porcentagem de plantas cortadas por *Spodoptera frugiperda* ínstars L3-L4 para os tratamentos avaliados em diferentes dias após infestação. Syngenta Seeds Ltda, 2007.

Tratamento	DAI				Média 4 avaliações
	DAI 1	DAI 2	DAI 5	DAI 8	
Maximus Não GM + TS1	1.38 a	1.38 a	2.08 a	3.46 a	2.08 a
Maximus Mir162	4.36 a	4.36 a	4.36 a	4.36 a	4.36 a
Maximus Não GM + TS2	4.17 a	4.16 a	4.93 a	5.62 a	4.72 a
Maximus Não GM	67.88 b	87.32 c	100.00 c	100.00 c	88.80 b
Média	19.45 A	24.31 B	27.84 B	28.36 B	

Médias com letras minúsculas diferentes na vertical e maiúsculas na horizontal diferem-se entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No conjunto, os resultados obtidos em experimentos realizados no Brasil, bem como os estudos realizados em outros países como os EUA e a Argentina, atestam que o milho MIR162 controla os lepidópteros-praga avaliados de forma eficiente, protegendo a cultura do milho contra o ataque das mesmas, durante todo o ciclo de desenvolvimento dos híbridos MIR162. Desta forma, este evento representa uma importante opção ao manejo integrado de pragas e evidencia o potencial de utilização de híbridos de milho expressando a proteína Vip3Aa20 para as condições de cultivo do Brasil.

3.4 Estudos de segurança alimentar

O milho MIR162 contém o gene *vip3Aa20* que codifica a proteína Vip3Aa20, que confere resistência ao ataque de certos lepidópteros-praga, e o gene *manA* que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI), utilizada como marcador de seleção durante o processo de transformação.

Diferentemente das proteínas cristais (Cry) de *Bacillus thuringiensis*, as proteínas Vip são produzidas durante o crescimento vegetativo bacteriano e são secretadas como proteínas solúveis em meio extracelular. As culturas de *B. thuringiensis* continuam produzindo proteína Vip durante a fase estacionária de crescimento e esporulação. Em comparação às β -exotoxinas não-proteináceas termoestáveis secretadas por cepas de *B. thuringiensis*, as proteínas Vip são termolábeis (Lee *et al.*, 2003). A variante Vip3Aa20 produzida pelo milho MIR162 tem um peso molecular de 89kDa e difere em dois aminoácidos quando comparada com a proteína nativa Vip3Aa1 (nas posições 129 e

284). Uma outra variante desta proteína (Vip3Aa19) está presente em um produto da Syngenta, algodão COT102, aprovado nos Estados Unidos em 2005 para uso em alimentação humana e animal e na Austrália neste mesmo ano para alimentação humana. A variante Vip3Aa19 difere da proteína nativa em um aminoácido na posição 284, e da Vip3Aa20 em um aminoácido na posição 129. A proteína Vip3Aa20 apresenta uma sequência com homologia maior que 99.7% em relação à sequência da proteína nativa Vip3Aa1 (anexo 1).

Proteínas do tipo Vip já foram identificadas em produtos inseticidas comerciais utilizados nos Estados Unidos produzidos a partir de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*. Estes produtos são utilizados no controle de lepidópteros-praga em uma grande variedade de cultivos, indicando que estas proteínas se encontram presentes em lavouras, bem como em produtos frescos, nos quais foram utilizados este grupo de inseticida.

A proteína PMI (fosfomanose isomerase), por ser ubíqua em plantas e animais, é encontrada na natureza e está presente em baixas concentrações na cadeia alimentar. Proteínas já foram detectadas em tabaco (Barb *et al.*, 2002) e espécies de brássicas (Chen *et al.*, 1989), assim como em sementes de soja e outras leguminosas (Lée *et al.*, 1984). Genes que codificam proteínas PMI já foram caracterizados em vários outros organismos como bactérias, leveduras, ratos, suínos e humanos (Proudfoot *et al.*, 1994a, 1994b; Davis *et al.*, 2002) para os quais são essenciais.

A proteína PMI expressa no milho MIR162 tem peso molecular de aproximadamente 42.8kDa e 391 aminoácidos. A PMI cataliza a conversão de manose 6-fosfato e frutose 6-fosfato e tem sido utilizada como um marcador de seleção em processos de diversas espécies (Bojsen *et al.*, 1997; Joersbo, *et al.*, 1998; Negrotto *et al.*, 2000). Células vegetais transformadas com o gene *manA* proveniente de *E. coli* são capazes de sobreviver em meio de cultura contendo manose como única fonte de energia (Miles *et al.*, 1984). Nesta mesma condição, células vegetais sem este gene não se desenvolveriam.

Considerando que, para estudos de toxicologia ambiental e animal da proteína purificada, a produção e extração em grande escala das proteínas Vip3Aa20 e PMI provenientes do milho MIR162 eram inviáveis, estas proteínas foram extraídas de *E.*

coli. Ensaios da caracterização e de análises bioquímicas conduzidas a fim de estabelecer a equivalência destes produtos obtidos a partir da planta e do microorganismo demonstraram que as proteínas provenientes do milho MIR162 e presentes nas substâncias-teste provenientes de *E. coli* são bioquimicamente e funcionalmente idênticas. Dessa forma, alguns estudos toxicológicos foram baseados nas seguintes substâncias-teste produzidas por microorganismo:

MIR162Vip3A-106: foi realizado um estudo a fim de caracterizar a substância-teste MIR162VIP3A-0106, produzida por *E. coli* e determinar se esta proteína Vip3Aa20 produzida por via microbiana era equivalente à proteína Vip3Aa20 expressa no milho MIR162. A identidade da proteína Vip3Aa20 na substância-teste MIR162VIP3A-0106 foi confirmada por testes de imunorreatividade, peso molecular, perfil de glicosilação e sequência de aminoácidos N-terminal. A concentração, pureza e solubilidade da substância-teste também foram avaliadas. A substância-teste MIR162VIP3A-0106 produzida por *E. coli* apresentou cerca de 84% por peso de Vip3Aa20 e solubilidade a 2.5 mg/ml em 10 mM Tris-HCl (pH 10.5), 0.4 mM EDTA, 0.1% Tween® 20. Não foi observada glicosilação da proteína Vip3Aa20 contida na substância-teste e a sequência de aminoácidos N-terminal observada apresentou-se como esperada. Na análise comparativa entre a proteína Vip3Aa20 contida na substância-teste MIR162VIP3A-0106 e a produzida no milho MIR162, obtiveram-se o tamanho esperado de aproximadamente 89kDa e reação imunológica cruzada com o anticorpo Vip3A para a proteína de ambas as fontes. Ambas apresentaram bioatividade similar a lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* (lagarta do cartucho). A sequência de aminoácidos esperada e a identidade da proteína Vip3Aa20 produzida no milho MIR162 e por via microbiana foi confirmada para ambas as proteínas através da análise de mapeamento de massa peptídica em 40 e 45%, respectivamente. Com base nestes resultados, a proteína Vip3Aa20 da substância-teste produzida por *E. coli* e pelo milho MIR162 são bioquimicamente e funcionalmente equivalentes, indicando assim que os resultados obtidos em estudos de segurança alimentar com base nesta substância-teste são aplicáveis à proteína Vip3Aa20 expressa no milho MIR162.

PMI-0198: foi realizado um estudo comparativo envolvendo parâmetros bioquímicos e funcionais entre a enzima PMI (fosfomanose isomerase) expressa no

milho MIR162 e a contida na substância-teste PMI-0198, produzida por um sistema de *E. coli* recombinante. Conforme resultados de Western Blot, a proteína de ambas as fontes apresentaram peso molecular de aproximadamente 42.8kDa e ambas reagiram aos anticorpos específicos, conforme esperado. As atividades enzimáticas específicas apresentaram valores de comparação similares (a PMI oriunda do milho MIR162 apresentou atividade específica de 55.5U/mg PMI e a proveniente de *E. coli* 33.2U/mg PMI). Com base neste estudo comparativo, conclui-se que a proteína de ambas as fontes são bioquímica e funcionalmente equivalentes e que os dados obtidos em estudos de segurança alimentar com base nesta substância-teste são aplicáveis à proteína PMI expressa no milho MIR162.

Este item 3.4 *Segurança Alimentar* reúne informações de estudos de segurança alimentar, obtidas para as proteínas Vip3Aa20 e PMI expressas no milho MIR162, incluindo: (1) informações sobre toxidez de cada uma das proteínas expressas no milho MIR162; (2) informações sobre alergenicidade de cada uma das proteínas expressas no milho MIR162; 3) aspectos composicionais de forragem e grãos do milho MIR162 e efeitos da ingestão em aves e mamíferos; e (4) informações sobre os níveis de cada proteína nos tecidos da planta de milho MIR162.

3.4.1 Informações sobre toxicidade de cada uma das proteínas expressas no milho MIR162

3.4.1.1 Estudo da homologia de Vip3Aa20 e PMI com proteínas conhecidamente tóxicas

Para a avaliação do potencial tóxico das proteínas Vip3Aa20 e PMI, foi realizada uma extensiva análise *in silico* quanto à existência de homologia entre as seqüências de aminoácidos destas proteínas com proteínas conhecidamente tóxicas. Além disso, foi realizado um estudo de toxidez oral aguda em camundongos.

A seqüência de 789 aminoácidos da proteína Vip3Aa20 e a seqüência de 391

Ed

aminoácidos contidos na proteína PMI foram comparadas com as seqüências depositadas no bando de dados de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2007).

Foi utilizado o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para pesquisar o banco de dados de proteínas do NCBI, utilizando Vip3Aa20 e PMI como seqüências de busca. O banco de dados de proteína NCBI é um grande banco de dados público contendo mais de 5 milhões de seqüências e representando, portanto, uma boa fonte para identificar qualquer homologia potencial com proteínas toxinas. O BLASTP é o programa mais frequentemente usado para a busca de seqüências de proteínas para similaridade de seqüência. Todas as seqüências do banco de dados com um valor esperado (E-value) de 10 ou menor foram identificadas por exclusão, pelo programa BLASTP. As comparações entre proteínas altamente homólogas produzem valores de E próximos de zero, indicando uma probabilidade muito baixa de que esses acertos possam ocorrer por acaso. Reciprocamente, a probabilidade de que as similaridades das seqüências de aminoácidos observadas em uma busca no banco de dados ocorram por acaso aumenta com valores mais altos de E (Ponting, 2001).

Com base nessa análise foi possível determinar se haviam proteínas com seqüência significativamente similares às proteínas expressas pelo milho MIR162 e se alguma proteína conhecida como tóxica apresentava seqüência significativamente similar às das proteínas expressas pelo milho MIR162, o que poderia indicar um potencial tóxico para as proteínas Vip3Aa20 e PMI. Para avaliar a significância de seqüências similares a Vip3Aa20 e PMI, buscas adicionais foram conduzidas usando versões com permutas na seqüência de aminoácidos das duas proteínas. Cinco seqüências permutadas diferentemente para cada uma das proteínas foram criadas submetendo-se as seqüências a permutas ao acaso, usando o Programa Protein do Sequence Manipulation Suite 2 (Stothard, 2000).

Com a exceção de outras proteínas vegetativas específicas para insetos, os resultados da busca BLASTP não apresentaram homologia de seqüência entre as seqüências de busca Vip3Aa20 e proteínas conhecidas como sendo toxinas (anexo 7).

A busca no banco de dados com a utilização da seqüência da proteína PMI produziu 332 entradas com valores de E significativos (anexo 8). Destas, 271 foram

Ed

identificadas como enzimas fosfomanose conhecidas ou putativas (incluindo manose-6-fosfato isomerase –PMI- e ManA) de 178 espécies e outras 60 entradas foram identificadas como proteínas hipotéticas ou como proteínas de 44 espécies, com função desconhecida. Uma sequência identificada foi ADP-L-glicero-D-manno-heptose-6-epimerase (AGME) de *Aspergillus terreus*, com valor esperado (E) de 2×10^{-11} . AGME pertence à família de epimerases dependentes de NADP que catalizam a interconversão ADP-D-glicero-D-mannoheptose e ADP-L-glicero-D-mannoheptose (heptose). AGME está envolvida na biossíntese de heptose, para a incorporação de liposacarídeos que formam a membrana externa da maioria das bactérias gram-negativas (Deacon *et al.*, 2000; Kneidinger *et al.*, 2002; Valvano, 1999), não estando presente em células de mamíferos (Deacon *et al.*, 2000). AGME não é conhecida como toxina.

3.4.1.2 Digestibilidade *in vitro* de Vip3Aa20 e PMI sob condições gástricas e intestinais simuladas de mamíferos

A suscetibilidade de Vip3Aa20 à degradação proteolítica foi avaliada por meio de estudos utilizando-se fluido intestinal simulado (SIF) contendo pancreatina e fluido gástrico simulado contendo pepsina (SGF). A fonte de Vip3Aa20 (peso molecular de 89 kDa) nestes estudos foi MIR162VIP3A-0106, uma substância-teste produzida por microorganismo conforme descrito anteriormente, sendo que nos estudos de SGF também foi utilizada a proteína purificada a partir do milho MIR162.

No estudo de SIF, Vip3Aa20 foi rapidamente degradada, uma vez que não foi detectada nenhuma Vip3Aa20 intacta após 5 minutos de exposição ao SIF, conforme avaliado por análises de SDS-PAGE e Western blot. Dois produtos de degradação de Vip3Aa20 possuindo pesos moleculares de 62 e 55kDa foram detectáveis em concentrações baixas durante o tempo da investigação de 48 horas, pelas análises de SDS-PAGE e Western blot. Embora pequenos fragmentos protéicos de Vip3Aa20 eram visíveis em baixas concentrações após 48h de incubação com SIF, a maior parte da Vip3Aa20 foi rapidamente digerida. Na análise de SGF, foi utilizada a proteína Vip3Aa20 produzida em bactéria (MIR162VIP3A-0106) e proveniente de milho MIR162, as quais também apresentaram rápida degradação. Através da análise Western

Blot não foi detectada proteína intacta após incubação em SGF por um minuto. Na simulação utilizando-se Vip3Aa20 proveniente do milho MIR162, um fragmento de aproximadamente 60kDa, imunorreativo ao anticorpo Vip3Aa, provavelmente produto da ação da pepsina, foi detectado após este período, porém este foi totalmente degradado após dois minutos de incubação em SGF. Além disso, uma banda difusa de baixo peso molecular (8 kDa) foi observada após um minuto de incubação em SGF. Este fragmento, muito provavelmente um produto da atividade proteolítica da pepsina, apresentou uma redução de intensidade ao longo do período de incubação. Os resultados dos estudos com a proteína Vip3Aa20 permitem concluir que esta proteína será prontamente digerida, como qualquer outra proteína naturalmente presente na dieta, sob ambiente gastro-intestinal típico de mamíferos.

A susceptibilidade da proteína PMI à digestão gástrica e intestinal também foi avaliada por meio de SGF e SIF. A proteína utilizada nestes estudos foi produzida por via microbiana (PMI-0198). A PMI foi rapidamente degradada em SGF, de forma que ~~não foi identificada na amostra retirada no primeiro momento da reação (tempo 0 da reação)~~. Assim como a VIP3Aa20, a PMI também apresentou rápida degradação na análise SIF, não sendo detectada após dois minutos de incubação a 37° C. A fim de ser demonstrado o período de degradação da PMI, a concentração de pepsina na simulação SGF foi reduzida a 0.0001X em relação à concentração padrão. Nessa condição, a proteína PMI e sua atividade enzimática não foram detectadas após um período de incubação de 10 minutos a 37° C. Estes resultados indicam que a proteína PMI expressa nas plantas do milho MIR162 provavelmente serão digeridas como qualquer outra proteína naturalmente presente na dieta, sob condições gástricas típicas de mamíferos. Adicionalmente, mesmo que improvavelmente a proteína PMI sobreviva no ambiente gástrico, esta será rapidamente degradada no ambiente intestinal.

3.4.1.3 Estabilidade térmica das proteínas Vip3Aa20 e PMI

Com o objetivo de investigar o efeito da temperatura na estabilidade das proteínas Vip3Aa20 e PMI, a Syngenta realizou estudos independentes para estas proteínas.

A atividade de Vip3Aa20 produzida via microbiana (MIR162VIP3A-0106) foi determinada através de bioensaio com lagartas de *S. frugiperda* (lagarta do cartucho). Neste estudo, Vip3Aa20 foi exposta a várias temperaturas [4 (controle), 25, 37, 65 e 95°C] por 30 min, enquanto que a perda da bioatividade foi determinada pelo efeito inseticida sobre a lagarta do cartucho.

Os resultados do bioensaio com *S. frugiperda* demonstraram que a incubação de Vip3Aa20 a 25°C e 37°C não apresentou efeito significativo na bioatividade desta proteína quando comparada com a observada a 4°C. Simultaneamente, os controles negativos (dietas tratadas com água e com tampão) não apresentaram mortalidade. Os dados obtidos neste estudo indicaram que a incubação a partir de 65°C por 30 min resulta em uma completa perda de bioatividade de Vip3Aa20 sobre *S. frugiperda*. Estes resultados atestam que a proteína Vip3Aa20 pode ser considerada estável ao aquecimento até a temperatura de 37°C, mas é instável ao aquecimento sob temperaturas iguais ou superiores a 65°C.

A estabilidade térmica para PMI também foi determinada na proteína expressa via microbiana (PMI-0198), por incubação em diversas temperaturas [4 (controle), 25, 37, 55, 65 e 95°C] por 30 min e posterior avaliação da atividade enzimática e imunoreatividade, determinado por ELISA. Em condições de 25 e 37°C não houve efeito significativo na atividade enzimática de PMI quando comparada ao controle (4° C). Em ambiente de 55° C, houve uma perda de aproximadamente 57% da atividade enzimática em comparação ao controle. A 65°C foi observado apenas 3% da atividade enzimática em relação ao controle e uma perda completa da atividade a 95° C. Quanto à imunorreatividade, houve pouca redução a 25° C, sendo que a 37, 55 e 65° C esta margem de perda aumentou para 22, 34 e 78%, respectivamente, e praticamente nenhuma imunorreatividade foi observada por ELISA em amostras submetidas a 95° C por 30 minutos. Estes resultados indicam que a proteína PMI é termo-lábil em temperaturas a partir de 37°C.

3.4.1.4 Estudo de toxidez aguda das proteínas expressas no milho MIR162 em camundongos

Foram realizados estudos de toxidez aguda em camundongos, com a administração via oral das proteínas Vip3Aa20 e PMI, separadamente.

A proteína Vip3Aa20 produzida via microbiana (MIR162VIP3A-0106) foi ministrada a grupos de machos e fêmeas de camundongos, via oral (gavage). A substância controle e o veículo usado para a amostra de teste foi óleo de milho. Devido à baixa solubilidade da proteína em veículos aquosos, o óleo de milho foi escolhido como veículo e como substância controle, uma vez que permitiu o alcance de uma concentração mais alta da substância-teste na suspensão viscosa, aceitável para a dosagem. O nível de dosagem de 1250mg de Vip3Aa20/kg foi selecionado por ser a dose mais alta possível, obtida devido à alta viscosidade da substância-teste, em preparações com óleo de milho (50ml/kg de 25.0 mg/ml de preparação pura). Como este volume de dosagem era muito alto para ser administrado aos camundongos, através de uma única dose, a administração foi efetuada em 2 doses de 2.5ml/100 g com 2 horas de intervalo. Durante todo o estudo foram efetuadas observações clínicas, e mediu-se o peso corporal e consumo de alimento. No final do período programado do estudo (15 ° dia), os animais foram mortos e examinados *post mortem*. Amostras de sangue do coração foram retiradas para avaliação da patologia clínica, assim como selecionou-se e pesou-se órgãos e tecidos específicos que foram retirados para exame histopatológico subsequente.

A administração de 1250mg de Vip3Aa20/kg de peso corporal a camundongos não produziu efeitos adversos que poderiam ser considerados como relacionados à Vip3Aa20. Não houve efeitos sobre a condição clínica, peso corporal, consumo de alimentos, patologia clínica, peso dos órgãos, patologia macroscópica e microscópica, que possam ser considerados relacionados com Vip3Aa20. Detalhes deste estudo estão apresentados no anexo 9.

Em outro estudo, a proteína PMI também não apresentou efeitos tóxicos agudos em camundongos. A proteína PMI produzida por via microbiana (PMI-0198) foi administrada em grupos de machos e fêmeas por via oral (gavage), em concentrações de

zero e 3030mg PMI/kg de peso corporal em dose única. A concentração de 3030mg PMI/kg foi utilizada por ser a maior dose fisicamente possível de ser administrada aos animais. Os animais foram observados por um período de 14 dias após a administração da dose. Efetuou-se observações clínicas, determinação de peso corporal e consumo de alimento durante todo o estudo. No final do período programado do estudo (15º dia), os animais foram mortos e examinados *post mortem*. Os órgãos selecionados foram pesados e tecidos específicos foram retirados para exame histopatológico subsequente.

Não houve mortalidade ou sinais clínicos adversos decorrentes de toxidez. A administração de 3030mg PMI/kg de peso corporal a camundongos não produziu efeitos adversos que fossem considerados como relacionados à PMI. Não houve efeito sobre peso corporal, peso dos órgãos ou patologia macroscópica, que pudessem ser considerados relacionados com a administração em dose única da proteína PMI.

3.4.2 Informações sobre alergenicidade de cada uma das proteínas expressas no milho MIR162

Com o objetivo de demonstrar que as proteínas presentes no milho MIR162, Vip3Aa20 e PMI, não apresentam potencial alergênico, foi realizado um estudo sobre a homologia entre a sequência destas proteínas e sequência de alergênicos conhecidos.

As seqüências de aminoácidos das proteínas Vip3Aa20 (789 aminoácidos; número de acesso ABG20429 no NCBI, 2006) e PMI (391 aminoácidos; número de acesso AAA24109 no NCBI, 2006) foram comparadas com o Banco de Dados de Alergênicos da Syngenta Biotechnology Inc. (SBI). Este banco de dados é atualizado anualmente com a pesquisa nas últimas atualizações dos bancos de dados públicos de proteínas, assim como nos bancos de dados SWISS-PROT e FARRP Alergênico, e entradas adicionais identificadas na literatura científica como alergênicos putativos, mas que não são encontradas nos bancos de dados públicos. Uma lista de entradas de seqüências atualizadas é compilada, no entanto, são removidas as seqüências redundantes às existentes no banco de dados e o conjunto exclusivo remanescente de seqüências atualizadas é acrescentado ao Banco de Dados de Alergênicos do SBI.

Para ambas as proteínas Vip3Aa20 e PMI, duas buscas diferentes foram conduzidas para comparar a sequência de aminoácidos com as sequências do Banco de Dados de Alergênicos do SBI. Em primeiro lugar, a homologia geral da sequência foi examinada comparando peptídeos sequenciais de 80 aminoácidos de cada proteína usando o algoritmo de busca FASTA (Pearson *et al.*, 1988). Cada 'janela' sucessiva de 80 aminoácidos foi sobreposta pela janela anterior por um aminoácido, de tal modo que cada peptídeo se sobrepunha ao anterior por 79 aminoácidos. (Por exemplo, o primeiro peptídeo continha os resíduos aminoácidos 1 – 80, o segundo continha os resíduos aminoácidos 2 – 81, etc.). Qualquer peptídeo de 80 aminoácidos da sequência de busca tendo identidade de aminoácidos maior que 35% com uma sequência alergênica foi definido como tendo homologia significativa com a sequência alergênica (FAO/WHO, 2001). Na segunda busca, a sequência de aminoácido das proteínas Vip3Aa20 e PMI foram verificadas para acertos de oito ou mais aminoácidos contíguos (Hileman *et al.*, 2002) usando um programa desenvolvido pela Syngenta que compara todas os possíveis peptídeos de oito aminoácidos contíguos entre a sequência de busca e as sequências alergênicas do banco de Dados de Alergênicos do SBI. O objetivo dessa análise foi verificar a existência de regiões curtas e locais de identidade de aminoácidos que possam indicar a presença de epitopos comuns de ligação de IgE.

Apesar do uso de seis, sete ou oito aminoácidos em estudos de homologia de alérgenos ser bastante discutido na literatura científica (Hileman *et al.*, 2002; Stadler *et al.*, 2003), ainda não há um consenso e, portanto, a comissão do Codex Alimentarius (2003), um grupo intergovernamental cuja missão é harmonizar padrões para testes de alimentos derivados da biotecnologia, recomenda que a extensão de número de aminoácidos utilizados seja definida de forma que se minimize o potencial de resultados falso-positivos e/ou falso-negativos. Stadler *et al.* (2003) demonstraram que a recomendação da FAO/WHO para o uso de seis aminoácidos em estudos de homologia redunda em resultados de baixa precisão, por outro lado, o uso de oito aminoácidos contíguos reduz resultados falsos-positivos sem afetar a sensibilidade do estudo.

Os resultados dessas análises não revelaram nenhuma homologia significativa de sequência entre qualquer peptídeo de 80 aminoácidos sequencial de Vip3Aa20 a qualquer entrada do Banco de Dados de Alergênicos do SBI. Adicionalmente, não

houve alinhamentos de oito ou mais aminoácidos idênticos contíguos entre Vip3Aa20 e qualquer proteína do Banco de Dados de Alergênicos do SBI (anexo 10).

Em relação à proteína PMI, os resultados dessas análises revelaram que não houve semelhança significativa entre quaisquer peptídeos sequenciais de 80 aminoácidos desta proteína e quaisquer entradas do Banco de Dados de Alergênicos do SBI. Uma busca em separado para homologia de sequência com oito aminoácidos ou mais revelou um único pareamento de oito aminoácidos entre PMI e um alergênico recentemente identificado, α -parvalbumina de *Rana sp.* Entretanto, investigações mais profundas, através da metodologia imunológica discriminatória mais sensível não resultou em reatividade cruzada entre PMI e o soro IgE do único indivíduo conhecido que demonstrou alergia mediada por IgE a essa α -parvalbumina específica. Para determinar se os anticorpos IgE presentes no soro desse paciente reconheceriam PMI, a Syngenta enviou duas amostras de proteína para os pesquisadores que identificaram esse alérgeno para análise de reatividade cruzada. O resultado da análise discriminatória com soro não demonstrou reatividade cruzada entre o soro IgE do paciente alérgico à proteína de rã e PMI, indicando que o soro IgE do paciente não reconhece qualquer porção da proteína PMI como um epitopo alergênico. Portanto, o baixo grau de identidade de sequência observado entre PMI e α -parvalbumina de *Rana species* CH2001 não é biologicamente relevante (anexo 11).

3.4.3 Aspectos composicionais de forragem e grãos do milho MIR162 e efeitos da ingestão em aves e mamíferos

3.4.3.1 Perfil composicional

Para o estudo de equivalência substancial do milho MIR162, foi realizado um perfil da composição química da forragem e do grão em comparação com sua versão isogênica não geneticamente modificada (GM) e outros híbridos comerciais não GM, a fim de verificar se os níveis e variação das características apresentavam-se dentro da amplitude conhecida para essas características (Food Standards Agency, 2001). Este estudo foi realizado no Brasil, em liberação planejada no meio ambiente aprovada pela

51


CTNBio (processo nº. 01200.003982/2005-11).

As avaliações foram realizadas em 2007, em delineamento de blocos casualizados com três repetições, nas Unidades de Pesquisa da Syngenta Seeds em Uberlândia-MG e Iuiutaba-MG, locais representativos das condições edafo-climáticas do Brasil. Neste estudo foram utilizados quatro tratamentos, sendo um híbrido de milho MIR162, seu correspondente isogênico não GM (convencional) e 2 híbridos comerciais não GM. Adubação, controle de plantas invasoras e demais atividades de manejo foram efetuados conforme procedimento normalmente utilizados nas condições de cultivo no país, sob sistema de plantio direto.

Para os grãos e forragem de milho foram avaliados os componentes composicionais, minerais, aminoácidos e ácidos graxos. As análises foram realizadas no laboratório TECAM Ltda (CQB 153/01). Para análise de forragem, em cada local, foram colhidas cinco plantas por repetição em cada tratamento, quando o material atingiu em torno de 30 e 40% de matéria seca. As plantas foram trituradas em picadeira e homogeneizadas para retirada de uma amostra de 500g por repetição/tratamento. Para análise de grãos, foram amostradas 15 espigas quando estes atingiram umidade variando de 18-24%. Após a secagem, as espigas foram debulhadas e homogeneizadas e destas amostras uma sub-amostra de 500g/repetição/tratamento foi enviada para análise. Foram obtidas as médias absolutas entre as repetições de cada tratamento por local, bem como a média geral entre locais.

As médias foram comparadas com a amplitude de variação definida pelo ILSI (2004) para cada parâmetro avaliado. Conforme o conceito de equivalência substancial da OECD (2002), se demonstrado que um novo alimento ou seu componente é substancialmente equivalente a um outro existente, ele pode ser tratado da mesma maneira quanto à segurança, considerando que a demonstração de equivalência não é uma avaliação de segurança em si, mas uma abordagem para comparar o novo alimento com seu equivalente convencional.

Os valores médios observados nas análises composicionais de grãos e forragem para os quatro tratamentos, bem como a amplitude de variação para os parâmetros estudados segundo ILSI (2004), é apresentado no anexo 12. Foi observado que tanto para forragem quanto para grãos, o milho MIR162 apresentou valores semelhantes ao

respectivo híbrido isogênico não GM (convencional), bem como aos híbridos comerciais convencionais, para todos os parâmetros avaliados. Todos os valores observados, independente do parâmetro avaliado e do tratamento, estavam dentro da amplitude descrita pelo International Life Science Institute (www.cropcomposition.org).

Análises composicionais do milho MIR162 também foram realizadas nos Estados Unidos em 2005. Amostras de forragem e grão do milho MIR162 e da respectiva versão isogênica não GM foram coletadas em diferentes locais em 2005. Os valores comparativos observados apresentaram-se dentro da faixa de variação relatada para milho na literatura (ILSI, 2006; OECD, 2002).

O conjunto das análises realizadas nestes estudos indica que nenhum padrão consistente emergiu, para sugerir que mudanças biológicas significativas na composição ou no valor nutritivo do grão e da forragem do milho MIR162 tenham ocorrido como resultado não intencional da transformação ou da expressão dos transgenes *vip3Aa20* e *manA*.

3.4.3.2 Ocorrência de micotoxinas no milho MIR162

Lavouras de milho estão sujeitas à infecção por fungos tóxicos no período pré-colheita. Os fungos mais encontrados são *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* (moniliforme) e *Diplodia* spp. A presença de micotoxinas em alimentos é alvo de regulamentação tendo em vista seus conhecidos efeitos carcinogênicos e tóxicos a seres humanos e animais. A quantidade máxima tolerada em milho contaminado com fumonisinas é cerca de 2ppm (FDA, 2001), enquanto que para aflatoxinas o limite de tolerância para a alimentação humana e animal é de 20ppb (Ministério da Saúde, 1998; FDA, 2000).

Com a adoção do uso de milho geneticamente modificado resistente a insetos (milho Bt) nos Estados Unidos e outros países, observou-se um efeito indireto, que é a redução da contaminação de grãos deste cereal por fungos que produzem micotoxinas. Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que colonizam cereais e um dos fatores que contribuem para a colonização por estes fungos é o dano causado por insetos nas espigas, além dos próprios insetos servirem como vetores para os esporos fúngicos

(Wu, 2007).

Com o objetivo de verificar a ocorrência de contaminação por micotoxinas no milho MIR162, foi realizado um estudo no Brasil, em liberação planejada no meio ambiente aprovada pela CTNBio (processo nº. 01200.003982/2005-11). As avaliações foram realizadas em experimento instalado em 2007, nas Unidades de Pesquisa da Syngenta Seeds em Uberlândia-MG e Ituiutaba-MG. Foram avaliados um híbrido de milho MIR162 e sua respectiva versão isogênica não GM. Adubação, controle de plantas invasoras e demais atividades de manejo foram realizadas conforme procedimentos normalmente utilizados nas condições de cultivo no país, sob sistema de plantio direto. Foram obtidos dados para percentagem de grãos ardidos, quebrados e furados. As análises de aflatoxinas e fumonisinas foram realizadas por cromatografia. Os resultados indicaram que em ambos os locais, a ocorrência de grãos danificados (ardidos, quebrados e furados) foi menor no milho MIR162 do que na sua versão não geneticamente modificada. Observou-se ainda uma relação positiva entre qualidade de grãos e redução dos níveis de fumonisina, na qual o milho MIR162, por apresentar menor incidência de grãos danificados, apresentou menor concentração desta micotoxina. Os resultados completos obtidos neste estudo estão apresentados no anexo 13.

3.4.3.3 Efeito da ingestão do milho MIR162 em mamíferos

Foi realizado um estudo de alimentação em ratos com ração contendo milho MIR162, visando avaliar o efeito dos grãos de milho GM sobre ratos machos e fêmeas quando incorporados à dieta, por um período de 90 dias consecutivos (anexo 14). Este estudo foi elaborado porque a rota primária da provável exposição potencial à proteína Vip3Aa20 ao homem e outros mamíferos, será através da dieta. Grupos de doze machos e doze fêmeas de ratos foram alimentados com dietas que continham grãos de milho MIR162 a 10.0% ou 41.5%p/p, por pelo menos 90 dias consecutivos, assim como um grupo controle alimentado com ração com as mesmas proporções de milho não geneticamente modificado. O nível baixo (10.0%p/p) representando o equivalente ao

consumo dietético humano de milho. O nível mais alto (41.5%p/p) foi selecionado como a dose máxima possível que não resultasse em 'desequilíbrio nutricional nos animais (Barnes, 2004). Durante todo o estudo foram realizadas observações clínicas, medição do pesos corporais e do consumo de alimento, além da realização de uma bateria de observações funcionais de testes e atividade motora na última semana do estudo (13ª semana). Em todos os animais realizou-se um exame oftalmoscópico pré-estudo e na 13ª semana. No fim do período programado, os animais foram sacrificados e examinados *post mortem*. Amostras de sangue do coração foram tomadas para patologia clínica, assim como os órgãos e tecidos selecionados foram pesados e coletados para exame histopatológico subsequente, respectivamente.

A incorporação de grãos de milho MIR162 nas dietas nas proporções de 10 ou 41.5% p/p e o fornecimento dessas dietas aos ratos por pelo menos 90 dias consecutivos não produziram efeitos no peso corporal, consumo de alimento, condições clínicas, patologia clínica, peso dos órgãos ou histopatologia, que fossem considerados como atribuíveis à inclusão de grãos de milho MIR162 na dieta. A saúde dos ratos foi satisfatória e não houve evidência de doença ou infecção que possam ter comprometido a interpretação dos resultados.

3.4.3.4 Efeito da ingestão do milho MIR162 em aves

Apesar de ser considerado um constituinte básico na alimentação humana, o uso principal do milho nos países produtores é na alimentação animal. No Brasil, a situação é a similar, isto é, 60 a 80% do milho produzido no país é utilizado na alimentação animal e 11% é consumido pela indústria, com finalidades diversas. A produção de rações para produção de frangos de corte utiliza grande parte da produção de milho no país, devido ao regime alimentar em sistema de confinamento, que visa atingir alto ganho de peso dos frangos em curto espaço de tempo.

Assim, considerando a importância do milho na produção de frangos de corte foi realizado um estudo para verificar se o uso de milho MIR162 em rações poderia produzir efeito adverso na sobrevivência, crescimento, conversão de energia e características de carcaça, quando comparado ao uso de milho não geneticamente

modificado (GM). Neste estudo, frangos machos e fêmeas foram alimentados por 44 dias com três tipos de ração (equivalente a três tratamentos): ração preparada com milho MIR162, ração preparada com milho isogênico não GM e ração preparada com milho comercial. O balanço de aminoácidos nos três tratamentos foi similar. No entanto, a percentagem de proteína bruta e energia metabolizável variaram. Tendo em vista que o crescimento de frangos é sensível ao conteúdo na dieta, foi efetuado um balanço nutricional visando diluir a diferença entre as rações utilizadas.

O crescimento das aves foi conforme o esperado e o peso corporal ao final do experimento não apresentou diferença estatística significativa, quando comparadas as aves que receberam ração contendo milho MIR162, com as aves correspondentes que receberam ração contendo milho na versão isogênica não GM. Para os três tratamentos usados no estudo, as aves macho apresentaram maior índice de conversão de energia, conforme esperado. No entanto, a taxa de conversão de energia entre aves alimentadas com ração de milho MIR162 e não GM, não apresentou diferença estatística significativa. ~~A sobrevivência dos animais ao longo do estudo foi conforme esperada, não sendo observado nenhum efeito na mortalidade devido a ingestão de ração contendo milho MIR162.~~ O consumo desta ração também não afetou a produção de carcaça, tanto em machos como em fêmeas. Ao final do estudo, amostras das rações utilizadas ao longo do experimento foram analisadas quanto a presença das proteínas Vip3Aa20 e PMI. Embora em concentrações menores do que no grão bruto utilizado na elaboração da ração (Vip3Aa20 a 72.59µg/g de peso fresco e PMI a 0.78µg/g de peso fresco), as proteínas apresentaram concentrações na dieta que variaram 12.26 a 17.59µg/g de peso fresco para Vip3Aa20 e 0.24 to 0.31µg/g de peso fresco para PMI. Detalhes deste estudo estão apresentados no anexo 15.

Resumindo, as aves alimentadas com ração contendo milho MIR162 não apresentaram alterações em sua sobrevivência, crescimento e eficiência da conversão de energia. A dieta contendo ração com milho MIR162 permitiu o crescimento rápido das aves, alta conversão de energia e baixos níveis de mortalidade, como esperado normalmente na criação de frangos de corte. Da mesma forma, com base em resultados obtidos em estudos do efeito da proteína Vip3A em frangos de corte, Brake *et al.* (2005) concluíram que a ingestão de milho geneticamente modificado que expressa esta

proteína não resulta em efeito deletério no desempenho da produção destas aves.

3.4.4 Níveis das proteínas Vip3Aa20 e PMI nos tecidos da planta de milho MIR162

Os níveis de concentração das proteínas Vip3Aa20 e PMI foram determinados em híbrido de milho MIR162 tropical, desenvolvido para cultivo nas condições edafo-climáticas brasileiras. As concentrações de Vip3Aa20 e PMI foram determinadas por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) em diferentes tecidos e em quatro estádios do desenvolvimento das plantas, cultivadas nas localidades de Uberlândia-MG e Ituiutaba-MG, sob a permissão da CTNBio processo nº. 01200.003982/2005-11. Tecidos do respectivo híbrido isogênico não GM (convencional) foram coletados concomitantemente e submetidos às mesmas análises quantitativas, visando confirmar a ausência de expressão das proteínas geneticamente modificadas e interferência de outras substâncias. Com base nestas análises, verificou-se que concentrações mensuráveis da proteína Vip3Aa20 foram detectadas em todos os tecidos analisados provenientes do híbrido de milho MIR162 tropical. Em geral, as concentrações de Vip3Aa20 foram semelhantes entre as amostras coletadas nos dois locais avaliados. A proteína PMI foi detectada em concentrações mensuráveis na maioria dos tecidos analisados. As concentrações de PMI foram semelhantes entre as amostras coletadas nos dois locais avaliados. Os valores médios de concentração das proteínas Vip3Aa20 e PMI nos dois locais, para os diferentes tecidos analisados, estão descritos nas tabelas 15 e 16 a seguir. Detalhes deste estudo estão apresentados no anexo 16.

8

Tabela 15. Concentração média de proteína Vip3Aa20 com base no peso seco nos diferentes tecidos provenientes das plantas MIR162, cultivados em dois locais no Brasil. Syngenta Seeds Ltda, 2007.

Tecido avaliado/Estádio de avaiiação	Valor médio de Vip3Aa20 (µg/g PS*)			
	Cartucho	Antese	Maturidade da semente	Senescência
Folha	96,66	153,98	20,67	4,34
Raiz	46,83	26,57	10,90	13,99
Parte interna do colmo	NA	43,38	15,40	NA
Grão	NA	NA	60,48	61,33
Estilo-estigma	NA	184,05	NA	NA
Pólen	NA	26,59	NA	NA
Planta inteira	93,85	76,18	36,09	25,0

*µg/g PS = Micrograma por grama de peso seco; NA = Não avaliado

Tabela 16. Concentração média da proteína PMI com base no peso seco nos diferentes tecidos provenientes das plantas MIR162, cultivados em dois locais no Brasil. Syngenta Seeds Ltda, 2007.

Tecido analisado/estádio de desenvolvimento	Valor médio de PMI (µg/g PS*)			
	Cartucho	Antese	Maturidade da semente	Senescência
Folha	4,80	7,06	0,27	<LD
Raiz	2,40	1,12	0,39	0,88
Parte interna do colmo	NA	2,22	0,53	NA
Grão	NA	NA	1,31	1,05
Estilo-estigma	NA	1,97	NA	NA
Pólen	NA	2,70	NA	NA
Planta inteira	3,68	3,57	0,99	0,89

*µg/g PS = Micrograma por grama de peso seco; NA = Não avaliado; <LD = Abaixo de limite de detecção

3.5 Estudos do efeito da proteína Vip3A sobre diversos organismos

O evento MIR162 contém o gene *vip3Aa20* o qual expressa uma proteína variante da proteína inseticida nativa Vip3Aa1 de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88, e apresenta propriedade inseticida contra certos lepidópteros-praga da cultura do milho. O

8

evento contém ainda o gene *manA*, utilizado como marcador de seleção ao longo do processo de transformação, que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI).

A Syngenta conduziu estudos para avaliar o efeito da proteína Vip3Aa em diversos organismos não-alvo e/ou indicadores. A exposição dos organismos não-alvo e/ou indicadores em estudos laboratoriais foi utilizada objetivando estimar o risco de exposição ao milho MIR162 sob condições de cultivo. Nos estudos conduzidos e reportados aqui, foram utilizadas variantes da proteína Vip3Aa em várias espécies representantes dos organismos que não são alvo (ONA) do efeito da exposição à Vip3Aa20 expressa no milho MIR162. Em cada estudo, uma espécie característica foi exposta a uma única concentração ou dose da Vip3Aa. Os resultados dos estudos não apresentaram nenhum efeito prejudicial à exposição foi observado em quaisquer destes estudos, além disso, nas espécies avaliadas a concentração da Vip3Aa utilizada pode ser interpretada como o valor mínimo de concentração de efeito não observável (NOEC).

3.5.1 Resumo das substâncias de teste

Dez espécies representantes de grupos de ONA potencialmente expostos à Vip3Aa20 expressa no milho MIR162 foram expostos à Vip3Aa em condições de laboratório. Diversas substâncias teste, contendo diferentes variantes da Vip3Aa, foram utilizadas para os estudos dos ONA. A origem da variante da Vip3Aa utilizada em cada estudo é resumida na Tabela 17. Para os estudos nos quais foi utilizada uma variante que não a Vip3Aa20 do milho MIR162, uma breve descrição da substância-teste é apresentada a seguir.

Tabela 17. Substâncias-teste utilizadas nos estudos de segurança ambiental do milho MIR162.

Substância-teste	Código da substância-teste	Fonte	[] de Vip3Aa	Espécie testada
Vip3Aa19	PHOPACHA-0199	Pólen de milho ICP-4	83.8µg/g	<i>Daphnia magna</i>
	PHOPACHA-0100		144.8µg/g	<i>Colleomegilla maculata</i> <i>Chrysoperla carnea</i>
	LPPACHA-0199	Folha de milho ICP-4	3640µg/g	<i>Eisenia foetida</i>
	LLPACHA-0100		86.7µg/g	<i>Folsomia candida</i>
	PFFKPACHA-0100	Grão de milho ICP-4	7.10µg/g	<i>Ictaluris punctatus</i>
Vip3Aa19 purificada	VIP3A-0104	<i>E. coli</i> recombinante	631mg/g	<i>Orius insidiosus</i> <i>Chrysoperla carnea</i>
	VIP3A-0204		897mg/g	<i>Coccinella septempunctata</i>
Vip3Aa20 purificada	VIP3A-0106	<i>E. coli</i> recombinante	840mg/g	<i>Apis mellifera</i> <i>Aleochara bilineata</i>

Substâncias-teste PHOPACHA-0199 e PHOPACHA-0100: trata-se de pólen coletado de plantas de linhagens de milho homozigóticas para o transgene *vip3Aa19*, expressa no milho ICP-4 (Pacha) e também no algodão (COT102). A diferença da concentração de proteína no pólen nas duas substâncias-testes (PHOPACHA-0199 e PHOPACHA-0100) é em decorrência da origem das plantas (tabela 17), ou seja, o pólen de plantas de linhagens de milho geneticamente modificado continha concentrações mais altas de proteína do que o pólen de plantas de híbridos, pois as plantas híbridas são heterozigóticas para o transgene. Portanto, o uso de pólen de plantas de linhagens endogâmicas representa uma exposição que excede a condição de máxima exposição potencial em relação a proteína Vip3A.

Substância-teste LPPACHA-0199: trata-se de proteína de folha de milho concentrada com Vip3Aa19 que foi preparada extraindo-se proteína de cinco folhas de plantas de híbridos de milho geneticamente modificado e concentrada por precipitação

com sulfato de amônio seguida de diálise para remoção dos sais, seguida de liofilização do material para produção de um fino pó de proteína.

Substância-teste LLPACHA-0100: trata-se de folhas de híbridos de milho expressando a proteína Vip3Aa19 que foram coletadas em plantas cultivadas no campo, reduzidas a pó em nitrogênio líquido e liofilizadas. O material resultante foi designado substância-teste LLPACHA-0100.

Substância-teste PFFKPACHA-0100: trata-se de grão coletado de plantas de linhagens de milho contendo o gene *vip3Aa19*, usados para preparar ração de peixes com finalidade experimental no estudo com bagres.

Substância-teste VIP3A-0104: trata-se de material obtido a partir de um sistema recombinante de *E. coli*, para uso em estudos de biossegurança. A caracterização desta substância-teste, que contém a proteína inseticida vegetativa expressa pelo gene *vip3Aa19*, foi realizada com base na sua pureza, integridade e bioatividade inseticida em larvas da lagarta do cartucho, *S. frugiperda*. Observou-se que VIP3A-0104 manteve a atividade inseticida contra a lagarta do cartucho. A pureza da substância-teste, determinada por análise densitométrica, foi de aproximadamente 63.1% de Vip3Aa19. Análises Western Blot indicaram peso molecular esperado de 89kDa.

Substância-teste VIP3A-0204: trata-se de material obtido a partir de um sistema recombinante de *E. coli*, para uso em estudos de biossegurança. A caracterização desta substância-teste, que contém a proteína inseticida vegetativa expressa pelo gene *vip3Aa19*, foi realizada com base na sua pureza, integridade e bioatividade inseticida em lagartas neonatas da lagarta do cartucho, *S. frugiperda*. Observou-se que VIP3A-0204 manteve a atividade inseticida contra larvas de lagarta do cartucho. A pureza da substância-teste é de aproximadamente 92% de Vip3Aa. Análises de Western Blot resultaram indicaram peso molecular de 89kDa, similar a Vip3Aa.

Substância-teste MIR162Vip3A-106: trata-se de material obtido a partir de um sistema recombinante de *E. coli* e que foi caracterizado visando determinar se a proteína Vip3Aa20 produzida por via microbiana era equivalente à proteína Vip3Aa20 expressa no milho MIR162. A identidade da proteína Vip3Aa20 na substância-teste MIR162VIP3A-0106 foi confirmada por testes de imunorreatividade, peso molecular, perfil de glicosilação e sequência de aminoácidos N-terminal. A concentração, pureza e

solubilidade da substância-teste também foram avaliadas. Não foi observada glicosilação da proteína Vip3Aa20 contida na substância-teste e a sequência de aminoácidos N-terminal observada apresentou-se como esperada. Na análise comparativa entre a proteína Vip3Aa20 contida na substância-teste MIR162VIP3A-0106 e a produzida no milho MIR162, obtiveram-se o tamanho esperado de aproximadamente 89kDa e reação imunológica cruzada com o anticorpo Vip3A para a proteína de ambas as fontes. Ambas apresentaram bioatividade similar a lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* (lagarta do cartucho). A análise de mapeamento de massa peptídica da proteína de Vip3Aa20 produzida no milho MIR162 e por via microbiana confirmou em 40 e 45%, respectivamente, a sequência de aminoácidos esperada e também confirmou a identidade de ambas as proteínas. Com base nestes resultados, a proteína Vip3Aa20 da substância-teste produzida por *E. coli* e pelo milho MIR162 são bioquimicamente e funcionalmente equivalentes, indicando assim que os resultados obtidos em estudos de biossegurança com base nesta substância-teste são aplicáveis à proteína Vip3Aa20 expressa no milho MIR162.

Em relação às substâncias-teste utilizadas para estudos de segurança ambiental, as propriedades funcionais e bioquímicas da proteína Vip3Aa20 foram comparadas à variante Vip3Aa19 em estudos de equivalência, tendo em vista a necessidade do uso desta última em estudos de biossegurança do milho MIR162. Estas proteínas diferem em apenas um aminoácido. Apresentam peso molecular semelhante, e ambas apresentam perfis de mobilidade eletroforética e imunoreatividade similares. Adicionalmente, nenhuma destas variantes é glicosilada (anexo 1).

A seleção das substâncias-teste e sua utilização nos estudos de biossegurança, foi definida com base na rota mais provável de exposição do organismo em teste (por exemplo, o representante aquático *Daphnia magna* foi exposto ao pólen porque este é o tecido de milho mais provável de entrar no ambiente aquático). Antes de ser usada em qualquer estudo, cada amostra da substância teste foi avaliada em uma espécie sensível a proteína inseticida (a saber, lagartas do cartucho) para confirmar a atividade inseticida. Adicionalmente, a concentração da proteína na substância-teste foi determinada por ELISA e por Western Blot. Após cada estudo, a atividade inseticida da substância-teste, sua concentração e integridade foram verificadas novamente para confirmar a

estabilidade durante o armazenamento.

Todos os estudos que usaram substâncias-teste provenientes de milho que expressa a proteína também incluíram milho não GM como controle, usando o mesmo veículo utilizado para a substância-teste. A maioria dos estudos também incluiu controles negativos que não eram expostos a nenhuma substância-teste ou de referência, mantidos sob as mesmas condições. Procedimentos apropriados foram empregados para manter a estabilidade dos materiais antes de exposição aos organismos-teste. Delineamentos apropriados (por exemplo, designação ao acaso de organismos aos grupos de teste) foram empregados para prevenir desvios no delineamento dos testes e organismos doentes ou com injúrias foram excluídos dos estudos. Os organismos de teste foram mantidos sob condições ambientais de laboratório apropriadas para a espécie.

3.5.2 Efeito da proteína Vip3A em *Daphnia magna*

A exposição potencial de organismos aquáticos poderia ocorrer através de pólen de milho MIR162 levado pelo vento para ambientes de água doce, tais como açudes, lagos, etc. Foi conduzido um estudo com renovação estática de 48 horas com pólen de uma linhagem de milho que expressa a proteína Vip3Aa19 e pólen de linhagem de milho isogênico não GM (controle) em *Daphnia magna* (pulga d'água), de acordo com a Diretriz Nº 72.2 do EPA-EUA. Estimou-se que a substância-teste continha cerca de 83.8µg de proteína/g (83.8ppm), medidos por ELISA. Os daphnídeos, com menos de 24 horas de vida no início do estudo, foram expostos a uma única concentração de teste ou controle de 120mg de pólen/litro de água. Este nível foi escolhido como a concentração máxima possível de teste, porque concentrações mais altas de pólen de milho controle foram associadas com reduções inaceitáveis no nível de oxigênio dissolvido nos recipientes de criação. Um grupo de controle negativo não recebeu tratamento na água, sendo tratados de forma similar. Cada grupo de teste ou controle consistiu em três repetições de recipientes com 10 daphnídeos cada, num total de 30 daphnídeos/grupo de tratamento. Nenhuma dieta suplementar foi fornecida aos

daphnídeos durante o período de exposição. Os daphnídeos foram expostos por 48 horas com renovação completa das suspensões de teste e controle após 24 horas. Cada recipiente de exposição foi aerado durante o período de exposição.

A sobrevivência foi de 100% em todas as repetições para os grupos de pólen de linhagem GM, de pólen de linhagem controle, e grupos de controle negativo. Todos os daphnídeos apresentaram comportamento normal durante o estudo, não sendo observadas nenhuma imobilização ou sinais subletais de toxidez. Não houve diferença na concentração de oxigênio dissolvido e no pH da água de criação entre os grupos teste e controle. Após 48 horas, a EC_{50} baseada na imobilização foi $>120\text{mg}$ de pólen/litro para ambos os grupos de pólen GM e controle.

3.5.3 Efeito da proteína Vip3A em joaninhas (*Coleomegilla maculata*)

O estudo foi conduzido visando avaliar a possibilidade de toxidez dietária crônica com a utilização da substância-teste PHOPACHA-0100 (pólen) em *Coleomegilla maculata* adultos, de acordo com a Diretriz N° 885.4340 do EPA-EUA OPPTS. *C. maculata* (Joaninha de manchas rosadas, também conhecida como joaninha de doze manchas), um predador generalista, é uma espécie apropriada para testes porque comumente ocorre em lavouras de milho e sabe-se que esta espécie se alimenta de pólen de milho e de pólen de outras espécies de plantas. As joaninhas adultas, com 8 – 9 dias de idade no início do estudo, receberam por um período de 21 dias, pólen de linhagens de milho expressando a proteína Vip3Aa19 ou pólen de linhagens de milho controle misturados com uma dieta comercial para alimentar joaninhas, equivalente a 5% da dieta em peso. A concentração de Vip3Aa19 no pólen teste foi estimada por ELISA em $144.8\mu\text{g}$ de proteína/g de pólen. Para manter a estabilidade da proteína Vip3A na dieta, diariamente, pequenas alíquotas de dieta era fornecida às joaninhas, consistindo de uma mistura de pólen/dieta que foram preparadas e armazenadas por congelamento. Um grupo controle negativo recebeu apenas dieta, sem acréscimo de pólen. Um grupo controle positivo recebeu uma dieta contendo cerca de 50mg de Tiodicarb/kg de dieta. (O inseticida Tiodicarb é ativo primariamente por ingestão). Cada tratamento constou de três repetições de 25 joaninhas cada, em um total de 75 joaninhas por tratamento. Todos

os grupos tiveram acesso contínuo à água deionizada. No término do estudo de 21 dias, a sobrevivência média foi de 93% entre as joaninhas que receberam dietas contendo a substância-teste PHOPACHA-0100, 92% entre as que receberam pólen de linhagens de milho controle, e 97% entre as do grupo controle negativo que recebeu apenas a dieta. A diferença na sobrevivência das joaninhas nos grupos de tratamento e controle não foi estatisticamente significativa e a NOEC foi de pelo menos 7,24µg de Vip3Aa19/g da dieta (Teixeira, 2002a). Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na sobrevivência média das joaninhas, exceto na comparação quando comparou-se o grupo controle positivo do Tiodicarb, no qual as joaninhas não sobreviveram após 21 dias de exposição. No estudo, nenhum efeito adverso foi observado nas joaninhas que consumiram dietas contendo 5% pólen da substância-teste PHOPACHA-0100.

A concentração de Vip3Aa20 determinada em pólen de milho MIR162 (tabela 3 do anexo 16) foi de 16,89µg /g de peso fresco e, portanto a concentração da proteína à qual estes insetos foram expostos foi bastante representativa. Assim sendo, apesar do pólen usado nas dietas estar diluído, o fato das joaninhas terem sido expostas por um período de 21 dias no estudo, à uma concentração na dieta de proteína Vip3A semelhante a que encontrariam se sua dieta consistisse inteiramente de pólen fresco de híbridos de milho GM durante o período de exposição, pode-se inferir que o pólen de milho MIR162 não representa perigo para as joaninhas. *C. maculata* é um organismo generalista quanto ao hábito alimentar, e sob condições de campo não é provável que ocorra a exposição através da alimentação contínua somente com pólen de milho GM por 21 dias. A exposição ao pólen aplicadas neste estudo provavelmente excedem a exposição potencial ao pólen de híbridos de milho GM a outros coccinelídeos benéficos, mesmo sabendo que *C. maculata* consome mais pólen de milho do que outras espécies de coccinelídeos.

3.5.4 Efeitos da Vip3A em crisopas (*Chrysoperla carnea*)

Os estudos de segurança ambiental foram realizados em crisopas em fase adulta e larval.

3.5.4.1 Efeitos da Vip3A em crisopas (*Chrysoperla carnea*) adultas

Conduziu-se um estudo para avaliar a toxidez de pólen de linhagens de milho que expressam a proteína Vip3Aa19 a *Chrysoperla carnea* (crisopídeos) adultos, de acordo com a diretriz Nº 885.4340 do US EPA OPPTS. *C. carnea*, um inseto benéfico, é uma espécie apropriada para testes porque ocorre comumente nos campos de milho. Além disso, sabe-se que os adultos se alimentam de pólen de milho, de outros pólenes, néctars e exudados de insetos. Os crisopídeos adultos apresentavam 2 – 4 dias de idade no início do estudo. Os grupos de crisopídeos receberam a substância-teste PHOPACHA-0100, por um período de 13 dias ou uma dieta contendo substituto de pólen na proporção de 15% da dieta em peso fresco. A concentração da proteína foi estimada por ELISA em cerca de 144.8µg de proteína Vip3Aa19/g de pólen. Para manter a estabilidade da proteína na dieta, os crisopídeos receberam diariamente dieta fresca. A dieta fornecida era proveniente de misturas de pólen/dieta que haviam sido preparadas e armazenadas por congelamento em pequenas alíquotas. Um grupo controle negativo recebeu dieta suplementada com 15% BEE-PRO® substituto de pólen no lugar de 15% de pólen de milho na dieta de outros grupos de teste. Um grupo controle positivo recebeu 100 – 500 ppm de Tiodicarb/kg de dieta. Cada tratamento constou de três repetições de 25 crisopídeos cada, num total de 75 crisopídeos por tratamento. Todos os grupos tinham acesso contínuo à água deionizada. Ovos produzidos durante o estudo foram regularmente removidos dos recipientes de criação.

Ao término do estudo que foi de 13 dias, a sobrevivência média foi 99% entre os crisopídeos que receberam dietas contendo a substância-teste, 97% entre aqueles que receberam dietas contendo pólen de linhagens de milho controle, e 99% no grupo controle negativo que recebeu dieta suplementada com substituto de pólen em vez de pólen de milho. Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as médias de sobrevivência foi observada, exceto na comparação com o grupo controle positivo de Tiodicarb, no qual a sobrevivência média foi de 45%. Foram coletados ovos em todos os recipientes das repetições para todos os tratamentos durante o estudo até o término do

teste. Antes do término do experimento em todos os recipientes de criação as formas jovens estavam se alimentando ativamente. Os ovos eclodiram e as formas jovens se alimentaram com a substância-teste.

Nenhum efeito adverso foi observado nos crisopídeos adultos que consumiram as dietas contendo 15% da substância-teste ou pólen de linhagem de milho controle por 13 dias. A diferença na sobrevivência entre os grupos de controle e tratamento não foi estatisticamente significativa, e a NOEC foi considerada como sendo de, no mínimo, 21,7µg de Vip3Aa19/g da dieta (Teixeira, 2002b).

A concentração de Vip3Aa20 observadas em pólen de milho MIR162 (tabela 3 do anexo 16) foi de 16,89µg/g de peso fresco, indicando que a concentração da proteína à qual estes insetos foram expostos foi bastante representativa. Apesar da 'diluição' da substância-teste na dieta artificial, os crisopídeos foram expostos por 13 dias a cerca de 8 vezes a concentração na dieta de proteína Vip3Aa20 que estariam expostos se sua alimentação consistisse exclusivamente de pólen fresco de híbridos de milho MIR162. Além disso, pelo fato de *C. carnea* não se alimentar somente de pólen, é improvável que o cenário de alimentação contínua com pólen de milho MIR162 por 13 dias ocorra em condições de campo.

3.5.4.2 Efeitos da Vip3A em larvas da crisopa (*Chrysoperla carnea*)

As larvas das crisopas (*Chrysoperla carnea*) de dois a três dias também foram expostas à Vip3Aa19 através da substância-teste microbiana VIP3A-0104. A substância-teste foi dissolvida em 50mM de tampão de Tris-HCl (pH 9.5) e incorporada em uma dieta artificial baseada em carne a 7250µg de Vip3Aa19/g da dieta. O controle negativo foi tratado com dieta com apenas Tris-HCl. Os grupos de tratamento e controle foram alimentados diariamente por 30 dias ou até atingirem a fase adulta.

Após 30 dias, entre os grupos de tratamento e o controle negativo analisados não foi observada diferença estatisticamente significativa; entretanto, a mortalidade observada no controle foi superior ao critério padrão de validação (20%) (Vogt *et al.*, 2000); a mortalidade do controle permaneceu dentro do critério padrão de validação até o 21º dia. A Norma do OPPTS 885.4340 (conforme o EPA dos EUA, 1996) para os testes dos

Ed

pesticidas microbianos indica que os testes devem ser finalizados quando a mortalidade do controle exceder 20%; a mortalidade do controle ainda permanecia dentro dessa norma até o 14º dia. No 14º e 21º dia, as diferenças entre os grupos do controle negativo e de tratamento não foram estatisticamente significativas. Os 14º e 21º dia representam as fases do desenvolvimento da larva, e, portanto, os dados podem ser considerados como uma avaliação rigorosa da toxicidade da Vip3Aa19 nas crisopas. Estudos por ELISA, Western Blot e um bioensaio com lagarta da beterraba (*Spodoptera exigua*) demonstraram que a Vip3Aa19 estava presente na dieta na concentração nominal.

3.5.5 Efeitos da Vip3A em minhocas (*Eisenia foetida*)

Foi conduzido em laboratório um estudo de toxidez aguda de 14 dias examinando os efeitos da proteína Vip3A sobre minhocas. As minhocas foram colocadas em um meio de solo artificial definido no qual a proteína presente na folha do milho enriquecida com Vip3Aa19 (substância-teste LPPACHA-0199) ou proteína de folha de milho controle foi acrescentada em uma concentração de 1000mg de substância-teste ou controle/kg de solo (peso seco). Um grupo controle negativo foi exposto a solo artificial, sem o acréscimo de proteína de folha de milho. Estima-se que a substância-teste continha 0.36% de proteína Vip3Aa19 em peso, determinado por ELISA. Cada grupo de teste ou controle consistiu de quatro repetições contendo dez minhocas por repetição, em um total de 40 minhocas/ grupo de tratamento. No término do estudo após 14 dias, a sobrevivência das minhocas foi de 100% em todas as repetições expostas à substância-teste ou proteína de folha de milho controle, e nos grupos controle negativo. Nenhum comportamento anormal ou sinais de intoxicação ocorreu durante as observação semanais (7º e 14º dia) em qualquer dos grupos de teste. A análise do peso das minhocas dos grupos expostos à substância-teste ou controle, não apresentaram diferença estatística significativa antes ou depois da exposição durante os 14 dias do ensaio. A umidade do solo, pH e temperatura não eram diferentes entre os grupos tratados com a proteína de folha de milho de teste ou controle. Para verificação da sanidade das minhocas, bem como da sensibilidade esperada no delineamento experimental, foi conduzido um teste com um controle positivo de referência usando-se

Ed

cloroacetamida, um tóxico conhecido. Um bioensaio com lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), conduzido paralelamente, demonstrou que a Vip3Aa19 estava presente no solo tratado com o milho que expressa esta proteína.

3.5.6 Efeitos da Vip3A nos colêmbolos *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae)

Foi realizado em laboratório um estudo de sobrevivência crônica de 28 dias e reprodução em *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). Em condições de campo, *F. candida* se alimenta de fungos de solo associados com matéria vegetal em decomposição, e também podem consumir nematóides (Lee *et al.*, 1996). Para determinar os efeitos potenciais do milho MIR162 nesses organismos, colêmbolas juvenis foram expostas a dietas contendo a substância-teste LLPACHA-0100. Os colêmbolas foram cultivados em frascos com um substrato composto de uma mistura de massa de Paris, carvão ativado e água destilada (8:1:7; p/p/v). Grupos de controle negativo receberam dieta consistindo de levedo de cerveja umedecida até formar uma pasta com água destilada (1.5:1; p/v) e aplicado à superfície do substrato. Os grupos de teste receberam uma dieta consistindo de uma mistura igual de folhas de milho que expressa a proteína Vip3Aa19 liofilizadas e levedo de cerveja (1:1; p/p), misturados até formar uma pasta com água destilada (2.5ml de água/g de mistura de levedo e folha). O material de teste de proteína de folha continha aproximadamente 86.7µg de Vip3Aa19/g, em estimativa por ELISA. Com base no peso fresco, isso equivale a aproximadamente 13 vezes mais que as concentrações médias de Vip3Aa20 diretamente medidas em folhas senescentes de híbridos de milho MIR162 (tabela 4 do anexo 16).

Com base nessa determinação, a concentração na dieta-teste dos colêmbolas foi de aproximadamente 43,4ppm. Da mesma maneira, os grupos controle receberam dietas contendo a mesma proporção de folhas liofilizadas e pulverizadas de plantas de híbridos de milho isogênicos e não transgênicos. Grupos controle positivo receberam Tiodicarb a 500ppm na dieta; o Tiodicarb foi dissolvido em água destilada, que foi então misturada com levedo de cerveja na mesma proporção de água e levedo, como usado nas dietas teste. Foram realizados ensaios com quatro repetições por grupo de tratamento, com 10

colêmbolas juvenis (10 - 12 dias de idade) por repetição, num total de 40 colêmbolas por grupo. Diariamente foi acrescentada dieta fresca contendo a mistura apropriada de teste ou controle, nas mesmas concentrações. Quando necessário, água destilada foi adicionada à superfície do substrato para manter umidade suficiente.

Após 28 dias de exposição, a sobrevivência média entre os colêmbolas adultos (que haviam amadurecido a partir das formas juvenis) foi de $80 \pm 2.4\%$ no grupo de controle negativo, $83 \pm 1.5\%$ no grupo de teste com a substância-teste, e $83 \pm 1.5\%$ no grupo de milho controle; estas diferenças entre taxas de sobrevivência não foram estatisticamente significativas. A sobrevivência média no grupo de controle positivo foi de $0.3 \pm 0.5\%$ e é significativamente menor, estatisticamente, que cada uma dos outros três grupos. O número médio de colêmbolas juvenis recuperados (resultantes de ovos produzidos pelos juvenis originais por partenogênese) foi de 218.5 ± 146.2 no grupo de controle negativo, 416.5 ± 117.0 no grupo que recebeu a substância-teste, e 533.0 ± 11.1 no grupo de milho controle. A reprodução não foi estatisticamente diferente entre os grupos que receberam a substância-teste e controle negativo. Entretanto, a reprodução em ambos os grupos que receberam material de folhas de milho foi significativamente maior, estatisticamente, que no grupo controle negativo, possivelmente devido a aumento de nutrientes na dieta pela adição de folhas de milho. O número médio de juvenis recuperados no grupo de controle positivo de Tiodicarb foi de 3.8 ± 4.5 , e significativamente mais baixo, estatisticamente, que o dos outros três grupos de tratamento. A proteína Vip3Aa19 não teve impacto detectável na sobrevivência ou na reprodução dos colêmbolas após 28 dias de exposição contínua.

3.5.7 Efeitos da Vip3A em bagres (*Ictalurus punctatus*)

Uma dieta comercial de peixes foi formulada usando-se componentes-padrão de rações e a substância-teste FFKPACHA-0100. A substância-teste representava 50% da dieta de teste em peso; esta porcentagem era cerca de 25% mais alta que a proporção de grãos de milho que seria tipicamente incluída numa ração para bagre. Durante a preparação da ração de peixes, em vez de permitir a extrusão e peletização da ração

misturada usando-se métodos comerciais de produção típicos, de larga escala que geram calor de aproximadamente 66 - 138°C, optou-se por peletizar a ração usando-se uma breve exposição a calor relativamente leve (aprox. 50 - 55°C). Essa “peletização a frio” serviu para minimizar a degradação de Vip3Aa19. A ração de peixes controle foi preparada da mesma maneira, usando-se grãos de uma linhagem de milho que era isogênica à linhagem que originou a substância-teste. Estimou-se que a ração de teste continha, medido por ELISA, cerca de 7.1µg de Vip3Aa19/g de ração.

O estudo de 30 dias com bagres, espécie de água doce comumente utilizada para testes com estes fins, foi conduzido de acordo com a diretriz ASTM E 729-88 e a diretriz Nº 885.4200 dos EUA, especificamente com base no Guia de Testes de Pesticidas Microbianos do EPA. Três repetições, constando de aquários repetidos foram estabelecidos para cada um dos dois tipos de ração. Cada aquário continha 10 peixes, num total de 30 peixes por tipo de ração. No início do estudo, determinou-se o peso dos peixes, tanto no grupo da dieta contendo a substância-teste, quanto do grupo da dieta controle que foi de aproximadamente 1.8g/peixe (média individual em peso úmido dos peixes). A taxa de fluxo da água do aquário consistiu de seis renovações nos tanques por dia. A ração foi fornecida três vezes ao dia, numa proporção que correspondia a 6% do total da biomassa diária de cada aquário. No 15º dia do teste, todos os peixes foram pesados novamente e a quantidade de ração ajustada para o novo total de biomassa por aquário. Durante o estudo de alimentação, a água dos aquários não apresentou alteração do pH medido, da concentração de oxigênio dissolvido, nem da temperatura nos aquários, pelo uso da ração de peixes contendo a substância-teste ou da ração de milho controle, permanecendo dentro de amplitudes aceitáveis para a sobrevivência do bagre. Após 30 dias, não houve diferenças estatisticamente significativas no aumento da média do peso úmido para os bagres em ambos os grupos de dieta; o ganho de peso foi de 1.5g/peixe. Nenhuma anormalidade foi observada entre os bagres durante o estudo, com exceção de um peixe em uma repetição do grupo de milho controle, que morreu no último dia do estudo.

Ed

3.5.8 Efeitos da Vip3A no predador Orius (*Orius insidiosus*)

O segundo instar do *Orius insidiosus* foi exposto à Vip3Aa19 por meio da substância-teste VIP3A-0104. A substância-teste foi dissolvida em 50mM de tampão de Tris-HCl (pH 9.5) e incorporada em uma dieta artificial contendo fígado e 7250µg de Vip3Aa19/g na dieta, enquanto que a dieta do controle negativo foi tratada com Tris-HCl apenas. Diariamente os grupos de tratamento e controle foram administrados com uma dieta fresca por um período de 21 dias ou até que se tornarem adultos. A diferença na sobrevivência entre os grupos de tratamento e controle não foi estatisticamente significativa. Concomitantemente, demonstrou-se, através de ELISA, Western Blot e bioensaios com a lagarta da beterraba (*S. exigua*), que a Vip3Aa19 estava presente na dieta sob concentração mencionada.

3.5.9 Efeitos da Vip3Aa19 em joaninhas (*Coccinella septempunctata*)

Joaninhas adultas (*Coccinella septempunctata*) de três a sete dias foram expostas à Vip3Aa19 por meio da substância-teste VIP3A-0204. A substância-teste foi dissolvida em 50mM do tampão de Tris-HCl (pH 9.5) antes de ser adicionada a dieta de 50% de sucrose e 7250µg de Vip3Aa19/g da dieta. A dieta do controle negativo compreendia apenas a sucrose. Diariamente os grupos de tratamento e controle foram alimentados com dieta fresca. A diferença na sobrevivência entre os grupos de tratamento e controle não foi estatisticamente significativa.

3.5.10 Efeitos da Vip3Aa20 em abelhas (*Apis mellifera*)

Neste ensaio, as abelhas (*Apis mellifera*) foram expostas à Vip3Aa20 por meio da substância-teste MIR162VIP3A-0106 segundo protocolo proposto por Oomen *et al.* (1992). A substância-teste foi dissolvida em 50 mM do tampão de Tris-HCl (pH 9.5) e adicionada à dieta de 50% de solução de sucrose sob concentrações de 50, 200 e 500µg

Original

de Vip3Aa20/g da dieta; essas concentrações representavam aproximadamente 1,4 e 10 vezes a concentração da Vip3Aa20 no pólen do MIR162. O controle negativo era alimentado com dieta de 50% da solução de sucrose em 50 mM do tampão de Tris-HCl. As abelhas-operárias coletaram soluções de sucrose e alimentaram a prole. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência, após 24 dias entre a prole nas colméias expostas à dieta tratada com MIR162VIP3A-0106 e a prole nas colméias expostas à dieta do controle negativo em qualquer estágio de desenvolvimento. Detalhes deste estudo estão apresentados no anexo 17.

3.5.11 Efeitos da Vip3Aa20 em besouros esfalinídeos (*Aleochara bilineata*)

Os besouros esfalinídeos adultos (*Aleochara bilineata*) foram expostos à Vip3Aa20 por meio da substância-teste MIR162VIP3A-0106 segundo o protocolo de Grimm *et al.* (2000). O grupo de tratamento foi alimentado com uma dieta com carne que continha 595,2µg de MIR162VIP3A-0106/g na dieta. O grupo de controle negativo foi alimentado com dieta tratada com tampão utilizado para dissolver a MIR162VIP3A-0106. Diariamente foi fornecida dieta fresca. Após 35 dias, os besouros puderam viver como parasita na pupa da mosca da cebola (*Delia antiqua*). O número da prole adulta dos besouros expostos às dietas teste foi monitorado até a emergência média de 2 besouros por dia. O número de besouros que emergiram do grupo tratado com a substância-teste não foi estatisticamente diferente daquele do grupo de controle. Além disso, através de bioensaios com a lagarta do cartucho (*S. frugiperda*), ELISA, e Western blot demonstrou-se que a Vip3Aa20 estava presente na dieta na concentração determinada.

3.5.12 Resumo das margens de exposição

As espécies utilizadas nos estudos em ONA foram expostas a uma variedade de substâncias-teste, sendo que as variantes e concentrações da Vip3Aa estão apresentadas

Ed 6

na Tabela 17. Esses estudos são aplicáveis à segurança ambiental do milho MIR162, devido à similaridade da Vip3Aa da substância-teste e a Vip3Aa20 presente no milho MIR162. Além disso, foi demonstrado por Graser *et al.*, (2006) a equivalência bioquímica e funcional da Vip3Aa19 e Vip3Aa20 (anexo 1). As proteínas mencionadas, possuem o mesmo peso molecular estimado que é de aproximadamente 89kDa e reagem imunologicamente com o mesmo anticorpo anti-Vip3Aa, conforme demonstrado pela análise de Western Blot. Não há evidência da glicosilação pós-translacional da Vip3Aa19 ou Vip3Aa20 produzida a partir do milho MIR162 ou por microrganismo. A bioatividade da Vip3Aa20 do milho MIR162 e Vip3Aa19 produzidas na *E. coli* recombinante é similar, com valores LC_{50} comparáveis em estudos com a lagarta do cartucho (*S. frugiperda*). Corroborando com o que foi acima descrito, Privalle (2002b) demonstrou a equivalência da proteína obtidas por via microbiana bem como do milho geneticamente modificado.

Não foram observados efeitos adversos em nenhum dos estudos conduzidos onde ocorreu a exposição de diversos ONA à Vip3Aa. Além disso, a concentração da Vip3A nos estudos foi considerada suficiente para atingir as margens de exposição dos organismos não-alvo estudados.

A comparação dos dados de exposição e dos riscos corrobora a hipótese de que a Vip3Aa20 não é prejudicial aos ONA nas concentrações prováveis que resultem do cultivo do MIR162, e apresenta evidência de que a Vip3Aa20 no milho MIR162 não terá efeitos prejudiciais sobre as populações dos ONA potencialmente expostos.

3.5.13 Avaliação da influência do milho MIR162 sobre a comunidade de insetos em ambientes do Brasil

Foi realizado no Brasil em 2007, um estudo visando avaliar a influência do milho geneticamente modificado (GM) sobre a comunidade de insetos para verificar a possibilidade de interferência destas plantas sobre as pragas primárias de solo e parte aérea e sobre as pragas secundárias (Processo nº 01200.003982/2005-11 e sob licença de coleta expedida pelo IBAMA nº 24/07 de 01/02/2007). Este estudo consistiu na

Ed

comparação do milho MIR162 e seu híbrido isogênico. Os experimentos foram conduzidos na Unidade de Pesquisa da Syngenta Seeds em Uberlândia/MG e na Unidade de Apoio a Pesquisa em Ituiutaba/MG (CQB 001/96). Cada área consistiu em uma parcela de milho híbrido MIR 162, milho híbrido Bt 11 e outra de milho híbrido não GM isogênico aos híbridos Bt11 e ao MIR 162. O manejo da cultura foi realizado seguindo as recomendações técnicas de cultivo de milho. Além disso, devido às características do ensaio adotou-se delineamento experimental inteiramente ao acaso. Os dados coletados foram submetidos a testes estatísticos para verificação de homocedasticidade e independência dos erros experimentais. Após avaliar os resultados obtidos, definiu-se as análises estatísticas, paramétrica ou não, mais adequadas. Paralelamente foram aplicadas análises faunísticas e análises de agrupamentos aos dados de coleta.

Neste estudo, a amostragem foi realizada quinzenalmente a partir de 3 dias da emergência do milho em 10 pontos escolhidos ao acaso, com base no programa de amostragem de Lasley *et al.* (1986). Em cada ponto de amostragem foram utilizadas as seguintes armadilhas: luminosa, alçapão, bandeja, cartão adesivo e rede de varredura. Além da coleta de insetos por meio das armadilhas, foram realizadas avaliações nas plantas de milho nas áreas experimentais. Esta avaliação foi efetuada quinzenalmente em dez (10) plantas e/ou espigas em cada ponto de amostragem, de acordo com o estágio fenológico da cultura. Nesta avaliação foi analisada a quantidade e a presença do inimigo natural *Doru luteipes* (tesourinhas). Adicionalmente, foram realizadas coletas de solo nos tratamentos usados em cada uma das unidades, tanto na época de plantio quanto na época da colheita do milho. Em cada tratamento foram coletadas 10 amostras de solo na camada de 0-20 cm. Também foram anotados os dados climáticos de temperatura, precipitação e umidade.

Todos os insetos coletados foram transportados em frascos devidamente etiquetados para o laboratório (UniCEUB – Brasília/DF), onde foi realizada a triagem do material, ou seja, os insetos foram separados, contados, montados, etiquetados e depositados em uma coleção. A identificação dos espécimes foi procedida em nível de gênero e/ou espécie ou de morfoespécie, por meio de dados da literatura científica de cada grupo de organismo, por comparação com espécimes de museu (Coleções

Científicas) ou por especialistas. Após a identificação, foi realizada uma análise faunística para selecionar as espécies de insetos predominantes. A entomofauna foi medida por meio do cálculo dos índices de constância, dominância, abundância e frequência, sendo que a constância representa a % de espécies que estão presentes nos levantamentos. A dominância é definida como a ação exercida pelos organismos dominantes de uma comunidade e a abundância refere-se ao número de indivíduos por unidade de superfície ou volume e varia no espaço e no tempo. Já a frequência é a porcentagem de indivíduos de uma espécie em relação ao total de indivíduos. A diversidade de espécies nas áreas experimentais foi analisada por meio da sua riqueza (número total de espécies em cada área) e pela equitabilidade (como a abundância de espécies está distribuída entre as espécies). Para a delimitação das comunidades foi calculado o índice de similaridade (I) e a porcentagem de similaridade (%S). O índice de similaridade indica a semelhança entre duas comunidades em termos de composição de espécies que foi calculado pelo método proposto por Mountford citado por Silveira Neto *et al.* (1976). A porcentagem de similaridade foi calculada segundo Southwood (1971).

Nas condições em que foram realizados os experimentos em Uberlândia/MG e Ituiutaba/MG em 2007 e com as armadilhas e análises utilizadas pode-se concluir que o milho geneticamente modificado MIR 162 não apresenta efeito adverso sobre a comunidade de insetos ou sobre o predador *Doru luteipes* ou artrópodes de solo. O relato deste estudo está apresentado no anexo 18 deste processo.

3.5.14 Degradação da proteína Vip3A em solos do Brasil

Foi realizado um estudo sobre a degradação de Vip em solos brasileiros e norte-americanos, a fim de verificar o período de duração da atividade biológica da proteína.

Para este estudo foram coletados solos de diferentes regiões do Brasil, representando os diferentes tipos encontrados no país: Uberlândia-MG (latossolo vermelho-amarelo argiloso-arenoso), Cascavel-PR (podzólico vermelho-amarelo) e Matão-SP (podzólico vermelho-amarelo). Além destes, foi incluído no estudo um solo proveniente de Illinois-EUA e um solo artificial com propriedades correspondentes aos

sugeridos pela norma da OECD para testes de toxicidade em organismos de solo (OECD, 1984). Os quatro solos naturais apresentaram textura, pH, conteúdo de argila, capacidade de troca catiônica e biomassa diversas, confirmando que estes solos utilizados foram representativos da diversidade de solos agricultáveis (anexo 19).

Nestes solos, incorporou-se a proteína Vip3A em concentrações de 16mg e 4mg/g de peso seco, representando uma proporção bastante elevada em relação ao nível de proteína que se espera ser incorporada ao solo em decorrência do cultivo do milho MIR162. A proteína utilizada foi extraída do milho geneticamente modificado que expressa a variante Vip3Aa19, que difere da proteína Vip3Aa20 do milho MIR162 em um aminoácido na posição 129. Esta diferença não interfere na especificidade da toxina, já que este aminoácido é perdido durante a fase proteolítica no meio intestinal do inseto.

Definiu-se a meia-vida da proteína no solo com base na mortalidade do lepidóptero *Agrotis ipsilon*, quando exposto aos solos contendo a proteína. Observou-se neste estudo, um rápido declínio em todos os tipos de solos testados, com base na mortalidade do inseto utilizado como indicador da atividade inseticida. Com base nestes resultados, a meia-vida da proteína, ou seja, o tempo necessário para dissipação de 50% da sua atividade biológica, variou de 6.0 a 12.6 dias entre os diferentes solos nas diferentes concentrações testadas. No solo proveniente de Cascavel-PR, representando o tipo podzólico vermelho-amarelo, a meia-vida foi estimada em 12.6 dias; no solo de Uberlândia-MG (latossolo vermelho-amarelo argiloso-arenoso), a meia-vida estimada foi de 6,6 dias e no solo proveniente de Matão-SP (podzólico vermelho-amarelo), a estimativa foi de 7 dias.

Estes resultados indicam que a proteína Vip3A é degradável em solos naturais e sendo assim, acredita-se que após o cultivo do milho MIR162 em solos brasileiros, os resíduos da proteína Vip3Aa20 serão degradados conforme o padrão observado no estudo.

3.6 Fluxo gênico e potencial de transferência horizontal de genes

3.6.1 Fluxo gênico para espécies selvagens

O milho (*Zea mays* ssp. *mays*) se hibridiza com um grupo de táxons

Ed/8

coletivamente chamados de teosinto. Os diversos tipos de teosinto são classificados como subespécies de *Zea mays*, considerando que outras espécies são referidas como espécies separadas de *Zea*. As espécies de teosinto são nativas da América Central e co-existiram com o milho cultivado por diversas centenas de anos. Elas permaneceram geneticamente distintas das variedades cultivadas, apesar da introgressão ocasional (EPA/ EUA, 2001; Baltazar *et al.*, 2005). As espécies de teosinto não são nativas do Brasil. Espécies de teosinto são cultivadas nos jardins botânicos dos Estados Unidos da América, porém o pólen, como o do milho, é pesado e de vida relativamente curta (Byrne *et al.*, 2003; Devos *et al.*, 2005).

As espécies dos gêneros *Tripsacum* são consideradas parentes próximas das espécies *Zea* e algumas teorias afirmam que uma espécie de *Tripsacum* pode ser descendente do milho doméstico através da hibridização e introgressão com teosinto (Poggio *et al.*, 2005). Os melhoristas de milho vêem o gênero *Tripsacum* como uma fonte potencial de genes úteis para o melhoramento que visa resistência à doença e tolerância à seca (OECD, 2003) e, portanto, um esforço substancial foi feito para obter e caracterizar os híbridos de milho X *Tripsacum*. Os híbridos entre o milho e as espécies de *Tripsacum* são difíceis de se obter fora do laboratório ou estufa e são sempre esterilizados. Apenas um registro existe de um híbrido polinizado entre *Zea* e *Tripsacum*, que envolvia espécies nativas na Guatemala. Após a consulta com melhoristas de gramíneas forrageiras, concluiu-se que a chance da introgressão natural dos genes do milho para *Tripsacum* era 'extremamente remota' e nenhuma outra espécie nos EUA continental produziria híbridos com o milho comercial (EPA, 2001).

As evidências obtidas ao longo dos estudos realizados indicam uma baixa probabilidade de transferência do gene *vip3Aa20* do milho MIR162 para espécies selvagens. *Tripsacum dactyloides* é uma planta difundida, porém não se hibridiza rapidamente com o milho, e a probabilidade do retrocruzamento ou da prole F₂ dos híbridos de *Tripsacum* X *Zea* a ser produzida no campo é considerada insignificante. Portanto, não se espera que a Vip3Aa20 se difunda a partir do cultivo de milho MIR162 e persista no ambiente como resultado do fluxo gênico.

Org

3.6.2 Potencial para a transferência horizontal de genes

A agência americana de meio-ambiente (EPA) realizou recentemente uma análise extensiva de informações relevantes sobre os possíveis riscos da transferência horizontal de gene (HGT) das plantas GM para os microrganismos do solo. Nessa reavaliação os estudos revisados não indicaram evidência para a HGT sob as condições de campo (EPA, 2001). Conner *et al.* (2003) também analisaram a literatura e descobriram poucos exemplos em que o HGT foi demonstrado de modo convincente, no entanto para essa ocorrência depende da homologia artificial, da alta sequência entre o transgene e o receptor potencial (De Vries *et al.*, 2001). Devido ao fato dos códons no *vip3Aa20* terem sido otimizados para expressão nas plantas, é muito provável que o gene apresente baixa homologia de sequência com os genes dos microrganismos de solo; consequentemente a probabilidade de HGT do *vip3Aa20* do milho MIR162 para os microrganismos de solo pode ser considerada improvável.

Caso houvesse a probabilidade da HGT ocorrer, a expressão da Vip3Aa20 é considerada improvável devido: (1) o uso do códon no milho MIR162 é otimizado para expressão nas plantas e não em microrganismos; e (2), o promotor da ubiquitina do milho é improvável de agir nos microrganismos. A probabilidade da difusão da Vip3Aa20 fora do cultivo do milho pela HGT, portanto pode ser considerada negligente.

4. MANEJO DE RESISTÊNCIA A INSETOS PARA O MILHO MIR162

O milho MIR162 expressa uma proteína inseticida derivada do *Bacillus thuringiensis* (Bt), denominada Vip3Aa20. Diferentemente da proteína Cry1Ab expressa em outros eventos comerciais de milho, a Vip3A é uma “proteína inseticida vegetativa” produzida durante o crescimento bacteriano vegetativo e é secretada como proteína solúvel no ambiente extracelular. Culturas do *Bacillus* produzem a Vip3A durante as fases de crescimento estacionário e de esporulação (Estruch *et al.* 1996; Warren *et al.*, 1996). A proteína Vip3A é altamente seletiva e extremamente eficaz contra certos lepidópteros-pragas economicamente importantes da cultura do milho, incluindo, mas não se limitando, às pragas *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *Helicoverpa zea*. O alto grau de especificidade dessa proteína é a base para sua segurança e sua utilidade como agente de controle de pragas alvo da cultura do milho.

O cultivo do milho MIR162 fornecerá benefícios substanciais aos agricultores e à sociedade. Esses benefícios incluem: (1) reduções no uso de inseticidas químicos (com redução da exposição dos agricultores ao defensivo químico, bem como dos organismos não-alvo); (2) aumento na produtividade, com consequente lucro para os agricultores; e (3) fonte de alimento de melhor qualidade e mais abundante, inclusive, para uso alimentar e em ração (Ward *et al.*, 2007). Devido aos benefícios agrícolas, econômicos e ambientais esperados com a utilização do milho MIR162 e visando manter e preservar a sua efetividade a longo prazo é importante efetuar o controle de modo apropriado do desenvolvimento da resistência de insetos (MRI). Para tanto, é importante considerar o potencial para o desenvolvimento da resistência dos insetos-alvo e o impacto sobre a agricultura, se houver resistência, que são essenciais para preservar a eficácia da tecnologia de milho derivados do Bt, como do milho MIR162.

4.1 Manejo da resistência

Os insetos são organismos incrivelmente adaptáveis e demonstraram capacidade de desenvolver resistência aos métodos que são empregadas para seu controle. De acordo com o Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC), a resistência é “uma

alteração hereditária na sensibilidade de uma população de praga devido a falha repetitiva de um produto em atingir o nível de controle esperado, quando utilizado conforme as recomendações no rótulo para determinado inseto-praga” (Anônimo, 2007b). No caso da utilização de defensivos químicos, uma forma de diminuir o desenvolvimento da resistência em uma população de pragas consiste em reduzir a exposição de toda a população ao inseticida. Um método típico para reduzir a exposição da população é permitir que uma parte da população não seja exposta ao inseticida. Com a introdução do milho geneticamente modificado, o DNA da planta é modificado para produzir uma proteína Bt inseticida, como o milho MIR162 que produz a proteína Vip3Aa20. A fim de reduzir a exposição de toda a população de artrópodes que ocorrem em áreas de cultivo de milho, particularmente com plantas geneticamente modificadas, uma parte da população de insetos-alvo deverá desenvolver-se nas plantas não geneticamente modificadas (GM). Essas plantas não GM servem como um refúgio, reduzindo a exposição das pragas-alvo, ao milho Bt. As plantas no refúgio permitem a sobrevivência de muitos insetos suscetíveis, em maior número que quaisquer insetos potencialmente resistentes que possam sobreviver nas áreas de milho Bt. A abundância dos insetos suscetíveis no refúgio reduz a probabilidade de que indivíduos resistentes se encontrem e acasalem. Ao diminuir a probabilidade dos indivíduos resistentes se encontrarem, espera-se que o período de tempo para desenvolvimento da resistência seja aumentado, caso a resistência ocorra, é que a utilização da tecnologia Bt como ferramenta no controle de pragas, esteja disponível aos agricultores por um período de tempo maior.

Os refúgios são recomendados com o objetivo de retardar o desenvolvimento da resistência nas espécies de insetos-alvo em países que cultivam e comercializam a tecnologia do milho GM. No Brasil, foi aceito para as tecnologias que expressam a proteína Cry1Ab, uma área de 10% de refúgio, ou seja, do total da área plantada, deve-se plantar esta área de milho não GM (convencional), visando minimizar o desenvolvimento da resistência. Em diversas localidades como na Austrália, nos Estados Unidos, na Argentina, Índia e China, visando retardar o desenvolvimento da resistência, a estratégia de refúgio foi adotada, variando entre refúgio estruturado (plantio de plantas não GM) e não estruturado (uso de hospedeiros alternativos). Especificamente nos





Estados Unidos e outros países (China e Índia), nas áreas de algodão o refúgio também foi adotado, mas seguindo um padrão de refúgio não estruturado. Nessas áreas, os hospedeiros alternativos, como por exemplo, ervas daninhas e gramíneas nativas, estão abundantemente presentes e proporcionam o refúgio necessário para manutenção dos insetos que são totalmente suscetíveis às proteínas Bt. De acordo com uma publicação do IRAC, “os dados demonstram que os hospedeiros alternativos desempenham importantes funções na redução da pressão de seleção para resistência” (Anônimo 2007A). Pragas primárias do milho, como por exemplo, *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis*, ocorrem em muitos outros hospedeiros além do milho. Uma lista completa das plantas hospedeiras de *Spodoptera frugiperda* foi descrita por Pogue (1995). Por outro lado, *D. saccharalis* sobrevive em muitas espécies gramíneas incluindo *Sorghum halepense*; *Paspalum* sp.; *Panicum* spp.; *Holcus* sp.; e *Adropogon* sp. e cana *Saccharum* sp. É importante ressaltar que após 10 anos de implementação de refúgio nos EUA, não foi observado o desenvolvimento de resistência em quaisquer espécies de praga em quaisquer cultivos de plantas Bt, independentemente da estratégia de refúgio – seja estruturada ou não, que tenha sido adotada visando retardar a resistência (Bater *et al.*, 2005).

4.2 Análise da resistência cruzada potencial da Vip3A e outras proteínas Bt

Além dos benefícios aos agricultores e à sociedade descritos anteriormente, o cultivo de milho MIR162 poderá aumentar a durabilidade de milho expressando a proteína Cry1Ab, uma vez que a Vip3A apresenta modo de ação diferente em relação às toxinas Cry testadas (Lee *et al.*, 2003 e 2006). As proteínas Bt controlam os insetos através de uma série similar de eventos. Primeiro, a proteína é solubilizada no intestino médio do inseto através de proteases em uma toxina ativa. Depois, a toxina ativa se liga aos receptores presentes no intestino médio do inseto. Após a ligação no intestino médio, a toxina é inserida na membrana do intestino, criando poros que ocasionam na morte do inseto. A resistência cruzada ocorre quando um inseto se torna resistente a uma proteína, e conseqüentemente, também é resistente a outra proteína. O grau ao qual sua resistência cruzada pode ocorrer depende enormemente do(s) mecanismo(s) de resistência que



caracterizam a resistência original e o grau pelos quais as duas proteínas são independentemente comprometidas por esses mecanismos. Algumas proteínas Cry possuem, pelo menos, um receptor em comum, e se um mecanismo de modificação do receptor for responsável pela resistência, um grau de resistência cruzada é sempre esperado (Van Rie *et al.*, 1989; Jurat-Fuentes *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2005).

Lee *et al.* (2003 e 2006) indicam que as proteínas Vip3A e Cry1Ab reconhecem diferentes receptores no intestino médio do inseto. Portanto, se um inseto desenvolve uma mutação genética em seu intestino médio que inibe ou previne a ligação da Cry1Ab e se torna resistente ao milho que expressa a proteína Cry1Ab, aquele inseto permaneceria suscetível ao milho MIR162, uma vez que as proteínas Cry1Ab e Vip3A não reconhecem os mesmos receptores no intestino médio. Para apoiar a pesquisa de Lee *et al.* (2003 e 2006), estudos adicionais foram realizados em colônias de inseto que são resistentes às proteínas Cry. Jackson *et al.* (2007) testaram três colônias de *Heliothis virescens* que são resistentes à Cry1Ac, assim como apresentam resistência cruzada à Cry1Ab, Cry2Aa e Cry1Fa, para determinarem se essas colônias apresentavam resistência cruzada à Vip3A. Essas cepas altamente resistentes variavam de 200-40.000 vezes a resistência às proteínas Cry. Em cada caso, os insetos resistentes às proteínas Cry não eram resistentes à Vip3A (Jackson *et al.*, no prelo), também testaram uma colônia de *Helicoverpa zea* que era 17 vezes resistente à Cry1Ac para a resistência cruzada à Vip3A. Os resultados desse estudo indicam que não há resistência cruzada nessas colônias. A introdução da Vip3A é uma nova ferramenta importante para o manejo da resistência, assim como representa uma nova estratégia adicional de controle de inseto para o manejo integrado de pragas (MIP).

4.3 Atividade do milho MIR162

4.3.1 Ensaios de diluição do tecido

Para investigar a atividade inseticida do milho MIR162 no controle de *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho) e *Helicoverpa zea* (lagarta da espiga),

08
Ed 1

foram conduzidos bioensaios utilizando tecidos liofilizados de plantas GM que expressam as proteínas Bt e tecidos das plantas não GM como controle. Ao diluir o tecido liofilizado na dieta artificial do inseto, é possível reduzir a exposição das lagartas e assim entender a intensidade da atividade inseticida das proteínas expressas pelo milho MIR162.

Lagartas neonatas de *S. frugiperda* foram alimentadas com tecido do milho modificado MIR162 liofilizado e diluído, pelo menos, 25 vezes. O milho MIR162 expressa a proteína inseticida na dose que elimina 100% das lagartas neonatas em 25 vezes a diluição do tecido da planta. O nível da Vip3Aa20 expressa pelas plantas de milho MIR162 excede uma dose necessária para eliminar todos os insetos suscetíveis por, pelo menos, 25 vezes, conferindo assim resistência funcionalmente recessiva. Portanto, é esperado que a resistência em qualquer população de *S. frugiperda* se desenvolva a uma taxa excessivamente baixa.

Em outro bioensaio, lagartas neonatas de *H. zea* foram alimentadas com tecido da planta de milho MIR162 liofilizado diluído em, pelo menos, 25 vezes. Mesmo diluído 25 vezes, a Vip3Aa20 expressa pelas plantas de milho MIR162 foi ativa no controle de *H. zea*. Assim sendo, para qualquer população de *H. zea* o desenvolvimento esperado da resistência também é considerado excessivamente baixo.

4.3.2 Ensaios em campo da eficácia do milho MIR162 sobre as pragas alvo

Para investigar a atividade inseticida do milho MIR162 no controle da *S. frugiperda* e *H. zea*, parcelas de campo foram avaliadas quanto ao dano causado por insetos-alvo. Os resultados confirmam a eficiência do evento MIR162 no controle das pragas estudadas (vide item 3.3 Avaliação agrônômica e de eficácia do milho MIR162).

Def

4.4. Recomendações sobre o refúgio para o milho MIR162

Visto que a proporção de 10% de refúgio estruturado foi aceito para o milho Bt que expressa a proteína Cry1Ab pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e que o milho MIR162 é também altamente eficaz no controle da *S. frugiperda*, 10% de refúgio estruturado com milho não GM será também eficaz no retardamento da resistência ao milho MIR162.

Recomendações para refúgio para o milho MIR162:

- As áreas de refúgio devem ser plantadas com milho não GM de maturidade similar e na data de plantio do milho MIR162.
- O refúgio deve ser 10% da área total.
- Tratamento químico:

As aplicações de inseticida não deverão ser feitas para o controle da *Diatraea saccharalis* nos refúgios.

5. PLANO DE MONITORAMENTO PARA O MILHO MIR162

Em atenção a Resolução Normativa 03 de 16 de Agosto de 2007, a CIBio da Syngenta Seeds Ltda apresenta o plano de monitoramento do milho MIR162 resistente a lepidópteros-praga da cultura de milho. Devido aos estudos de laboratório, casa-de-vegetação e sob condições de campo realizados pela Syngenta terem demonstrado que o milho MIR162 é similar ao milho convencional, o monitoramento visa atender ao Artigo 6º da Resolução Normativa supra mencionada, pois o milho MIR162 não apresenta potencial degradador do meio-ambiente ou riscos à saúde humana e/ou animal.

A execução técnica do monitoramento pós-comercialização será efetuada por equipe técnico científica da própria empresa e também por intermédio da contratação de serviços de instituições capacitadas a executá-lo de forma independente, incluindo especialistas nas diversas áreas como de entomologia, genética, fisiologia vegetal, microbiologia e de biossegurança. O monitoramento poderá ser executado em regiões representativas onde ocorre o cultivo de milho híbrido. Em cada região será efetuado o monitoramento de uma área com milho MIR162 e uma área com milho convencional. Os registros das informações obtidas ao longo do período de monitoramento serão mantidos e a disposição dos órgãos de fiscalização competentes, conforme disposto na Resolução Normativa 3, de 3/08/2007.

O monitoramento contemplará os seguintes parâmetros:

a. Monitoramento das populações de organismos não-alvo

Serão monitorados organismos benéficos (parasitóides e predadores), polinizadores, pragas secundárias e decompositores. Estes serão avaliados em áreas com milho MIR162 e milho convencional submetidos às práticas de manejo de milho comumente utilizadas no Brasil. Serão utilizadas armadilhas luminosas, cartões adesivos, rede entomológica, armadilha pitfall, além da contagem direta de artrópodes presentes nas plantas conforme Frizzas (2003) e Silveira Neto *et al.* (1995).

b. Monitoramento de insetos-alvo

- Quanto aos danos causados pelos insetos-alvo *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis*, o monitoramento será efetuado em área plantada com milho MIR162 e uma área com milho convencional. A metodologia usada é a recomendada pela literatura para as pragas mencionadas, conforme citado no item 3.3 deste processo (Avaliação agronômica e de eficácia do Milho MIR162). Adicionalmente, conforme apresentado no item 4 deste processo (Manejo de resistência a insetos para o milho MIR162), a Syngenta promoverá a realização de programa informação aos produtores sobre a tecnologia.

- Quanto à susceptibilidade de lagartas alvo a proteína Vip3Aa20, serão coletadas posturas dos insetos-alvo, em plantio de milho MIR162 (quando presentes) e milho convencional. Será determinada a percentagem de mortalidade e peso das lagartas em laboratório através de bioensaios com a incorporação da proteína Vip3Aa20 na dieta artificial conforme Marçon *et al.* (1999).

c. Monitoramento de proteínas residual no solo

O monitoramento consistirá na análise de extratos protéicos oriundos de amostras de solo de área de plantio com milho MIR162 e milho convencional. A proteína será detectada através de teste imunológico (ELISA) conforme Saxena *et al.* (2004).

d. Manutenção e divulgação de Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC) por meio de veículos de comunicação acessíveis e apropriados.

e. Realização de encontros/visitas técnicas, visando divulgar informações sobre a tecnologia, implantação de refúgio e monitoramento (ILSI, 2001).

Este plano de monitoramento é uma proposta inicial e poderá ser adequada após ou durante a decisão técnica favorável da CTNBio ao uso comercial, conforme disposto no Artigo 6º da Resolução Normativa supra



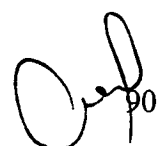
Ed
mencionada. Ainda, adequações poderão ser realizadas de acordo com possíveis
novas resoluções da CTNBio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25:3389-3402. Ed
- Anônimo. 2007a. **How much do natural refuges mitigate resistance risks.** Disponível em <http://www.irac-online.org/documents/refuges_resistance.pdf>.
- Anônimo. 2007b. **Resistance.** Disponível em < http://www.irac-online.org/documents/refuges_resistance.pdf >.
- AOSA. 2000. In **Tetrazolium Testing Handbook.** Peters, J. (ed.). Association of Official Seed Analysts, Lincoln, Nebraska.
- Baltazar, B. M.; Sánchez-Gonzales, J. J.; de la Cruz-Larios, L.; Schoper, J. B. 2005. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico. **Theoretical and Applied Genetics**, 110:519-526.
- Barb, A.W.; Williamson, J.D.; Pharr, D.M. 2002. **Selection for mannose-6-phosphate isomerase activity in tobacco NT1 cultures: Partial physiological and molecular characterization.** Direct unpublished submission to GenBank database; Accession no. AAN09933 (NCBI, 2003).
- Barnes, E. 2004. **CTL/PR1296/Regulatory/Report: Maize: 90 day whole food study in rats.**
- Bastos, E.1987. **Guia para o cultivo do milho.** São Paulo: Ícone, 190p.
- Bater, B.L.; Zhao, J. Z.; Roush, R.T.; Shelton, A.M. 2005. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, 23: 57-62.
- Beadle, G. M. 1977. **The mystery of maize.** Proc. 32nd American Corn and Sorghum Research Conference, 32:1-5.
- Beadle, G. M. 1978. Teosinte and the Origin of Maize. In: Walden, D. B. (ed.). **Maize Breeding and Genetics.** N.Y.: John Wiley and Sons, 8:113-141.
- Bianco, R. Pragas e seu controle. 1991. In: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, **A cultura do milho no Paraná.** Londrina, p.185-221 (IAPAR. Circular,29).
- Bojsen, K.; Donaldson, I.; Haldrup, A.; Joersbo, M.; Kreiberg, J. D.; Nielsen, J.; Okkels, F. T.1997. **Mannose or xylose based positive selection.** U.S. Patent No. 5,767,378.



- Brake, J.; Faust, M.; Stein, J. 2005. Evaluation of Transgenic Hybrid Corn (VIP3A) in Broiler Chickens. **Poultry Science** 84:503-512.
- Brandalizzi, V. 2005. Mercado de milho. In: Fancelli, A.L.; Dourado-Neto, D. (Eds.). **Milho: tecnologia & produção**. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, p.1-7.
- Byrne, P. F.; Fromherz, S. 2003. Can GM and non-GM crops coexist? Setting a precedent in Boulder County, Colorado, USA. **Food, Agriculture and Environment**, 1:258-261.
- Camargo, A. P. 1966. Viabilidade e limitações climáticas para a cultura do milho no Brasil. In: **Cultura e adubação do milho**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, p.225-247.
- Carvalho, R.P.L. 1970. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba: ESALQ, 170 p. (Tese de Doutorado).
- Cavalcanti, G.S. 1987. **Cultura de milho**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 38p.
- Chen, Z.J.; Zhu, L.H. 1989. Karyotype analysis of Lu-Dao, an indigenous weedy rice germoplasm found in Jiangshu, China. **Rice Genetics Newsletter**, 6:64-55.
- CODEX. 2003. **Report of the Fourth Session of the CODEX Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology**, Yokohama, Japan, Disponível em <<http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year=03>>.
- Conner, A. J.; Glare, T. R.; Nap, J-P. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. **The Plant Journal**, 33:19-46.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J; Bravo, A.; Dean, D.H. 2005. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em 20 de janeiro de 2005.
- Cruz, I.; Cunha, J.R.; Figueiredo, M.L.C. 2004. Avaliação de diferentes doses do inseticida Akito (betacypermetrina) sobre larvas de *S. frugiperda* e sobre os predadores *Doru luteipes* e *Chrysoperla externa*. In: **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 25, Cuiabá, MT. Resumos. Sete Lagoas: ABMS/ Embrapa Milho e Sorgo.
- Cruz, I.; Figueiredo, M.L.C.; Oliveira, A. C.; Vasconcelos, C.A. 1999. Damange of *Spodoptera Frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International**



Journal of Pest Management, London, 45: 293-296.

Davis, J.A.; Wu, X.H.; Wang, L.; DeRossi, C.; Westphal, V.; Wu, R., Alton, G.; Srikrishna, G.; Freeze, H. H. 2002. Molecular cloning, gene organization, and expression of mouse Mpi encoding phosphomannose isomerase. **Glycobiology**, 12:435-442.

De Vries, J.; Meier, P.; Wackernagel, W. 2001. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter sp.* by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. **FEMS Microbiology Letters** 195:211-215.

Deacon, A. M.; Ni, Y. S.; Coleman, W. G.; Jr & Ealick, S. E. 2000. The crystal structure of ADP-l-glycero-d-mannoheptose 6-epimerase: catalysis with a twist. **Structure**, 8:453-462.

Devos, Y.; D. Reheul; De Schrijver, A. 2005. The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. **Environmental Biosafety Research**, 4:71-87.

Duarte, J. de O. ;Garcia, J. C.; Mattoso, M. J. 2005. **Análise de custos de produção de milho transgênico x não transgênico**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 24 p. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 48).

Duarte, N.F. 2000. **Determinação do período de competição de plantas daninhas fundamentado nos estádios fenológicos da cultura do milho (*Zea mays* L.)**. 81p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Estruch, J.; Yu, C. G. 2001. **Plant pest control**. United States Patent No. 6,291,156; issued September 18.

Estruch, J.; Warren, G.; Mullins, M.; Nye, G.; Craig, J.; Koziel, M. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93:5389-5394.

Fancelli, A.L. 1990. Exigência climática e fenologia do milho. In: Fancelli, A.L. **Milho**. Piracicaba: ESALQ/USP-FEALQ, p.50-56.

Fancelli, A.L.; Dourado-Neto, D. 1996. Milho: fisiologia da produção. In: **Seminário sobre fisiologia da produção e manejo de água e de nutrientes na cultura do milho de alta produtividade**. Piracicaba. Anais... Piracicaba: ESALQ/USP/Potafos, p.8-21

91

- Fancelli, A.L.; Dourado-Neto, D. 2000. **Produção de Milho**. Guaíba: Agropecuária, 360p.
- Fancelli, A.L.; Dourado-Neto, D. 2001. **Milho: tecnologia e produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, 259p.
- FAO / WHO. 2001. **Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology**. Rome, Italy. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf> Acesso em 24 de Agosto de 2007.
- Fehr, W. R. 1991. **Principles of cultivars development**. Ames: Macmillan, 536 p.
- Food Standards Agency. 2001. **Statistically valid data to support applications for safety clearance of crop product under EC Regulation on Novel Foods and Novel Food Ingredients**, 258/97. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/science/ouradvisors/novelfood/acnfppapers/validnoveldata>>.
- Frizzas, M. R. 2003. **Efeito do milho geneticamente modificado MON 810 sobre a comunidade de insetos**, 192 p. (Tese de Doutorado) - ESALQ, Piracicaba.
- Galinat, W. C. 1977. The origin of corn. In: **Corn and corn improvement**. New York, Academic Press.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L; De Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramin, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. 2002. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba – SP: FEALQ, 902 p.
- Gassen, D. N. 1996. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 134p.
- Gassen, D.N. 1994. **Insetos associados à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 92p.
- Graser, G.; Stacy, C. 2006. **Caracterização da Proteína Vip3A Expressa no Milho Derivado do Evento MIR162 e Comparação com as Substâncias de Teste Vip3A Produzidas por Via Microbiana e Derivadas de Plantas**. Syngenta Seeds Biotechnology. Relatório SSB-017-06.
- Grimm, C.; Reber, B.; Barth, M.; Candolfi, M. P.; Drexler, A.; Maus, C.; Moreth, L.; Ufer, A.; Waltersdorfer, A. 2000. A test for evaluating the chronic effects of plant protection products on the rove beetle *Aleochara bilineata*. (Coleoptera: Staphylinidae) under laboratory and extended laboratory conditions In: Candolfi, M. P.; Blümel, S.; Forster, R.; Bakker, F. M.; Grimm, C.; Hassan, S. A.; Heimbach, U.; Mead-Briggs, M. A.; Reber,



R.; Schmuck, R.; Vogt, H. (Eds.), **Guidelines to Evaluate Side-effects of Plant Production Products to Non-target Arthropods**, IOBC, pp. 1-12. 

Grimsley, N.; Hohn, T.; Davies, J. W.; Hohn, B. 1987. Agrobacterium-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. **Nature**, 325:177-179.

Hernandez, C. S.; Ferre, J. 2005. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua*. **Applied environmental Microbiology**, 71:5627-5629.

Hileman, R. E.; Silvanovich, A.; Goodman, R. E.; Rice, E. A.; Holleschak, G.; Astwood, J. D.; Hefle, S. L. 2002. Bioinformatic methods of allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. **International Archives of Allergy Immunology**, 128: 280-291.

Hoekema, A.; Hirsch, P. R.; Hooykaas, P. J. J.; Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, 303:197-180.

ILSI. 2004. **Crop Composition Database Version 2.0**. International Life Sciences Institute. Acesso em: <<http://www.cropcomposition.org>>.

ILSI. 2006. **Crop composition database Version 3.0**. International Life Sciences Institute. Acesso em: <<http://www.cropcomposition.org>>.

Ishida, Y.; Saito, H.; Ohta, S.; Hiei, Y.; Komari, T.; Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology** 14:745-750.

Jackson, R.E.; Marcus, M.A.; Gould, F.; Bradley, J.R.; Van Duyn, J.W. 2007. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. **Journal of Economical Entomology**, 100: 180- 186.

James, C. 2006. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006**. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.

Joersbo, M.; Donaldson, I.; Kreiber, J.; Petersen, S. J.; Brunstedt, J.; Okkels, F.T. 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. **Molecular Breeding** 4:111-117.

Jurat-Fuentes, J. L.; Adang, M.J. 2001. Importance of Cry1 δ -endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens*. **Applied Environmental Microbiology**, 67: 323-329.

Kneidinger, B.; Graninger, M.; Puchberger, M.; Kosma, P.; Messner, P. 2002. Biosynthesis of nucleotide-activated dglycero-d-manno-heptose. **Journal of**

Biological Chemistry, 276: 20935-20944.

Lasley, S.E.; Barfield, C.S. 1986. **Programa Sampling (IFAS)**. University of Florida.

Lee, B.T.; Matheson, N.K. 1984. Phosphomannoisomerase and phosphoglucosomerase in seeds of *Cassia coluteoides* and some other legumes that synthesize galactomannan. **Phytochemistry**, 23, 983-987.

Lee, M.; F. Walters; H. Hart; N. Palekar; J. Chen. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, 69:4648-4657.

Lee, M.-K., Miles, P. and Chen, J.-S. 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochem. Biophysical Research Committee**, 339: 1043-1047.

Lee, Q.; Widden, P. 1996. *Folsomia candida*, a 'fungivorous' collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. **Soil Biology and Biochemistry** 28: 689-690.

Magalhães, P.C.; Paiva, E. 1993. Fisiologia da produção. In: Embrapa Milho e Sorgo. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. Brasília: Embrapa Milho e Sorgo, p.85-95.

Mangelsdorf, P. C. 1974. **Corn its origin, evolution and improvement**. Cambridge, Mass, USDA.

Mangelsdorf, P. C.; Mc Neish, R. S.; Galinat, W. C. 1964. Domestication of corn. **Science**, 143: 538-545.

Marcos-Filho, J. 2005. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p

Miles, J. S.; Guest, J. R. 1984. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. **Gene**, 32:41-48.

Negrotto, D.; Jolley, M.; Beer, S.; Wenck, A. R.; Hansen, G. 2000. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. **Plant Cell Reports**, 19:798-803.

OECD. 1984. **Guidelines for Testing of Chemicals**. Guideline 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test – Part I – The 24h EC50 Acute Immobilisation Test.



- OECD. 2002. Consensus document on the compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary metabolites. **Series on the Safety of Novel Foods and Feeds**, No. 6. OECD Environment Directorate. Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology. Paris, 42 pp. 
- OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). **Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology**, No. 27. OECD Environment, Health and Safety Publications. Paris, 49 pp.
- Oomen, P. A.; Ruijter, A. D.; Steen, Van Der J. 1992. **Method for honeybee brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides**. EPPO Bulletin, 22: 613-616.
- Paterniani, E.; Goodman, M.M. 1977. **Races of Maize in Brazil and Adjacent Areas**. Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo. México, D.F. México.
- Paterniani, E.; Campos, M. S. 2001. Melhoramento do milho. In: Borém, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, pp.491-499.
- Pearson, W. R.; Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 85:2444-2448.
- Poggio, L.; Gonzales, G.; Confalonieri, V.; Comas, C.; Naranjo, C. A. 2005. The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: evidences from classical and FISH-GISH cytogenetic analysis. **Cytogenetic and Genome Research**, 109:259-267.
- Pogue, M.G. 1995. **World Spodoptera Database (Lepidoptera: Noctuidae)**. Acesso em: <<http://www.sel.barc.usda.gov:591/spod/Spodoptera.html>>.
- Ponting, C. 2001. Issues in predicting protein function from sequence. **Briefings in Bioinformatics** 2:19-29.
- Privalle, L. 2002b. Phosphomannose Isomerase, a Novel Plant Selection System. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 964:129-138.
- Proudfoot, A. E. I.; Payton, M. A.; Wells, T. N. C. 1994a. Purification and characterization of fungal and mammalian phosphomannose isomerases. **Protein Chemistry**, 13:619-627.
- Proudfoot, A. E. I.; Turcatti, G.; Wells, T. N. C.; Payton, M. A.; Smith, D. J. 1994b. Eur. Purification, cDNA cloning and heterologous expression of human phosphomannose isomerase. **Journal of Biochemistry**, 219:415-423.

- Ritchie, S.W.; Hodges, T.K. 1993. Cell culture and regeneration of transgenic plants. . In: KUNG, S.; WU, R. (Eds.). **Transgenic plants**. San Diego: Academic Press, v.1, p. 147-178.
- Sangoi, L.; Silva, P. R. F.; Argenta, G.; Rambo, L. 2007. **Desenvolvimento e exigências climáticas da planta de milho para altos rendimentos**. Santa Catarina: CAV/UDESC, 91p.
- Saxena, D.; Stewart, C.N.; Altosaar, I.; Shu, Q.; Stotzky, G. 2004. Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. **Plant Physiology Biochemistry**, 42:383-387.
- Silva, M. T. B.; Ruedell, J.; Campos, A. E. 1983. Bioecologia e efeito de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) sobre o rendimento de milho semeado em diversas épocas. In: **Reunião anual Técnica de Milho**, 28. Porto Alegre, Ata... Porto Alegre: UFRGS, p.227.
- Silveira Neto, S.; Monteiro, R.C.; Zucchi, R.A.; Moraes, R.C.B. 1995. Uso da análise faunística de insetos na avaliação do impacto ambiental. **Scientia Agricola**, 52: 9-15.
- Silveira Neto, S.; Nakano, O.; Barbin, D.; Villa Nova, N.A. 1976. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 419p.
- Southwood, T.R.E. 1971. **Ecological Methods - with particular reference to the study of insect populations**. London. Chapman and Hall, 319p.
- Stadler, M. B.; Stadler, B. M. 2003. Allergenicity prediction by protein sequence. **The FASEB Journal**, 17:1141-1143.
- Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **BioTechniques**, 28: 1102-1104.
- Strickberger, M.W.1976. In: **Genetics**, second edition, MacMillan Publishing Co., Inc., New York.
- Teixeira, D. 2002a. **Assessment of chronic toxicity of VIP3A maize (corn) pollen and VIP3A/CryIAb maize pollen to the pink-spotted lady beetle (*Coleomegilla maculata*)**. Springborn Smithers Laboratories, Inc. Study No. 1781.6623. Relatório não publicado, para Syngenta Seeds, Inc. MRID 45766509.
- Teixeira, D. 2002b. **VIP3A maize (corn) leaf protein - acute toxicity to earthworms (*Eisenia foetida*)**. Springborn Smithers Laboratories, Inc. Study No. 1781.6615. Relatório não publicado, para Syngenta Seeds, Inc. MRID 45792102.

Tinland, B.; Hohn, B. 1995. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. **Genetic Engineering** 17:209-229.

Ed

USDA. 2007. **Crop production 2006 summary**. National Agricultural Statistics Service, United States Department of Agriculture. Report Cr Pr 201(07). Disponível em <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/CropProdSu/CropProdSu-01-12-2007.pdf>>. Acesso em 17 de maio de 2007.

Valicente, F.H.; Cruz, I. 1991. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 23p. (Embrapa-CNPMS. Circular técnica, 15).

Valvano, M. A. 1999. Biosynthesis and genetics of ADP-heptose. **Journal of Endotoxin Research**, 5:90-95.

Van Rie, J. 1991. Insect control with transgenic plants: Resistance proof? **Trends in Biotechnology**, 9: 177-179.

Vendramim, J.D.; Silva, F.C.; Camargo, A.P. 1989. Avaliação das dimensões da região danificada pelo complexo broca-podridões em seis cultivares de cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Porto Alegre, v.18, p.105-118.

Viana, F. M. S.; Silveira, M. G.; Pacheco, C. A. P.; Cruz, C. D.; Carvalho, C. R. 1999. Híbridação em milho. In: Borém, A. **Híbridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV. p. 401-426.

Vitti, G.C. 2003. Diagnóstico da fertilidade do solo e adubação para alta produtividade de milho. In: **Milho: Estratégias de manejo para alta produtividade**. Fancelli, A.L. Neto, A.D. Piracicaba: Esalq/USP/LPV, p.134-173.

Vogt, H.; Bigler, F.; Brown, K.; Candolfi, M. P.; Kemmeter, F.; Kühner, C.; Moll, M.; Travis, A.; Ufer, A.; Viñuela, E.; Waldburger, M.; Waltersdorfer, A. 2000. Laboratory method to test effects of plant protection products on larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). P. 27-44. In: **Guidelines to Evaluate Side-effects of Plant Protection to Non-target Arthropods**. Candolfi, M. P.; Blümel, S. ; Forster R.; Bakker, F. M.; Grimm, C.; Hassan, S. A. ; Heimbach, U.; Mead-Briggs, M. A.; Reber, B.; Schmuck, R.; Vogt, H. (eds). International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, West Palearctic Regional Section (IOBC/WPRS).

Ward, D.P.; Vlachos, D. 2007. **Public Interest Assessment Supporting Registration of MIR162, Bt11 x MIR162, and Bt11 x MIR162 x MIR604 Corn**. Syngenta Report No. SSB-518-07.

Warren, G.W.; Koziel, M.G.; Mullins, M.A.; Nye, G.J.; Carr, B.; Desai, N.M.;

97

Kostichka, K.; Duck, N.B.; Estruch, J.J. 1996. **Novel pesticidal proteins and strains.** Patent WP 96/10083. World Intellectual Property Organization.

Weatherwax, P. 1954. **Indian Corn in Old América.** N. Y., USA: The MacMillan Co, 253p.

Wu, F. 2007. Bt corn and impact on mycotoxins. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 2: 1-8.

Yu, C. G.; Mullins, M. A.; Warren, G. W.; Koziel, M. G.; Estruch, J. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**. 63:532-536