

PARECER TÉCNICO Nº 2753/2010

Processo nº: 01200.001455/2010-39

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Avenida das Nações Unidas, 12901, Torre Norte 7º Andar, São Paulo-SP

Requerente: Dow AgroSciences Industrial Ltda.

CNPJ: 47.180.625/0001-46

Endereço: Rua Alexandre Dumas, 1671, 1º Andar Ala A, São Paulo-SP

Assunto: Liberação comercial de milho geneticamente modificado

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante a herbicidas contendo os eventos MON 89034 × TC1507 × NK603, concluiu pelo DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico.

A Monsanto do Brasil Ltda., detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB 03/97, e Dow AgroSciences Industrial Ltda., detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB 107/99, solicitaram à CTNBio parecer sobre a biossegurança do milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio, contendo os eventos MON 89034 × TC1507 × NK603 para efeito de sua liberação no meio ambiente, comercialização, consumo e quaisquer outras atividades relacionadas a esse milho e progênie dele derivadas. O milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é resultante do cruzamento, através do melhoramento genético clássico, dos parentais de milho geneticamente modificados resistente a insetos - MON 89034, milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante ao herbicida glufosinato de amônio - TC1507 e do milho tolerante ao herbicida glifosato - NK603. O milho contendo o evento MON 89034 possui os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* inseridos em seu genoma, os quais produzem, respectivamente, as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 derivadas de *Bacillus thuringiensis*, que são ativas contra insetos da ordem Lepidoptera praga importantes na cultura do milho. O milho contendo o evento TC1507 foi gerado pela inserção dos genes *cry1F* e *pat*, os quais codificam as proteínas Cry1F e PAT, respectivamente. A proteína Cry1F confere ao milho proteção contra o ataque de insetos da ordem Lepidoptera, considerados pragas do milho. O milho contendo o evento NK603 possui o gene *cp4 epsps* originário de *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que responsável pela expressão da proteína CP4 EPSPS (CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3- fosfato sintase) conferindo a característica de tolerância ao herbicida glifosato na planta. A eficácia da atividade inseticida do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foi comparada à eficácia dos eventos individuais MON 89034 e TC1507, e ao controle convencional pela avaliação de danos foliares em plantas infestadas com a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Os resultados permitiram concluir que a combinação dos eventos individuais MON 89034, TC1507 e NK603 por melhoramento genético clássico não alterou, no milho combinado, a atividade inseticida contra a lagarta do cartucho observada nos eventos individuais MON 89034 e TC1507. A fitotoxicidade de formulações comerciais de glifosato e glufosinato de amônio no milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foi comparada à fitotoxicidade dessas mesmas formulações nos eventos individuais NK603, TC1507 e no controle convencional. Os resultados demonstraram que a combinação dos eventos MON

89034, TC1507 e NK603 no produto combinado, por melhoramento genético clássico, não alterou a característica de tolerância ao glufosinato de amônio expressa no evento individual TC1507, bem como a tolerância ao glifosato expressa no evento individual NK603. As avaliações de segurança alimentar das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 expressas no milho MON 89034 incluíram caracterização de cada uma delas, ensaios de digestão simulada em fluidos gástrico e intestinal, estudos de toxicidade oral aguda em camundongos, avaliações de bioinformática e estudos dos efeitos dessas proteínas sobre organismos não-alvo. Os estudos de toxicidade oral aguda em camundongos com as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 purificadas demonstraram que, como esperado, essas proteínas não são tóxicas para mamíferos. Estudos bioquímicos comparativos indicaram que as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 apresentam diferenças importantes no seu modo de ação, especificamente na forma como elas se ligam aos receptores do intestino médio dos insetos. Em estudos realizados com o milho MON 89034 × TC1507 × NK603 fica evidenciado que o milho combinado não difere do milho convencional para características morfológicas e reprodutivas, sendo mantidos todos os atributos originais da espécie domesticada. A manutenção das características botânicas do milho convencional no milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é decisiva para a manutenção das características fisiológicas da planta, e consequentemente da qualidade nutricional da forragem e dos grãos. A análise comparativa de composição entre milho combinado e o milho controle convencional demonstra que o milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é tão seguro para a alimentação humana e animal quanto o milho comum. Além disso, a CTNBio consultou literatura científica independente para avaliar a ocorrência de algum efeito inesperado oriundo do cruzamento entre esses eventos.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Milho MON 89034 × TC1507 × NK603

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda. e Dow AgroSciences Industrial Ltda.

Espécie: *Zea mays* L.

Característica Inserida: Tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio, e resistência a insetos.

Método de introdução da característica: O milho MON 89034 × TC1507 × NK603, classificado como Classe de Risco I, foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento MON 89034, evento TC1507 e o evento NK603.

Uso proposto: Livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, importação, liberação e descarte.

II. Informações Gerais

O milho *Zea mays* L. é uma espécie da família Gramineae, tribo Maydae, subfamília Panicoideae que está separada dentro do sub-gênero *Zea*, com número cromossômico $2n = 20,21,22,24$ ⁽¹⁾. A espécie silvestre mais próxima do milho é o teosinte o qual é encontrado no México e em algumas regiões da América Central, onde pode cruzar com o milho cultivado em campos de produção.

O milho possui uma história de mais de oito mil anos nas Américas, sendo cultivado desde o período pré-colombiano. É uma das plantas superiores mais bem

caracterizadas cientificamente, sendo hoje a espécie cultivada que atingiu o mais elevado grau de domesticação e somente sobrevive na natureza quando cultivado pelo homem ⁽²⁾. Existe atualmente cerca de 300 raças de milho identificadas e, dentro de cada raça, milhares de cultivares.

Uma das mais importantes fontes de alimento no mundo, o milho é insumo para a produção de uma ampla gama de produtos alimentícios, rações e produtos industriais. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de milho cujo cultivo é realizado praticamente em todo território nacional ⁽³⁾.

A ocorrência de insetos nos trópicos é maior do que em regiões temperadas onde os danos causados por esses animais são mais acentuados. Dentre as pragas mais importantes do milho destaca-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Cruz e colaboradores⁽²¹⁾ estimaram que no Brasil as perdas em função da infestação por *S. frugiperda* estavam em torno de 400 milhões de dólares por ano. Outras espécies da ordem Lepidoptera também são pragas importantes da cultura do milho, como a lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e a lagarta-do-colmo (*Diatrea saccharalis*).

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

O Brasil é considerado o terceiro maior consumidor de defensivos agrícolas do mundo com 142 agrotóxicos registrados para milho, onde 107 são somente para lagartas. Já existem vários casos de resistência pelo uso constante e indiscriminado de inseticidas na cultura do milho no Brasil. Além disso, um dos fatores que mais afeta a saúde dos agricultores no Brasil é o uso de defensivos agrícolas responsáveis pela intoxicação de um milhão de pessoas anualmente ⁽⁵⁾.

O uso de cultivares contendo eventos combinados é crescente a nível mundial. Isso representa uma tendência que busca atender a demanda de produtores ao combinar duas características de importância agrônômica em um mesmo híbrido. Nesse sentido, diversos híbridos de milhos contendo eventos combinados via melhoramento genético clássico estão aprovados em diversos países ⁽⁶⁾.

O milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é resultado da parceria tecnológica entre as entidades supra mencionada e contém os eventos de transformação genética MON 89034, TC1507 e NK603. Os eventos individuais MON 89034 e NK603 foram combinados por técnicas clássicas de melhoramento de milho ao evento TC1507 para

gerar o milho MON 89034 × TC1507 × NK603. Esses eventos individuais foram avaliados pela CTNBio durante o período de 2008 a 2009 onde recebeu parecer aprovando a biossegurança ^(7, 8, 9). Além do Brasil, esses eventos já foram autorizados individualmente, ou na forma combinada em diversos países ⁽⁶⁾.

A combinação dos eventos MON 89034 × TC1507 × NK603 no milho permitiu a inserção dos genes *cry1A.105*, *cry2Ab2* e *cry1F*, que codificam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F as quais conferem resistência contra importantes insetos da ordem Lepidóptera considerados praga do milho; assim como os genes *pat* e *cp4-epsps*, que codificam as proteínas PAT e CP4 EPSPS, responsáveis por conferir tolerância ao herbicida glifosato e a herbicidas contendo o glufosinato de amônio como princípio ativo, respectivamente.

III. Descrição do OGM e Proteínas Expressas

O milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foi formado a partir da combinação do milho contendo o evento MON 89034 que teve os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* inseridos em seu genoma os quais codificam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, respectivamente. As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 são ativas contra insetos lepidópteros considerados pragas do milho. O segundo componente do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é o milho contendo o evento TC1507 que teve os genes *cry1F* e *pat* inseridos em seu genoma. O gene *cry1F* codifica a proteína Cry1F que é ativa contra insetos lepidópteros considerados pragas do milho. O gene *pat*, por sua vez, codifica a proteína PAT, que confere às plantas de milho tolerância a herbicidas contendo o princípio ativo glufosinato de amônio. Finalmente, o terceiro componente do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é o milho contendo o evento NK603, que teve o gene *cp4 epsps* inserido em seu genoma e expressa a proteína CP4 EPSPS. A proteína CP4 EPSPS confere às plantas de milho tolerância ao herbicida glifosato.

As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 possuem atividade inseticida aditiva, o que permitiu que cada proteína fosse testada independentemente em estudos de avaliação de segurança. As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 foram testadas isoladas e combinadas contra duas espécies de lepidópteros sensíveis: a Broca Européia do milho (*Ostrinia nubilalis*) e a lagarta da Espiga (*Helicoverpa zea*) ⁽¹⁰⁾. Os insetos foram expostos às proteínas purificadas Cry1A.105 e Cry2Ab2 em bioensaios com incorporação das proteínas em dieta. As interações entre as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 foram avaliadas usando um modelo simples de ação similar (adição de dose) ^(11, 12, 13). Esta

análise demonstrou que as proteínas têm atividade inseticida aditiva, não sendo observados efeitos sinérgicos ou antagonísticos. Os resultados desse estudo foram consistentes com os resultados de um estudo anterior que demonstrou que não existe interação entre as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 ⁽¹⁴⁾.

A atividade biológica da proteína Cry1F foi estudada em uma gama de insetos pragas que se alimentam de plantas de milho. Estes ensaios foram realizados expondo os insetos a dietas artificiais tratadas com formulações aquosas da proteína Cry1F produzida a partir de uma fonte microbiana (*Pseudomonas fluorescens*), validado por Evans ⁽¹⁵⁾ que demonstrou que as características bioquímicas da proteína produzida na forma vegetal e microbiana são equivalentes. Os insetos avaliados foram: lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), broca do colmo (*Diatraea saccharalis*), broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta elasmô (*Elasmopalpus lignosellus*), broca do milho do sudoeste (*Diatraea grandiosella*), larva alfinete (*Diabrotica virgifera virgifera*), pulgão da folha do milho (*Rhopalosiphum maidis*) e cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*). Neste estudo, os insetos suscetíveis à proteína Cry1F foram: lagarta do cartucho, broca do colmo, broca europeia do milho, lagarta da espiga, lagarta rosca, lagarta elasmô e broca do milho do sudoeste.

No estudo conduzido por Evans ⁽¹⁵⁾, não foi observado atividade alguma da proteína Cry1F contra os insetos: larva alfinete, cigarrinha do milho e pulgão da folha do milho. Este resultado demonstrou a ação específica da proteína Cry1F para algumas espécies de lepidópteros praga. Estudos realizados por Hua e colaboradores ⁽¹⁶⁾ demonstram a especificidade das proteínas Cry através de ensaios de ligação em vesículas celulares, evidenciando a alta especificidade de interação deste complexo protéico a receptores celulares de determinados insetos.

Uma particularidade das proteínas Cry1F, Cry2Ab2 e Cry1A.105 é que elas apresentam seus domínios de interação protéica indisponíveis, quando presente no interior de células vegetais, devido às suas conformações moleculares permanecem inertes e inativas. A ativação das proteínas Cry somente ocorrerá depois de ingerida pelo inseto, de modo que sua solubilização depende de pH alcalino, e posterior processamento para liberação da forma ativa ⁽¹⁷⁾. Este processamento enzimático é catalisado por proteases específicas presentes no intestino do inseto. Em consonância com essa afirmação, pode-se concluir que as proteínas Cry, embora presentes na mesma célula vegetal onde se encontram proteínas distintas, possuem mecanismos de ação isolados e

independentes; interagindo apenas com seus receptores específicos após solubilizadas e modificadas dentro do intestino dos insetos-alvo.

A proteína CP4 EPSPS (CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3- fosfato sintase) - confere ao milho tolerância ao herbicida glifosato - expressa nas plantas geneticamente modificadas é funcionalmente idêntica à proteína EPSPS endógena das plantas, com a diferença que a CP4 EPSPS possui afinidade reduzida pelo herbicida glifosato ⁽¹⁸⁾. Em plantas convencionais, o glifosato se liga à enzima EPSPS e bloqueia a biossíntese do ácido chiquímico, portanto, impedindo a formação de aminoácidos aromáticos e metabólitos secundários ^(19, 20). Nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, como os milhos contendo o evento NK603, os aminoácidos aromáticos e outros metabólitos necessários para o desenvolvimento das plantas continuam sendo produzidos pela atividade da proteína CP4 EPSPS ^(21, 22).

A proteína PAT - Fosfinotricina Acetiltransferase - apresenta atividade enzimática específica cujo mecanismo de ação é bastante elucidado na literatura científica. Estudos demonstraram que a proteína PAT não é passível de interação com outras proteínas além de seu alvo: o glufosinato de amônio. A análise de sua sequência primária mostra que esta proteína em nada se assemelha a outras proteínas alergênicas conhecidas, havendo semelhança apenas com outras acetiltransferases, nunca relacionadas a qualquer tipo de efeito negativo ⁽²³⁾. Diversos estudos realizados com o milho contendo o evento TC1507 indicaram que as proteínas PAT e Cry1F, mesmo quando produzidas na mesma planta, não apresentam interação sinérgica, comprovando a independência funcional entre PAT e as proteínas Cry ⁽⁸⁾.

As características da proteína PAT, aliadas a seu histórico de uso, permite concluir que a possibilidade desta proteína em mostrar qualquer tipo de interação com as demais proteínas do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 não é significativa. O evento NK603 expressa a enzima CP4 EPSPS, a qual possui a mesma função das proteínas EPSPS presentes em plantas convencionais, além de ser bastante semelhante quanto à sua composição e estrutura. A semelhança com a proteína endógena garante à CP4 EPSPS atuar em um mecanismo natural da célula vegetal. Esta característica por si só evidencia o quão improvável seria uma interação da CP4 EPSPS com outras proteínas, independentemente de ser originária da própria célula vegetal, ou mesma oriunda dos eventos combinados.

O uso de bancos de dados permitiu uma busca *in silico* para identificar a possível existência de domínios de interação nas proteínas inseridas no milho MON 89034 × TC1507 × NK603. Os resultados revelaram que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F,

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

Brasília, DF – CEP: 70610-200

Fones: (55)(61) 3411 (ramal de sua setorial) – FAX: (55)(61) 3317 (ramal de sua setorial)

N/C: _____

PAT e CP4 EPSPS não apresentam domínios clássicos de interação entre proteínas. Além disso, exames nos Bancos de Dados permitiram concluir que as mesmas não pertencem ao grupo das calmodulinas ⁽²⁴⁾.

O milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foi gerado mediante melhoramento genético clássico, por cruzamento dos eventos individuais MON 89034, TC1507 e NK603, e por este motivo apresenta herança mendeliana dos genes exógenos introduzidos nestes eventos. A estabilidade genotípica do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foi confirmada por meio de análises moleculares, onde se comparou o seu DNA com o DNA dos eventos individuais para verificar a presença dos genes *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry1F*, *cp4 epsps* e *pat* no milho combinado. Para tanto, utilizou-se a técnica de *Southern blot*, comparando-se a presença e a integridade dos insertos nos diferentes híbridos. Assim, confirmou-se que no milho MON 89034 × TC1507 × NK603 foi mantida a integridade dos insertos presentes nos eventos individuais ⁽²⁵⁾. Além disso, a estabilidade genética foi estudada em cada um dos eventos individuais em diferentes gerações ^(26, 27).

IV. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

Ensaio para demonstrar a similaridade na composição centesimal do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 e seu correspondente convencional foram realizados no Brasil em diferente épocas de plantio durante o ano 2009 em 4 ambientes distintos. Adicionalmente, para o estudo de equivalência substancial foi comparada a composição de amostras dos híbridos MON 89034 × TC1507 × NK603 e de seu correspondente híbrido convencional ⁽²⁸⁾.

Os dados obtidos demonstram que os níveis dos principais componentes quantificados nas forragens e grãos do milho combinado MON 89034 × TC1507 × NK603 e do milho controle são equivalentes. Assim como, os dados da composição centesimal de grãos e de fibras para extrato etéreo, proteínas, fibras em detergente ácido (FDA), fibras em detergente neutro (FDN), carboidratos e cinzas revelam que não há diferença significativa entre o milho combinado MON 89034 × TC1507 × NK603 e o milho usado como controle convencional. Desse modo, pode-se concluir que tanto grãos como forragem oriundos de plantas do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 são equivalentes aos grãos e forragem do milho convencional do ponto de vista da composição e do valor nutricional ⁽²⁹⁾. Além disso, os valores obtidos estão dentro dos intervalos de análises semelhantes encontrados na literatura ^(30, 31, 32, 33, 34, 35).

Estudos de toxicidade aguda foram realizados administrando as várias proteínas Cry, a CP4 e PAT recombinantes em grande quantidade de camundongos, e revelaram ausência de toxicidade, sem manifestações adversas ou alterações detectáveis por investigação histopatológica. Considerando a baixa concentração destas proteínas no milho, é praticamente impossível haver qualquer efeito tóxico.

A digestibilidade das proteínas expressas foi demonstrada pela rápida degradação em suco gástrico ou entérico simulado. Este é garantia adicional de não absorção da proteína intacta e ausência de interferência sistêmica e já indica baixo potencial alergênico destas proteínas.

A análise computacional usando bases de dados sobre proteínas ou peptídeos alergênicos não revelou potencial para causar alergias para estes produtos gênicos. Ainda, testes cutâneos com a proteína Cry1Ab em 27 crianças com histórico de alergia inalatória e 50 indivíduos com asma/rinite ⁽³⁶⁾ demonstraram que os eventos no milho geneticamente modificados são seguros quanto ao potencial de alergenicidade a humanos. Outro estudo com pacientes japoneses com alergia a alimentos não detectou níveis significativos de IgE específica contra as proteínas CP4-EPSPS ou Cry9C no soro destes pacientes pelo método de ELISA ⁽³⁷⁾. A segurança para a alimentação animal/humana das proteínas Cry foi confirmada por diversos autores, dentre eles Xu e colaboradores ⁽³⁸⁾.

Outro recente estudo de 28 dias em ratos, realizado por Onose e colaboradores ⁽³⁹⁾ mostrou que nenhum efeito adverso pode ser atribuído à alimentação contendo Cry1Ab, visto que a administração de dieta contendo proteína Cry1Ab não teve nenhum efeito significativo sobre qualquer parâmetro fisiológico ou bioquímico, exceto um nível mais baixo de AST (Aspartato Amino Transferase) no soro de animais que receberam tal milho, sabendo-se que a amplitude de variação desse parâmetro pode ser ampla em animais saudáveis. Nenhuma mudança em pesos de órgãos ou mudanças histopatológicas foi observada nos órgãos como coração, fígado e rins. Estudos recentes realizados em ratos e bovinos apresentaram resultados coerentes com a avaliação de risco realizada para a proteína EPSPS.

Healy e colaboradores ⁽⁴⁰⁾ apresentaram os resultados de um estudo de treze semanas de alimentação de ratos com grãos de milho combinado que expressa CryBb1 e CP4 EPSPS. As respostas dos ratos alimentados com dietas contendo essa variedade de milho foram comparáveis àquelas dos ratos alimentados com uma dieta contendo grãos de sua variedade quase isogênica controle, confirmando que este milho combinado é tão seguro e nutritivo quanto os grãos dos híbridos de milho comerciais existentes.

Estudo realizado por Herouet e colaboradores em 2005 ⁽⁴¹⁾, mostrou que a proteína PAT é altamente específica e não apresenta as características associadas com toxinas alimentares ou alérgenos.

Igualmente, os autores demonstraram que a proteína PAT é rapidamente degradada em experimentos de simulação de fluido gástrico e intestinal com pancreatina e pepsina. Adicionalmente, não observaram mortalidade ou toxicidade quando administraram 1 ou 10 mg da proteína PAT/kg de peso corporal por injeção intravenosa em camundongos, confirmando que a proteína PAT não apresenta toxicidade aguda (safety factor >1000) e não causam efeitos adversos em camundongos após a administração intravenosa de altas doses por um período superior a duas semanas.

Finalmente, o milho contendo os eventos individuais MON 89034, TC1507 e NK603, assim como os milhos contendo esse eventos combinados (MON 89034 x NK603, TC 1507 x NK603) foram avaliados quanto à sua segurança alimentar através de protocolos disponíveis e validados internacionalmente. A segurança das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cr1F, PAT e EPSPS foram devidamente avaliada individualmente, assim como na forma combinada pela CTNBio ^(7, 8, 9, 42, 43).

V. Aspectos Ambientais

O milho é uma planta monóica, alógama e anual cuja polinização é anemocórica e as distâncias que o pólen pode viajar dependem do padrão do vento, umidade e temperatura. O pólen de milho se dispersa livremente nas áreas situadas nas imediações da cultura, podendo atingir os estilo-estigmas do mesmo genótipo ou de genótipos diferentes e, em condições adequadas, inicia a sua germinação que originará o tubo polínico promovendo a fecundação do óvulo dentro de um período médio de 24 horas.

Estudos sobre dispersão de pólen têm sido conduzidos onde demonstraram que o pólen pode deslocar-se a longas distâncias, não obstante a maioria é depositada próxima o plantio com taxa de translocação muito baixa e cerca de mais de 95% do pólen pode alcançar distâncias dentro de 60 metros de sua fonte. Luna e colaboradores ⁽⁴⁴⁾ avaliaram a distância de isolamento e o controle de pólen onde demonstraram que a polinização cruzada ocorre em uma distância máxima de 200 metros, contudo nenhuma polinização cruzada, em condição de não-despendoamento, foi observada em distâncias iguais ou superiores a 300 metros em relação às fontes de pólen. Os resultados indicam que a viabilidade do pólen é mantida por 2 horas e que a polinização cruzada não foi observada em distâncias de 300 metros da fonte de pólen.

Ensaios realizados no Brasil em três locais com o milho MON 89034 × TC1507 × NK603, com os eventos individuais MON 89034, TC1507 e NK603, assim como o milho controle convencional não demonstraram diferenças significativas na viabilidade das sementes, germinação, vigor das plantas, florescimento, arquitetura das plantas e resposta aos principais patógenos. Estes ensaios de campo demonstraram que as características de sobrevivência do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 são comparáveis àquelas do milho convencional. Assim como mencionado para os eventos individuais, é improvável que ocorra o cruzamento sexual do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 com espécies compatíveis no Brasil. Portanto, a consequência ambiental da transferência do pólen do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 para espécies selvagens de plantas é considerada desprezível.

Estudos que avaliam a persistência das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 do milho MON 89034, das proteínas Cry1F e PAT do milho TC1507 ⁽⁴⁵⁾, e da proteína CP4 EPSPS do milho NK603 no solo, demonstram que todas são degradadas rapidamente e não se acumulam, portanto não representam risco à microbiota do solo. As proteínas inseticidas Cry são extremamente seletivas para insetos da Ordem Lepidóptera ^(46, 47, 48, 49, 50), não apresentando efeitos deletérios sobre insetos considerados benéficos e não-alvo, entre os quais se incluem predadores, parasitóides, polinizadores e outros ^(51, 52, 53, 54).

As características agronômicas do milho combinado MON 89034 × TC1507 × NK603 foram comparadas com os eventos individuais TC1507, MON 89034, NK603 e com o híbrido convencional correspondente. O objetivo do trabalho foi testar a hipótese de que o cruzamento por melhoramento genético clássico de plantas contendo os eventos individuais não produz alterações no milho combinado. Os experimentos foram realizados nas Unidades Operativas da Dow AgroSciences Industrial Ltda. no Brasil, durante o ano agrícola de 2009. Os ensaios foram realizados em quatro ambientes: Cravinhos-SP, Indianópolis-MG e dois em Mogi Mirim-SP (época 1 e 2) ⁽²⁸⁾.

As características, como produção de grãos, umidade do grão na colheita, empalhamento, altura da planta, altura da espiga principal, florescimento masculino, florescimento feminino, acamamento e quebramento do colmo, não diferiram nos híbridos testados. Esses resultados demonstram que o milho combinado MON 89034 × TC1507 × NK603 não diferiu dos eventos individuais TC1507, MON 89034 e NK603, bem como do controle convencional, indicando a não ocorrência de alteração das características agronômicas no milho combinado obtido por cruzamento dos eventos individuais. Portanto, nenhum efeito adverso significativo ocorreu para as características

avaliadas em consequência da combinação dos eventos individuais por melhoramento genético clássico.

Além disso, experimentos realizados no Brasil para avaliar o efeito dos milhos MON 89034, TC1507 e NK603 sobre artrópodes não-alvo não detectaram diferença na visitação das ordens e das morfoespécies de artrópodes estudadas, em comparação ao milho convencional. Em outros estudos de ecotoxicidade realizados com parasitóides ⁽⁵⁵⁾, artrópodes benéficos ⁽⁵⁶⁾, abelhas ⁽⁵⁷⁾, minhocas ⁽⁵⁸⁾, Collembola ⁽⁵⁹⁾ e Daphnia ⁽⁶⁰⁾ entre outros, foi demonstrado que as proteínas Cry não causam efeitos adversos aos organismos não-alvo estudados.

Trabalhos publicados na literatura científica concluíram que a presença das proteínas Cry, não afeta de forma significativa a microbiota e os animais que vivem no solo ^(60, 61). Adicionalmente, proteínas Cry de três subespécies de *B. thuringiensis* não demonstraram atividade microbiocida ou microbiostática contra uma variedade de bactérias, fungos e algas ⁽⁶²⁾.

Os eventos individuais MON 89034, TC1507, NK603 e o milho MON 89034 × TC1507 × NK603 não causaram efeitos adversos em organismos não-alvo, tais como os artrópodes que ocorreram com maior abundância nas parcelas experimentais, os fitófagos (*Diabrotica speciosa*, *Leptoglossus zonatus*, *Euxesta* sp., *Rhopalosiphum maidis*) e sobre os artrópodes benéficos como tesourinha (*Doru luteipes*), sirfídeo (*Allograpta* sp.), joaninha (*Cycloneda sanguinea*), dípteros predadores (*Dolichopodidae*) e abelhas (*Apis mellifera*).

Por fim, o milho é espécie exótica, sem parentes silvestres sexualmente compatíveis no Brasil. Possui elevado grau de domesticação, não havendo razões científicas para se prever a sobrevivência de plantas geneticamente modificadas e não-geneticamente modificadas fora do ambiente agrícola. Além disso, na ausência de pressão seletiva (uso do herbicida e dos inseticidas), a expressão dos genes inseridos não confere vantagem adaptativa.

VI. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

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

Dados apresentados pela requerente demonstraram que não houve diferença significativa entre os híbridos de milho derivados de linhagens não-modificadas e o milho 89034 × TC1507 × NK603 com relação a características agronômicas, modo de reprodução, disseminação ou capacidade de sobrevivência. Todas as evidências apresentadas no processo e em referências bibliográficas confirmam o nível de risco da variedade transgênica como equivalente às variedades não-transgênicas frente à microflora do solo, bem como a outros vegetais e à saúde humana e animal. Assim, o cultivo e o consumo do milho MON 89034 × TC1507 × NK603 não são potencialmente causadores de significativa degradação do meio ambiente ou de riscos à saúde humana e animal. Por essas razões, não há restrições ao uso deste milho ou seus derivados, exceto nos locais contemplados pela Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

O fluxo gênico vertical para variedades locais (chamados milhos crioulos) de polinização aberta é possível e apresenta o mesmo risco causado pelos genótipos comerciais disponíveis no mercado (80% do milho convencional plantado no Brasil provêm de sementes comerciais que passaram por um processo de melhoramento genético). A coexistência entre cultivares de milhos convencionais (melhoradas ou crioulas) e cultivares transgênicas de milhos é possível do ponto de vista agrônomo ^(64, 65).

Após dez anos de uso em diversos países, não foi detectado problema algum para a saúde humana e animal ou para o meio ambiente que possa ser atribuído a milhos transgênicos. É necessário enfatizar que a falta de efeitos negativos resultantes do cultivo de plantas transgênicas de milho não quer dizer que eles não possam vir a acontecer. Risco zero e segurança absoluta não existem no mundo biológico, muito embora já exista um acúmulo de informações científicas confiáveis e um histórico seguro de uso de dez anos que nos permite afirmar que o milho MON 89034 × TC1507 × NK603 é tão seguro quanto as versões convencionais. Assim, a requerente deverá conduzir monitoramento pós-liberação comercial nos termos da Resolução Normativa nº 3 da CTNBio.

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

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

VIII. Conclusão

Considerando que a variedade de milho (*Zea mays*) MON 89034 × TC1507 × NK603 pertence a espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano e que os genes *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cy1F*, *pat* e *cp4 epsps* introduzidos nessa variedade codificam proteínas ubíquas na natureza, presentes em plantas, fungos e microrganismos que fazem parte da dieta alimentar de seres humanos e animais;

Considerando que a construção deste genótipo ocorreu através de melhoramento genético clássico, e que resultou na herança de uma cópia estável e funcional dos genes *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cy1F*, *pat* e *cp4 epsps*, os quais proporcionaram resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato e aos herbicidas contendo glufosinato de amônio como princípio ativo;

Considerando que dados de composição centesimal não apontaram diferenças significativas entre as variedades geneticamente modificadas e as convencionais, sugerindo a equivalência nutricional entre elas;

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

Considerando que a CTNBio aprovou vários milhos contendo eventos com a proteína Cry e que até o presente momento não há relato de qualquer efeito para a saúde humana/animal, ou ao ambiente;

Considerando ainda que:

1. O evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 foi bem caracterizado molecularmente, tendo sido atestada a manutenção da integridade das construções gênicas herdadas dos respectivos parentais durante o processo de melhoramento genético clássico;
2. Não há indícios de interação entre as vias metabólicas em que atuam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS;
3. Não foram identificados efeitos pleiotrópicos ou epistáticos nos eventos parentais e em conjunto;
4. A expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS no milho MON 89034 x TC 1507 x NK603 não é significativamente diferente da expressão observada nos eventos parentais separadamente;
5. Não há indícios de que as proteínas expressas possam causar alergia ou intoxicação em humanos e animais;
6. As avaliações agrônomicas e de eficácia do milho MON 89034 x TC 1507 x NK603 indicaram que a combinação destes eventos por métodos de melhoramento genético clássico (cruzamentos sexuais) não levou à expressão de qualquer outra características diferente de resistência a certos insetos e tolerância ao herbicida glifosato e a herbicidas cujo glufosinato de amônio é o princípio ativo;
7. Não foram evidenciadas alterações morfofisiológicas no milho MON 89034 x NK 603 que possam conferir vantagens adaptativas;
8. As demais análises de risco realizadas por países que já avaliaram o milho combinado MON89034 x NK603 ^(66, 67);
9. Os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas no que tange a eventos combinados ⁽⁶⁸⁾.

É possível concluir que o milho MON 89034 x TC1507 x NK603 é tão seguro quanto seu equivalente convencional.

No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que o Milho MON 89034 x TC1507 x NK 603 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, a CTNBio concluiu que o milho MON 89034 x TC 1507 x NK 603 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional.

A CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas ao disposto na Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

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

I) – Instruções:

a) O monitoramento deve ser realizado em lavouras comerciais e não em experimentais. As áreas escolhidas para serem monitoradas não devem ser isoladas das demais, possuir bordaduras ou qualquer situação que seja fora do padrão comercial.

b) O monitoramento deve ser realizado em modelo comparativo entre o sistema convencional de cultivo e o sistema de cultivo do OGM, sendo a coleta de dados realizada por amostragem.

c) O monitoramento deverá ser conduzido em biomas representativos das principais áreas de cultura do OGM e, sempre que possível, contemplar os diferentes tipos de produtores.

d) O monitoramento deve ser realizado pelo período mínimo de 5 anos.

e) Para todos os monitoramentos, a proponente deve detalhar as informações sobre todas as atividades realizadas no pré-plantio e plantio, sobre sua execução, com relato das atividades conduzidas nas áreas de monitoramento durante o ciclo da cultura, sobre as atividades de colheita e das condições climáticas.

f) Deverá haver também acompanhamento de eventuais agravos à saúde humana e animal por meio dos sistemas oficiais de notificação de efeitos adversos, como por exemplo, o SINEPS (Sistema de Notificação de Eventos Adversos relacionados a Produtos de Saúde) regulamentado pela ANVISA.

g) Os métodos analíticos, resultados obtidos e suas interpretações devem ser desenvolvidos em conformidade com princípios de independência e transparência, ressaltados aspectos de sigilo comercial previamente justificados e definidos como tal.

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

II) – Ações técnicas de monitoramento a serem executadas:

1 – Com relação ao gene *cp4 epsps* e *pat*, que confere resistência ao herbicida devem ser monitorados:

a) Estado nutricional e sanidade das plantas OGM.

b) Atributos químicos e físicos do solo relacionados à fertilidade e outras características pedológicas básicas.

c) Diversidade microbiana do solo.

d) Banco de diásporos do solo.

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

2 - Com relação aos genes *cry1A.105*, *cry2Ab2* e *cry1F*, que conferem resistência aos insetos devem ser monitorados:

- a) Impacto sobre insetos alvo e sobre insetos não-alvos.
- b) Impacto sobre invertebrados de solo indicadores, não pertencentes à Classe Insecta.
- c) Resíduos das proteínas inseticidas na matéria orgânica em decomposição, no solo e em cursos de água próximos a área de monitoramento.
- d) Desenvolvimento de resistência entre os insetos alvo.
- e) Fluxo Gênico dos três genes inseridos.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão, documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente e resultados de liberações planejadas no meio ambiente. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes, da requerente e realizados por terceiros.

Edilson Paiva
Presidente da CTNBio

IX. Bibliografia

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. FAO/WHO – 2000a. Grassland Index. Zea mays L. (Disponível em: <http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/agricult/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000342.htm>).
2. BAHIA FILHO, A.F.C.; GARCIA, J.C. 2000. Análise e avaliação do mercado brasileiro de sementes de milho. In: UDRY, C.V.; DUARTE, W.F. (Org.) Uma história brasileira do milho: o valor de recursos genéticos. Brasília: Paralelo 15, 167-172.
3. Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. 2007. Milho total (1ª e 2ª safra) Brasil - Série histórica de área plantada: safra 1976-77 a 2006-07. <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/MilhoTotalSerieHist.xls>.
4. CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *International Journal of Pest Management* 45:293-296.
5. ALVES FILHO, J.P. 2001. Agrotóxicos e Agenda 21: sinais e desafios da transição para uma agricultura sustentável. In: II SINTAG Anais. II Simpósio Internacional de Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos: Eficiência, Economia e Preservação da Saúde Humana e do Ambiente, Jundiaí, SP, 17/07/2001 a 20/07/2001.
6. Center for Environmental Risk Assessment (CERA). (Disponível em: http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database).
7. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. CTNBio 2008a. Parecer Técnico 1596/2008. Publicado no Diário Oficial da União de 14/10/2008, Seção 1, pág. 03.

8. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. CTNBio 2008b. Parecer Técnico 1679/2008. Publicado no Diário Oficial da União de 15/12/2008, Seção 1, pág. 121.
9. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. CTNBio 2009. Parecer Técnico 2052/2009. Publicado no Diário Oficial da União de 16/10/2009, Seção 1, pág. 03.
10. MacRae, T.C., C.R. Brown, e S.L. Levine. 2005. Evaluation of the Potential for Interactions Between the *Bacillus thuringiensis* Proteins Cry1A.105 and Cry2Ab2. Monsanto Technical Report MSL 19859.
11. Finney D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, London, 333 pp.
12. Hewlett, P.S., e R.L. Plackett. 1959. A unified theory for quantal response to mixtures of drugs: noninteractive action. Biometrics 15:591-610.
13. Tabashnik, B.E. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. Appl. Envir. Microbiol. 58:3343-3346.
14. Greenplate, J.T., J.W. Mullins, S.R. Penn, A. Dahm, B.J. Reich, J.A. Osborn, P.R. Rahn, L.Ruschke, e Z.W. Shappley. 2003. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. J. Appl. Entomol. 127:340-347.
15. Evans, S.L. 1998. Equivalency of Microbial and Maize Expressed Cry1F Protein; Characterization of Test Substances for Biochemical and Toxicological Studies. Report number MYCO98-001, an unpublished technical report by Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences.
16. Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J., Schwab, G., Adang, M. 2001. Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry d-Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Ostrinia nubilalis*. Applied and Environmental Microbiology 67(2): 872-879.
17. Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M.D., Morris, K., Oppert, B., and J. L. Jurat-Fuentes. 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. J. Biol. Chem. In press
18. Padgett, S.R., G.F. Barry, D.B. Re, D.A. Eichholtz, M. Weldon, K. Kotacz, e G.M. Kishore. 1993. Purification, cloning and characterization of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4. Monsanto Technical Report MSL 12738.
19. Haslam, E. 1993. Shikimic acid: metabolism and metabolites. University of Sheffield, UK.
20. Steinruken, H. C., e N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5- enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem Biophys Res Commun 94:1207-1212.
21. Padgett, S., N. Taylor, D. Nider, et al. 1996a. The composition of glyphosate-tolerant soybean seed is equivalent to that of conventional soybeans. Journal of Nutrition 126:102-716.
22. Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore, e R.T. Fraley. 1996b. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. CRC Handbook 4:53-84.

23. Thompson, C. J., Movva, N., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M., Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523.
24. Database of Protein Domain Interactions - DOMINE (Disponível em: <http://domine.utdallas.edu/cgi-bin/Domine?page=start>).
25. Taylor J. P, Groat J. R., Masucci James D. 2007. Southern Blot Analyses to Confirm the Presence of MON 89034 and NK603 in the Combined Trait Corn Product MON 89034 x TC1507 x NK603. MSL0020681. Monsanto Company.
26. Rice, J. F., Wolff B. J., Groat J. R., Scanlon N. K., Jennings J. C., Masucci J. D. 2006. Amended Report for MSL-20072: Molecular Analysis of Corn MON 89034. MSL 20311. Monsanto Company.
27. Glatt, C. M. 2000. Genetic characterisation of maize event 1507: Southern blot analysis. DuPont de Nemours Company, Newark, Delaware.
28. Zuben, M. V.; Silva, W. J.; Linares, E. Santos, A. C.; Guimarães, F. B.; Pinheiro, A. C. 2008. Estudos de Avaliações agrônômicas, de eficácia, de produção de tecidos para análises, expressão, composição e degradação em milho geneticamente modificado com genes para resistência a insetos e com genes para tolerância a herbicidas. Proposta de liberação planejada no meio ambiente do milho geneticamente modificado MON 89034 x TC 1507 x NK603. Dow Agrosiences Industrial Ltda.
29. Berger, G.U. ; Zuben, M. V.; Braga, D. P. V.; Silva, W. J. e Fiori, C.S.; 2010. Relatório de Biossegurança do Milho MON 89034 x TC1507 x NK603. 107 f. Proposta de liberação comercial do milho geneticamente modificado MON 89034 x TC1507 x NK603. Monsanto do Brasil Ltda. & Dow Agrosiences Industrial Ltda.
30. ILSI (International Life Sciences Institute). 2006. ILSI Crop Composition Database. www.cropcomposition.org. Version 3.0 <http://www.cropcomposition.org>.
31. Watson, S.A. 1982. Corn: Amazing Maize. General Properties. pp. 3-29. CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Vol. II: Part 1 Plant Products. I.A. Wolff (ed.). CRC Press, Inc., Florida.
32. Watson, S.A. 1987. Structure and Composition. pp. 53-82. Corn: Chemistry and Technology, S.A. Watson and P.E. Ransted (eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota.
33. OECD 2002 - Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO (2002) 25. 42p
34. Codex. 2001. Codex Standard for Named Vegetable Oils. CX-STAN 210-1999. Codex Alimentarius, Vol, 8, <http://www.mvo.nl/voeding-en-gezondheid/spvet/download/namedvegetable-oils.pdf>.
35. Codex. 2005. Codex Standard for Named Vegetable Oils (CODEX-STAN 210-1999), pp. 1-13.
36. Batista, R.; Nunes, B.; Carmo, M.; Cardoso, C.; Jose, H.S; Almeida, Abd. Manique, A.; Bento, L.P., Ricardo, C.P. e Oliveira, M.M. 2005. Lack of detectable allergenicity of transgênic maize and soya samples. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:403-410.
37. Takagi, K.; Teshima, R. e Nakagima, O. 2006. Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel

- proteins in genetically modified foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44: 182–188.
38. Xu, W.; Cao, S.; He, X.; Luo, Y.; Guo, X.; Yuan, Y.; Huang, K. 2009. Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein. *Food Chemistry Toxicology*, 47, 1459-1465.
39. Onose, J.; Imai, T.; Hasumura, M.; Ueda, M.; Ozeki, Y.; Hirose, M. 2008. Evaluation of subchronic toxicity of dietary administered Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki HD-1 in F344 male rats with chemically induced gastrointestinal impairment. *Food Chemistry Toxicology*, 46, 2184-2189.
40. Healy, C.; Hammond, B.; Kirkpatrick, J. 2008. Results of a 13-week safety assurance study with rats fed grain from corn rootworm-protected, glyphosate-tolerant MON88017 corn. *Food Chemistry Toxicology*, 46, 2517-2524.
41. Herouet, C.; Esdaile, D. J.; Mallyon, B. A.; Debruyne, E.; Schulz, A.; Currier, T.; Hendrickx, K.; Van Der Klis, R. J.; Rouan, D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41: 134–149.
42. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. CTNBio 2010a. Parecer Técnico 2725/2010. Publicado no Diário Oficial da União de 23/10/2010, Seção 1, pág. 09.
43. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. CTNBio 2010b. Parecer Técnico 2671/2010. Publicado no Diário Oficial da União de 23/09/2010, Seção 1, pág. 28.
44. LUNA, S.V.; FIGUEROA, J.M.; BALTAZAR, M.B.; GOMEZ, L.R.; TOWNSEND, R. E SCHOPER, J.B. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Sci.* 41:1551-1557.
45. Pinheiro, A. C.; Pavan, L. A.; Rosseto, J.; De Vito, R. and Faria, F.; "Soil Degradation of Cry1F Protein of Cropping with Herculex I Corn". 2006, GHB-P 1658S1. Unpublished report of Dow AgroSciences Industrial Ltda, Brazil.
46. MENDELSON, M.; KOUGH, J.; VAITUZIS, Z.; MATTEWS, K. Are Bt crops safe? *Nature Biotechnology*, v. 21, n. 9, p. 1003-1009, 2003.
47. DULMAGE, H. T. Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980. In: BURGESS, H. D. (Ed). London: Academic Press, 1981. p. 193-222.
48. KLAUSNER, A. Microbial insect control. *Bio/Technology*, v. 2, p. 408-419, 1984.
49. ARONSON, A. I.; BACKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.*, v. 50, p. 1-24, 1986.
50. MACINTOSH, S. C.; STONE, T. B.; SIMS, S. R.; HUNST, P.; GREENPLATE, J. T.; MARRONE, P. G.; PERLAK, F. J.; FISCHHOFF, D. A.; FUCHS, R. L. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Insect Path.*, v. 56, p. 258-266, 1990.
51. WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 40, p. 549-576, 1986.
52. CANTWELL, G. E.; LEHNERT, T.; FOWLER, J. Are biological insecticides harmful to the honey bee. *Am. Bee J.*, v. 112, p. 294-296, 1972.
53. KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. BURGESS, H. D. (Ed). London: Academic Press, 1981. p. 837-896.

54. FLEXNER, J. L.; LIGHTHART, B.; CROFT, B. A. The effects of microbial pesticides on non-target beneficial arthropods. *Agric. Ecosys. Environ.*, v. 16, p. 203-254, 1986.
55. Hoxter, K., Kruger, H., Porsh, J. 1999a. Cry1F *Bacillus thuringiensis* var. aizaway delta endotoxin: An dietary toxicity study with Parasitic Hymenoptera: Lab Project number: 354- 114D. Unpublished study prepared by Wildlife International Ltd.
56. Higgins, L. S., Babcock, J., Neese, P., Layton, R. J., Moellenbeck, D. J., Storer, N. 2009. Threeyear field monitoring of Cry1F,event DAS-01507-1, maize hybrids for nontarget arthropods effects. *Environmental Entomology* 38: 281-292.
57. Maggi, V. L. 1999. Evaluation of the dietary effect(s) on honey bee development using bacterially expressed Bt Cry1F delta-endotoxin and pollen from maize expressing BT-Cry1F delta-endotoxin. U.S. EPA MRID Number: 450415-03.
58. Hoxter, K., Porch, J., S., Kruger, H. 1999b. Cry1F *Bacillus thuringiensis* var. Aizaway delta endotoxin: An acute toxicity study with earthworm in an artificial soil substrate: Final Report: Lab Project number: 354-112. Unpublished study prepared by Wildlife International Ltd.
59. Halliday, W. 1998. Chronic exposure of *Folsomia candida* to bacterially expressed Cry1F protein: Lab project number: 7335-98-0078-AC-001. Unpublished study prepared by Ricerca, Inc.
60. Drottar, K., Krueger, H. 1999. Bt Cry1F delta-endotoxin: A 48 hour static renewal acute toxicity test with the Cladoceran (*Daphnia magna*) using bacterially expressed Bt Cry1F deltaendotoxin, and pollen from maize expressing Bt Cry1F delta-endotoxin: Final Report: Lab Project Number: 354A-111. Unpublished study prepared by Wildlife International Ltd.
61. MUCHAONYERWA, P.; WALADDE, S.; NYAMUGAFATA, P.; MPEPEREKI, S. E RISTORI, G. G. Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils. *Plant and Soil*, v. 266, p. 41-46, 2004.
62. STOTZKY, G. Clays and humic acids affect the persistence and biological activity of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* in soil. In: *Developments in Soil Science* 28B (Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health), p: 1-16, 2002.
63. STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil*, v. 266, p. 77-89, 2004.
64. Greenough, R.J., e D.J. Everett. 1991. Safety evaluation of alkaline cellulase. *Food Chem. Toxicol.* 29:781.
65. Hjortkjaer, R.K. 1993. Safety evaluation of esperase. *Food Chem. Toxicol.* 31:999.
66. EFSA. European Food Safety Authority. Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. *The EFSA Journal* (2007) 512, 1-5.
67. EFSA. Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-NL-2007-38) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize MON89034 x NK603 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *EFSA Journal* (2009) 7(9):1320.

68. Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment. Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for MON89034×NK603

Os membros da CTNBio Dr. Rodrigo Roubach, Dr. Pedro Binsfeld, Dra. Graziela Almeida da Silva, Dra. Solange Teles da Silva, Dr. Jose Maria Ferraz e Dr. Leonardo Melgarejo (Subcomissão Setorial Permanente: Saúde Humana e Animal, Ambiental) votaram contrariamente à liberação comercial do milho MON89034 x TC1507 x NK603.