
PARECER TÉCNICO Nº 2.725/2010

Processo nº: 01200.003952/2009-38

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Av. Nações Unidas, 12901 – Torre Norte – 7º e 8º andares – CEP: 04578-000 – São Paulo – SP.

Extrato Prévio: 2066/2009 de 04/11/09

Reunião: 138ª Reunião ordinária, ocorrida em 18/11/2010

Decisão: Deferido

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de milho MON 89034 x NK 603, que confere resistência a insetos e tolerância a herbicida, bem como todas as progênes dele provenientes, concluiu pelo DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico.

A Monsanto do Brasil Ltda, detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB 03/96, solicitou à CTNBio parecer sobre a biossegurança do milho MON 89034 x NK 603 resultante do cruzamento, através do melhoramento genético clássico, dos parentais de milho geneticamente modificados resistente a insetos, evento MON 89034 e tolerante ao herbicida glifosato, evento NK 603, para efeito de cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, e quaisquer outras atividades relacionadas a esse milho e progênes dele derivadas. O parental MON 89034 possui os cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* (derivados de *Bacillus thuringiensis*), que codificam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, respectivamente, responsáveis por conferir resistência a insetos. O parental de milho NK 603 contém dois cassetes de expressão do gene *cp4 epsps* (derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4), com suas respectivas seqüências regulatórias. O gene *cp4 epsps* codifica a proteína 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS), que confere tolerância à ação do herbicida glifosato. Os parentais do milho piramidado MON 89034 x NK 603 foram amplamente testados, tendo sua biossegurança sido analisada em processos distintos, ambos aprovados pela CTNBio. As proteínas presentes no milho MON89034 x NK 603 possuem um histórico de uso seguro pelo consumo do milho MON 89034 desde 2008 e do milho NK 603 desde 2000. O milho MON 89034 x NK 603 encontra-se aprovado no Japão, na Coréia do Norte, nas Filipinas, em Taiwan e nos Estados Unidos. Com relação às proteínas expressas pelo milho MON 89034 x NK 603, sabe-se que as proteínas Cry se acumulam no citoplasma e que apresentam toxicidade seletiva para algumas espécies de insetos lepidópteros, sendo seu mecanismo de ação mediado por receptores específicos nos organismos alvo. As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 se ligam a esses receptores localizados no intestino médio de insetos suscetíveis, levando à formação de poros que causam a morte do inseto. A proteína EPSPS, acumulada no cloroplasto, catalisa uma etapa na via metabólica do ácido chiquímico para a biossíntese de aminoácidos aromáticos sendo, portanto, essencial ao crescimento normal em plantas e microrganismos. O mecanismo de ação do glifosato se dá através da formação de um complexo com a enzima EPSPS, que compete com a ligação do substrato natural à enzima, bloqueando a via biossintética. A enzima CP4 EPSPS, presente no milho MON 89034 x NK 603, possui baixa afinidade pelo glifosato se comparada com as proteínas EPSPS selvagens. Dessa forma, quando o milho MON 89034 x NK603 é tratado com o herbicida glifosato, a atividade da enzima CP4 EPSPS faz com que estas plantas continuem se desenvolvendo normalmente. Em resumo, as proteínas expressas pelos

transgenes *cp4 epsps* e *cry* (*cry1A.105* e *cry2Ab2*) no milho MON 89034 × NK603 são acumuladas em diferentes compartimentos celulares, atuam em vias metabólicas distintas e possuem funções diferentes e não interativas. Estudos realizados com as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS demonstram que estas são rapidamente digeridas em fluidos gástrico e intestinal simulados. Isso contribui para um baixo potencial alergênico destas proteínas, juntamente com o fato de as mesmas estarem presentes no milho MON 89034 x NK 603 em baixas quantidades. Testes de toxicidade oral aguda e testes de toxicidade oral sub-crônica indicaram que as proteínas em questão não produzem efeitos adversos em mamíferos. Análises de bioinformática também demonstraram que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS não apresentam qualquer similaridade de sequência de aminoácidos com alérgenos e proteínas tóxicas conhecidas. A confirmação da presença e da integridade das sequências de DNA introduzidas no milho MON 89034 × NK603 foi realizada através de identificação inserto-específica por análise de *Southern blot*. A expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS ocorre em todos os tecidos da planta uma vez que os promotores utilizados promovem a expressão constitutiva destas proteínas. Os níveis de expressão destas proteínas foram determinados em folhas, grãos e forragem, tecidos relevantes para analisar a segurança do milho MON 89034 × NK603 como alimento humano e ração animal. Os resultados obtidos apontam níveis de expressão comparáveis das proteínas no evento piramidado e nos respectivos parentais, com uma baixa expressão dessas proteínas nos grãos e uma maior expressão em folhas, sendo intermediária na forragem. Durante a análise de características agrônômicas e fenotípicas no milho MON 89034 x NK 603 não foram identificadas diferenças estatísticas significativas com relação ao milho controle para nenhum dos parâmetros avaliados. Demonstrou-se também a eficácia no controle das pragas alvo e a presença da característica de tolerância ao herbicida glifosato. Em conjunto, os resultados destas avaliações suportam a conclusão de que, exceto pelas características específicas de cada gene introduzido, o fenótipo do milho geneticamente modificado não foi alterado e, portanto, o milho MON 89034 x NK 603 não tem potencial maior que o milho convencional de se tornar uma planta daninha. Foram realizadas análises de composição centesimal em grãos e forragem do milho MON 89034 x NK 603, comparando-o à variedade controle convencional, que possui base genética similar, e a sete cultivares referência de milho convencional. As amostras utilizadas foram geradas em três locais, representativos da área de cultura de milho no Brasil, durante a safra 2007/2008. Todos os valores de composição centesimal em forragem e grãos de milho MON 89034 x NK 603 ficaram dentro dos intervalos de valores do milho controle isogênico, das referências comerciais ou dos valores encontrados no banco de dados de composição do ILSI-CCD. Com isso, é possível afirmar que o milho MON 89034 x NK 603 é substancialmente equivalente ao milho convencional e, portanto, é tão seguro, saudável e nutritivo quanto o milho convencional. Além dos dados fornecidos pela empresa, a CTNBio consultou literatura científica independente para analisar a segurança e a ocorrência de algum efeito inesperado oriundo do cruzamento entre esses eventos. Diante do exposto conclui-se que o cultivo e o consumo do milho MON 89034 x NK 603 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, ou de riscos à saúde humana e animal. Por esta razão, não há restrições ao uso deste milho ou seus derivados. A CTNBio determina que o monitoramento pós-liberação comercial deve ser realizado em lavouras comerciais e não em experimentais. As áreas escolhidas para serem monitoradas não devem ser isoladas das demais, possuir bordaduras ou qualquer situação que seja fora do padrão comercial. O monitoramento deve ser realizado em modelo comparativo entre o sistema convencional de cultivo e o sistema de cultivo do OGM, sendo a coleta de dados realizada por amostragem. 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. O monitoramento deve ser realizado pelo período mínimo de 5 anos. Nos relatórios apresentados deverão ser detalhadas as informações sobre todas as atividades realizadas no pré-plantio e

plantio, sobre sua execução, com relato das atividades conduzidas nas áreas de monitoramento durante o ciclo da cultura, sobre as atividades de colheita e das condições climáticas. Deverá haver o acompanhamento de eventuais agravos à saúde humana e animal por meio dos sistemas oficiais de notificação de efeitos adversos, como por exemplo, o SINEPS (Sistema de Notificação de Eventos Adversos relacionados a Produtos de Saúde) regulamentado pela ANVISA. Os métodos analíticos, resultados obtidos e suas interpretações devem ser desenvolvidos em conformidade com princípios de independência e transparência, ressaltados aspectos de sigilo comercial previamente justificados e definidos como tal. No que diz respeito ao gene *cp4 epsps*, que confere resistência ao herbicida, deverão ser monitorados: o estado nutricional e sanidade das plantas GM; os atributos químicos e físicos do solo relacionados à fertilidade e outras características pedológicas básicas; a diversidade microbiana do solo; o banco de diásporos do solo; a comunidade de plantas invasoras; o desenvolvimento de resistência a herbicida em plantas invasoras; os resíduos do herbicida no solo, nos grãos e na parte aérea e o fluxo gênico. No que diz respeito aos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, que conferem resistência aos insetos, deverão ser monitorados: o impacto sobre insetos alvo e sobre insetos não-alvo; o impacto sobre invertebrados de solo indicadores, não pertencentes à Classe Insecta; os resíduos das proteínas inseticidas na matéria orgânica em decomposição, no solo e em cursos de água próximos a área de monitoramento; o desenvolvimento de resistência entre os insetos alvo e o fluxo gênico dos dois genes inseridos.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Milho MON89034 x NK603

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda..

Espécie: *Zea mays* L.

Característica Inserida: Tolerância ao herbicida glifosato e resistência a insetos

Método de introdução da característica: O milho MON 89034 x NK603, classificado como Classe de Risco I, foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento MON89034 e o evento NK603.

Uso proposto: cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, e quaisquer outras atividades relacionadas a esse milho e suas progênes

II. Informações Gerais

O milho *Zea mays* L. é uma espécie da família Gramineae, tribo Maydae, subfamília Panicoideae que está separada dentro do subgênero *Zea* e apresenta número cromossômico $2n = 20,21,22,24$ ⁽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 campo de produção.

O milho possui uma história de mais de oito mil anos nas Américas, sendo cultivado desde o período pré-colombiano. É uma das plantas superiores mais bem caracterizadas cientificamente, sendo hoje a espécie cultivada que atingiu o mais elevado grau de domesticação e somente sobrevive na natureza quando cultivado pelo homem ⁽²⁾. Existem atualmente cerca de 300 raças de milho identificadas e, dentro de cada raça, milhares de cultivares.

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

A ocorrência de insetos na Terra é maior nos trópicos em comparação às regiões temperadas onde os danos causados por esses animais são mais acentuados. Dentre as pragas mais importantes do milho destaca-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Cruz e colaboradores⁽⁴⁾ 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.

Em comparação com o milho convencional, o milho MON 89034 x NK603 não apresenta maior capacidade de sobrevivência como praga. A presença dos genes que conferem resistência a insetos Lepidópteros e a tolerância ao herbicida glifosato, conferem uma vantagem seletiva ao milho MON 89034 x NK603 quando exposto ao herbicida e na presença de insetos-alvo. Todavia, essas características não são suficientes para que ele se torne uma praga nas culturas de milho ^(5, 6).

O uso de milho contendo eventos piramidados representa uma tendência futura - que vem a atender a demanda de produtores - ao combinar duas características de importância agrônômica em um mesmo híbrido. Milhos com eventos combinados por melhoramento genético clássico já foram aprovados no Japão, União Européia, Brasil, Coreia, México, Filipinas, África do Sul, Taiwan, Argentina e El Salvador ⁽⁷⁾.

III. Descrição do OGM e Proteínas Expressas

O milho MON89034 foi produzido através da metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV-ZMIR245. O T-DNA I contém os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, enquanto o T-DNA II contém o gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e foi utilizado no processo inicial de seleção de células transformadas. Técnica de melhoramento genético clássico foi utilizada para isolar plantas que continham apenas os genes de interesse *cry1A.105* e *cry2Ab2*, mas que seriam desprovidas do gene *nptII*, produzindo, portanto, plantas livres do marcador de seleção e apenas com a característica de resistência a alguns lepidópteros-praga ⁽⁸⁾.

A sequência do gene *cry1A.105* codifica a proteína *Cry1A.105* que apresenta ação inseticida sobre lepidópteros-praga da cultura do milho. A proteína *Cry1A.105* é uma proteína *Cry1A* (derivada de *Bacillus thuringiensis*) modificada cuja sequência de aminoácidos equivale às das proteínas *Cry1Ab*, *Cry1Ac* e *Cry1F* em 90,0%, 93,6% e 76,7%, respectivamente. A sequência codificadora do gene *cry2Ab2* produz a proteína *Cry2Ab2* que é membro da classe de proteínas *Cry2Ab* com a qual tem em comum mais de 95% da sequência de aminoácidos ⁽⁹⁾. Essa é uma variante da proteína selvagem *Cry2Ab2* isolada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

O mecanismo geral da atividade inseticida das proteínas *Cry* é bem entendido ^(10, 11, 12, 13, 14). Sabe-se que estas proteínas são capazes de formar cristais contendo endotoxinas, proteínas com ação inseticida que atuam antes e durante a fase de

esporulação do ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*. Formulações comerciais de *B. thuringiensis* contendo essas proteínas têm sido utilizadas no Brasil e em outros países para o controle de algumas pragas agrícolas há mais de 46 anos. As proteínas inseticidas Cry são extremamente seletivas para insetos-alvo da Ordem Lepidóptera^(15, 16, 17, 18, 19), os quais possuem, no seu intestino, receptores específicos para essa proteína. Mamíferos e outros organismos não-alvo (incluindo outros artrópodes, polinizadores e inimigos naturais das pragas-alvo) não possuem tais sítios de ligação, portanto, não são afetados pela proteína Bt^(20, 21, 22, 23).

O milho NK603 foi produzido através de biobalística e contém dois cassetes de expressão do gene *cp4 epsps* (derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4), com suas respectivas seqüências regulatórias. Análises demonstraram que a seqüência de nucleotídeos de umas das cópias do gene *cp4 epsps* difere da seqüência original utilizada no processo de transformação em dois nucleotídeos. Uma das trocas de nucleotídeos foi silenciosa e a outra resultou na substituição de um aminoácido na posição 214. O nucleotídeo alterado na posição 214 pb resultou na codificação de uma leucina no lugar de uma prolina. A nova seqüência passou então a ser designada como *cp4 epsps* L214p⁽²⁴⁾.

O gene *cp4 epsps* codifica a expressão da proteína CP4 EPSPS (CP4-5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) que confere a característica de tolerância ao herbicida glifosato. A proteína CP4 EPSPS expressa nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato é funcionalmente idêntica à proteína EPSPS endógena de plantas⁽²⁵⁾. Em plantas convencionais, devido à rigorosa especificidade para os substratos, as enzimas EPSPS ligam apenas S3P, PEP e glifosato. O único produto metabólico resultante conhecido é o ácido 5-enolpiruvilshiquímico-3-fosfato, o que corresponde ao penúltimo produto da via do ácido shiquímico. O ácido shiquímico é um precursor para a biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), além de muitos metabólitos secundários, como o tetrahidrofolato, a ubiquinona e a vitamina K⁽²⁶⁾. Embora a via do ácido shiquímico (ou shiquimato) e as proteínas EPSPS não ocorram em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos, elas são importantes em plantas. Calcula-se que as moléculas aromáticas, todas derivadas do ácido shiquímico, representem 35% ou mais do peso seco de uma planta^(27, 28). Na presença de glifosato ocorre a ligação do herbicida à enzima EPSPS, o que bloqueia a biossíntese do 5-hidroxilshiquimato-3-fosfato, impedindo a formação de aminoácidos aromáticos e metabólitos secundários na plantas convencionais⁽²⁹⁾. Nas plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato como o milho NK603, os aminoácidos aromáticos e outros metabólitos necessários para o desenvolvimento das plantas continuam sendo produzidos pela atividade da proteína CP4 EPSPS⁽³⁰⁾.

O milho MON 89034 x NK 603 é resultante do cruzamento, através de melhoramento genético clássico, dos parentais de milho geneticamente modificados MON 89034 e NK 603, de forma que se observa a expressão das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (que conferem resistência a insetos) e da proteína CP4 EPSPS (que confere tolerância ao herbicida glifosato) no evento piramidado. Os parentais geneticamente modificados MON 89034 e NK 603, que deram origem ao evento combinado, foram previamente avaliados pela CTNBio e liberados para comercialização, após terem sido considerados tão seguros à saúde humana e animal e ao meio ambiente quanto o milho convencional (Pareceres Técnicos 2052/2009 e 1596/2008 respectivamente). O milho MON89034 também se encontra liberado para consumo humano e animal na Austrália (2008), Canadá (2008), Japão (2007/2008), Coreia (2009), Filipinas (2009), União Européia (2009) e Estados Unidos (2007). Já o milho NK603 está liberado para consumo humano e animal também na Argentina (2004), China (2005), Colômbia (2007), El Salvador (2009), México (2002), União Européia (2004), Japão (2001), Coreia (2002/2004), Estados Unidos (2000)⁽⁷⁾. Até o momento não se conhece a existência de efeitos adversos do milho NK603 e do milho MON89034.

O evento piramidado MON 89034 x NK603 possui liberação para consumo humano e/ou animal no Japão (2008), Coreia (2009/2010), México (2010), Filipinas (2009) e Taiwan (2009)⁽⁷⁾, também não havendo relatos de efeitos adversos até o momento.

IV. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

Ainda que haja um histórico de uso seguro dos eventos de milho parentais NK603 (Parecer Técnico Nº 1.596/2008) e MON 89034 (Parecer Técnico Nº 2.052/2009) uma das preocupações apresentadas quanto aos eventos piramidados se refere a eventuais efeitos indesejáveis derivados de interações não antecipadas entre os produtos gênicos expressos. Porém, o modo de ação e as atividades biológicas das proteínas CP4 EPSPS e Cry expressas no milho MON 89034 x NK603 são distintos e não possuem mecanismos conhecidos de interação que poderiam causar efeitos adversos à saúde humana e animal, tampouco ao meio ambiente. As proteínas CP4 EPSPS e Cry presentes no milho MON 89034 x NK603 são acumuladas em diferentes compartimentos celulares e possuem funções metabólicas distintas e não-interativas, sendo a proteína CP4 EPSPS direcionada ao cloroplasto enquanto as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 são acumuladas no citoplasma^(5,6). Assim, considerando as vias metabólicas envolvidas, bem como a semelhança das características fenotípicas observadas no milho piramidado, comparadas a sua geração parental, não se espera que ocorra a interferência de um gene sobre o fenótipo do outro.

A Biossegurança alimentar do milho MON 89034 x NK 603 foi determinada através de diversos estudos ⁽³¹⁾, que avaliaram diferentes aspectos relacionados, sendo o resumo destes resultados apresentado a seguir.

Um dos aspectos avaliados para determinar a segurança do milho piramidado MON 89034 x NK 603 foi sua equivalência composicional com relação à uma variedade controle convencional, com base genética similar, e sete cultivares referência de milho convencional. A análise da composição centesimal para as variáveis cinzas, carboidratos, gorduras, umidade e proteína foi realizada em amostras de sementes e forragem obtidas de plantas cultivadas em três locais no Brasil (Rolândia/PR, Não-Me-Toque/RS e Cachoeira Dourada/MG) na safra 2007/2008. Os valores de referência utilizados foram da *ILSI Crop Composition Database* ⁽³²⁾.

Os valores médios individuais de composição para cinzas, carboidratos, gorduras, umidade e proteína obtidos com forragem de milho MON 89034 x NK 603 em sua maior parte ficaram dentro dos intervalos do milho controle isogênico. Nos casos em que os valores médios encontrados não ficaram dentro do intervalo para o controle isogênico, os mesmos encontravam-se dentro do intervalo para referências comerciais na análise combinada dos 3 locais. Todos os valores médios encontrados para os componentes centesimais em forragem do milho MON 89034 x NK603 ficaram dentro dos intervalos estabelecidos no banco de dados ILSI-CCD. Resultados semelhantes foram observados com relação aos dados de composição centesimal em grãos de milho MON 89034 x NK 603. Apenas o valor médio de carboidratos em Cachoeira Dourada/MG ficou fora do intervalo de valores das referências na análise combinada de locais, mas ainda assim está dentro do intervalo de valores encontrado no ILSI-CCD, de forma que pode-se afirmar que esse componente tem valor que é comum à população de híbridos de milho em comércio, o que é importante em termos de segurança alimentar. Todos os demais valores médios encontrados para os componentes centesimais em grãos do milho MON 89034 x NK603 também ficaram dentro dos intervalos estabelecidos pelos valores encontrados no banco de dados ILSI-CCD. Com base nos dados de composição de grãos e forragem gerados em ambientes agrícolas brasileiros é possível concluir que o milho MON 89034 x NK603, é substancialmente equivalente ao milho convencional e, portanto, é tão seguro, saudável e nutritivo quanto o milho convencional.

As avaliações de segurança alimentar das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS incluíram a caracterização de cada uma delas, com ensaios de digestão simulada

em fluidos gástrico e intestinal, estudos de toxicidade oral aguda em camundongos e avaliações de bioinformática.

Um dos parâmetros importantes para determinar se uma proteína pode se tornar um alérgeno é a sua estabilidade no sistema gastrointestinal, pois uma resposta imune pode ser iniciada caso a proteína sobreviva à esta digestão e alcance a mucosa do intestino delgado ⁽³³⁾. Nos ensaios de digestão em fluidos gástrico e intestinal simulados, as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS foram rapidamente degradadas. Adicionalmente, as proteínas exógenas produzidas no piramidado estão presentes em concentrações abaixo daquelas preconizadas para o desenvolvimento de uma reação alérgica ^(34, 35). Análises de bioinformática demonstraram que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS não apresentam qualquer similaridade de sequência de aminoácidos com proteínas tóxicas e alérgenos conhecidos ^(36 até 44).

Adicionalmente, testes de toxicidade oral aguda em camundongos com as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS purificadas e testes de toxicidade sub-crônica, com essas proteínas sendo administradas em doses de magnitudes substancialmente acima das doses encontradas no consumo normal de milho, mostraram que elas não produzem efeitos adversos ^(45, 46, 47, 48) e, portanto, não são um problema de segurança alimentar para animais e humanos. Como as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS não produziram toxicidade nas doses máximas testadas nesses estudos mencionados acima, é altamente improvável que ocorra interação entre essas proteínas nas doses normais encontradas na alimentação, as quais pudessem causar efeitos aditivos ou sinérgicos. Existem inúmeras informações na literatura na área de toxicologia de misturas de químicos que demonstram que tais interações são inexistentes quando as substâncias são administradas nas doses substancialmente abaixo dos níveis de efeito adverso não observado (NOAEL = *no observed adverse effect level*) ^(49, 50, 51, 52).

A segurança para a alimentação animal e humana das proteínas Cry foi confirmada por diversos autores. Xu e colaboradores ⁽⁵³⁾ observaram que a proteína Cry1Ab/Ac foi rapidamente degradada em fluídos gástricos e intestinais, e não apresentou efeitos adversos em camundongos submetidos a uma dose aguda de 5 g (proteína Cry1Ab/Ac)/kg de peso corporal. Novamente observou-se que esta proteína não tem homologia de sequência com alergênicos ou toxinas conhecidas, nem sítios de N-glicosilação, confirmando que nenhum dano resultará da inclusão da proteína Cry1Ab/Ac no alimento humano ou na ração animal.

Outro recente estudo de 28 dias em ratos, realizado por Onose e colaboradores ⁽⁵⁴⁾ 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 no soro de animais que receberam tal milho, quando comparado com o controle. Entretanto, nenhuma mudança em pesos de órgãos ou mudanças histopatológicas foi observada em órgãos como coração, fígado e rins. Além disso, geralmente é observado que os níveis de soro AST se elevam com injúria ao tecido, mas a interpretação de mudanças relativamente pequenas em AST em estudos toxicológicos deve ser feita com parcimônia, uma vez que a amplitude de variação desse parâmetro pode ser ampla em animais saudáveis. A diminuição de AST neste experimento, portanto, não é considerada como sendo toxicologicamente significativa.

Healy e colaboradores ⁽⁵⁵⁾ apresentaram os resultados de um estudo de treze semanas de alimentação de ratos com grãos de milho piramidado 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 piramidado é tão seguro e nutritivo quanto os grãos dos híbridos de milho comerciais existentes. Adicionalmente, Paul e colaboradores ⁽⁵⁶⁾ estudaram a degradação da proteína Cry1Ab em milho geneticamente modificado em relação ao total das proteínas na digestão de vacas leiteiras. Os resultados indicaram que a proteína Cry1Ab é crescentemente

degradada durante a digestão nesses animais em pequenos fragmentos de 42 kDa, 34 kDa e 17 kDa.

Ainda, testes cutâneos com a proteína Cry1Ab em 27 crianças com histórico de alergia inalatória e 50 indivíduos com asma/rinite⁽⁵⁷⁾ 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⁽⁵⁸⁾.

Nesse sentido, pode-se citar também o trabalho publicado por Taylor e colaboradores⁽⁵⁹⁾ que descreve que frangos alimentados tanto com o milho piramidado quanto com o controle não transgênico apresentaram as mesmas características de crescimento e qualidade da carne, indicando a equivalência nutricional do milho MON89034 x NK603.

É importante destacar também que, a segurança das proteínas da família Cry tem sido comprovada desde quando preparações de *Bacillus thuringiensis* inteiros foram aprovadas para aplicação direta nas culturas como método biológico de controle de insetos daninhos, muito mais seguro para insetos não-alvo, para o meio ambiente e para humanos e animais do que os inseticidas químicos convencionais. Sendo completamente seguro para vertebrados (tomates assim tratados não precisam ser lavados antes da comercialização) é permitido o seu uso por aplicação direta em preparações contendo até quatro estirpes diferentes de bacilos para que o espectro de ação seja mais amplo sobre as diversas pragas existentes. Portanto temos exemplo de piramidação da proteína Bt por aplicação direta, desconsiderando possíveis efeitos tóxicos ou alérgicos potenciais das demais proteínas e componentes químicos do bacilo. Ademais, não há acidente pessoal ou ambiental relatado por algum produtor orgânico usuário destas formulações. A biologia moderna permitiu simplificar esta tecnologia, equipando o milho com genes que expressam endógenamente as proteínas inseticidas, a combinação de proteínas distintas ampliando o espectro de ação e efetividade sobre os insetos-praga. Outro benefício da tecnologia é a qualidade do milho obtido já que, como resultado de sua menor infestação por insetos o mesmo acaba sendo menos acometido por fungos, de forma que apresenta apreciável redução nas micotoxinas altamente tóxicas presentes, como fumonisina⁽⁶⁰⁾.

V. Aspectos Ambientais

A caracterização molecular do evento piramidado MON 89034 x NK 603 incluiu a confirmação da estabilidade dos genes transferidos por fecundação cruzada para o evento MON 89034 x NK603, demonstrada através de identificação inserto-específica em análises de *Southern Blot*. A presença de sinais de hibridização do tamanho esperado no milho piramidado quando comparado aos eventos individuais permitiu concluir que a estrutura dos genes *cry1A.105*, *cry2Ab2* e *cp4 epsps* está preservada no evento combinado, o que confirma a manutenção da integridade do evento MON 89034 x NK603.

Além disso, para a caracterização molecular do milho MON 89034 x NK 603 também foram realizadas análises de expressão das proteínas heterólogas. A expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS ocorre em todos os tecidos da planta uma vez que os promotores utilizados nas construções genéticas promovem sua expressão constitutiva. Os dados de expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS foram obtidos em experimentos com folhas, grãos e forragem, realizados no Brasil (safra 2007/2008) em três localizações distintas (Rolândia/PR; Não-Me-Toque/RS e Cachoeira Dourada/MG) representativas da produção de milho no país. Esses tecidos são relevantes para analisar a segurança alimentar do milho MON 89034 x NK603 como alimento humano e ração animal. Foram apresentados também os níveis das mesmas proteínas em amostras de folhas, sementes, raízes, forragem e pólen de plantas de milho

cultivadas em cinco locais na Argentina. As amostras foram analisadas pelo método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando anticorpos policlonais específicos para a proteína Cry1A.105 e anticorpos monoclonais para Cry2Ab2 e CP4 EPSPS.

Os resultados dos experimentos realizados no Brasil indicaram não haver variação substancial dos níveis de expressão das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 entre o milho MON 89034 x NK 603 e o evento único MON 89034 nos tecidos avaliados. Embora os níveis da proteína CP4 EPSPS também tenham sido determinados nos experimentos realizados no Brasil, o comparativo dos níveis de expressão entre o evento piramidado MON 89034 x NK 603 e o evento individual NK 603 foi determinado em experimentos realizados em 5 localidades da Argentina. Nestes ensaios também se demonstrou não haver variação na expressão da proteína CP4 EPSPS entre o milho piramidado e o evento parental NK 603. Conclui-se deste conjunto de análises que os níveis de expressão das proteínas heterólogas na planta de milho geneticamente modificada MON 89034 x NK 603 é comparável ao observado nos respectivos parentais, com uma baixa expressão dessas proteínas nos grãos e uma maior expressão em folhas, sendo intermediária na forragem.

Os resultados de caracterização molecular do milho MON 89034 x NK603 e de expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4 EPSPS apresentados mostram que os insertos dos eventos MON 89034 e NK603 estão presentes e funcionais no produto combinado, o milho MON 89034 x NK603.

Estudos de campo foram conduzidos na safra 2007/2008 em quatro locais (Rolândia/PR, Cachoeira Dourada/MG, Sorriso/MT e Não-Me-Toque/RS) com o objetivo de comparar o milho MON 89034 x NK603 ao milho controle convencional e às referências comerciais quanto ao vigor, estande inicial e final, 50% de plantas com pendão exposto, 50% de plantas com pólen, altura da planta, altura da espiga, maturação fisiológica, *stay green*, rendimento de grãos, peso de 1000 grãos e peso hectolítrico. Nos mesmo locais, na safra 2008/2009, foram avaliadas as mesmas características agrônômicas e fenotípicas porém agora comparando o milho MON 89034, o milho MON 89034 x NK603 sem aplicação de glifosato e o milho MON 89034 x NK603 com aplicação de glifosato ao milho controle convencional e às referências comerciais. Diferenças estatísticas significativas não foram detectadas entre o milho MON 89034 x NK603 e o milho controle na safra 2007/2008 e entre os milhos testados (milho MON 89034, milho MON 89034 x NK603 [sem glifosato] e milho MON 89034 x NK603 [com glifosato]) e o milho controle na safra de 2008/2009 para nenhuma das características agrônômicas e fenotípicas avaliadas indicando que as características fenotípicas do milho MON 89034 x NK603 foram típicas do milho cultivado no Brasil e, portanto, o potencial para que o milho MON 89034 x NK603 tenha um comportamento de planta daninha é considerado desprezível, quando comparado ao milho controle convencional.

Os dados também mostram a presença da característica de tolerância ao glifosato conferida pela expressão da proteína CP4 EPSPS e ainda, indicam que a característica de tolerância ao glifosato não modificou significativamente o desempenho das plantas em relação ao material convencional nas duas condições, sem glifosato e com glifosato para o controle de plantas daninhas. A ausência de características discrepantes no evento piramidado indica que o manejo utilizado para o milho convencional é também adequado para o milho piramidado, evitando que a expressão das proteínas de resistência represente um dreno no metabolismo primário das plantas, o que comprometeria o seu desempenho agrônômico ⁽⁶¹⁾.

Juntamente com o estudo de características agrônômicas realizado Rolândia/PR, Cachoeira Dourada/MG, Sorriso/MT e Não-Me-Toque/RS na safra 2008/2009 também foram avaliados os danos causados por lepidópteros praga. Os resultados de danos causados por lepidópteros praga em folhas, espiga e colmo no milho MON 89034, no

milho MON 89034 × NK603 (sem glifosato) e no milho MON 89034 × NK603 (com glifosato) foram significativamente inferiores em comparação aos resultados das plantas controle (controle convencional e referências comerciais). Para outras características como podridão de espigas ou colmo os resultados são menores, mas não significativamente inferiores. As notas de podridão de espiga e haste denotam que o menor ataque de lepidópteros praga às plantas geneticamente modificadas pode estar retardando a entrada de fungos mas não os impedindo. Isso tem importância na segurança alimentar, conforme já mencionado anteriormente, uma vez que esses fungos são responsáveis pela produção das micotoxinas.

Coletas de artrópodes realizadas nas quatro regiões não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos avaliados para diversos organismos pertencentes a várias ordens como Orthoptera (Gryllidae), Homoptera (Cicadellidae), Diptera (Cyclorhapha), Dermoptera, Hymenoptera (Formicidae, Apidae), Coleoptera (Elateridae) e Araneae. Baseado nestes resultados, bem como no conhecimento existente sobre as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2^(62, 63), confirma-se a manutenção da seletividade da atividade inseticida do evento piramidado contra insetos-alvo da Ordem Lepidoptera e a ausência de efeito em insetos não-alvo avaliados.

O número de plantas voluntárias não diferiu entre os tratamentos testados nos diferentes locais avaliados. Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatísticas entre a altura das plantas, no rendimento e no período de formação de pólen. As amostras de solo coletadas nos tratamentos a campo apresentaram valores médios (pH, Ca, Mg, P, Al, argila, silte, areia) dentro dos intervalos de referência para o milho, não ocorrendo valores discrepantes entre os tratamentos dentro de cada região avaliada.

Em conjunto, os resultados das avaliações agrônômicas e os dados sobre o controle de danos causados por lepidópteros-praga demonstram a presença da característica de tolerância ao glifosato e que esta não modificou significativamente o desempenho das plantas no controle de insetos alvo em relação ao material convencional nas duas condições, sem glifosato e com glifosato. Esses dados mostram que não há interação entre as proteínas Cry (Cry1A.105 e Cry2Ab2) e CP4 EPSPS que de alguma maneira venha a interferir na resistência do milho MON 89034 × NK603 aos lepidópteros alvo. Portanto, atestam a eficácia no controle de pragas alvo e também a presença da característica de tolerância ao glifosato no milho MON 89034 × NK603. A avaliação dessas características possibilita afirmar que o milho MON 89034, o milho MON 89034 × NK603 (com ou sem glifosato) e o milho controle são substancialmente equivalentes, exceto para as características específicas de cada gene introduzido.

Outra questão de cunho ambiental se refere ao fluxo gênico de milho geneticamente modificado e os efeitos que isso poderia causar em milho convencional. A possibilidade de que haja a polinização cruzada entre uma planta geneticamente modificada e outra convencional, seguida de introgressão, está relacionada com a disponibilidade e a viabilidade do pólen do parental geneticamente modificado e a entrega desse pólen no estigma do parental convencional. Essa disponibilidade dependerá da época de plantio e das condições agrônômicas. Ao passo que a entrega de pólen no estigma depende do vento, de vetores, da distância, de precipitação e de barreiras naturais à movimentação do pólen. Assim, a eficiência da polinização cruzada dependerá, concomitantemente, do tempo de florescimento do parental receptor e do parental doador, da viabilidade do pólen e da capacidade de competição deste pólen. É preciso considerar também que os grãos de pólen de milho são grandes e pesados, o que reduz as distâncias de dispersão sendo que a maior deposição ocorre próxima à planta doadora^(64, 65). A dispersão de 98% do pólen ocorre até 25 metros do campo emissor e quase 100% até 100 metros de distância, sendo que a maior parte (99%) da polinização cruzada fora do campo emissor ocorre até 18 a 20 metros das suas bordas⁽⁶⁶⁾. As condições climáticas (e direção do vento) e as barreiras físicas afetam a dispersão do

pólen e a taxa de polinização cruzada do milho, sendo que barreiras mais próximas são mais eficientes. A dispersão de pólen do milho MON 89034 x NK603 pode, portanto, ser controlada para que a co-existência de plantios convencionais, orgânicos e geneticamente modificados seja possível⁽⁶⁶⁾, assim como já é naturalmente efetuado quando genótipos para diferentes usos (produção de semente, alimentação humana, raças crioulas, etc.) são produzidos em áreas contíguas.

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 GM e não OGM fora do ambiente agrícola. Além disso, na ausência de pressão seletiva (uso do herbicida e dos inseticidas), a expressão dos genes inseridos não conferem 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”.

Os estudos apresentados pela requerente demonstram que não ocorreram diferenças significativas entre o milho geneticamente modificado e sua isolinha convencional com relação às características agrônômicas, 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 microbiota do solo, bem como a outros vegetais e à saúde humana e animal. Assim, o cultivo e o consumo do milho MON 89034 x NK 603 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.

Após 15 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 ao milho transgênico. 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 variedades transgênicas na agricultura.

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 x NK603 pertence a espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano e que os genes *cry1A.105*, *cry2Ab2* 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* e *cp4 epsps*, os quais proporcionaram resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato;

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 ainda que:

1. O evento MON 89034 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 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 e CP4 EPSPS no milho MON 89034 x NK603 não é significativamente diferente da expressão observada nos eventos parentais separadamente;
5. Não há indícios de que as proteínas expressas causem alergia ou intoxicação em humanos e animais;
6. As avaliações agrônômicas e de eficácia do milho MON 89034 x NK603 indicaram que a combinação destes eventos por métodos de melhoramento genético clássico (cruzamentos sexuais) não levou à expressão de qualquer outra característica que não aquela esperada, ou seja, a resistência a certos insetos e tolerância a herbicida glifosato;
7. Não foram evidenciadas alterações botânicas no milho MON 89034 x NK 603 que possam conferir vantagens adaptativas;
8. Os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas no que tange a eventos piramidados⁽⁶⁷⁾;
9. As demais análises de risco realizadas por países que já avaliaram o milho piramidado MON89034 x NK603^(62, 68).

É possível concluir que o milho MON 89034 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 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 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, ressalvados aspectos de sigilo comercial previamente justificados e definidos como tal.

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

II) – Ações técnicas de monitoramento a serem executadas:

1 – Com relação ao gene *cp4 epsps*, 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* e *cry2Ab2*, 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 dois 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, realizados por terceiros.

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 2009-10. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_11_12_14_45_40_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. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. CTNBio 2009. Parecer Técnico 2052/2009. Publicado no Diário Oficial da União de 16/10/2009, Seção 1, pag. 3.
6. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. CTNBio 2008. Parecer Técnico 1596/2008. Publicado no Diário Oficial da União de 14/10/2008, Seção 1, pag. 3.
7. Center for Environmental Risk Assessment. GM Crop Database 2010 (http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database).
8. Monsanto do Brasil. 2008. Relatório Técnico Liberação Comercial Milho MON 89034.
9. Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, e D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 62:807-13.
10. Gill, S.S., E.A. Cowles, e P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann. Rev. Entomol. 37:615-636.
11. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, e D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.
12. Zhuang, M., e S.S. Gill. 2003. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins., p. Pp 213-236, In G. Voss and G. Ramos, eds. Chemistry of Crop Protection, Progress and Prospects in Science and Regulation. Wiley-VCH, Weinheim, Germany
13. Griffiths and Aroian, 2005 J. Griffiths and R. Aroian, Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins, BioEssays 27 (2005), pp. 614–624.
14. Shimada, N., Miyamoto, K., Kanda, K., Murata, H., 2006a. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ab toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial cells: an in vitro study. In vitro Cellular and Developmental Biology - Animal, 42: 45-49.

15. DULMAGE, H. T. Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980. In: BURGESS, H. D. (Ed). London: Academic Press, 1981. p. 193-222.
16. KLAUSNER, A. Microbial insect control. *Bio/Technology*, v. 2, p. 408-419, 1984.
17. ARONSON, A. I.; BACKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.*, v. 50, p. 1-24, 1986.
18. 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.
19. 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.
20. CANTWELL, G. E.; LEHNERT, T.; FOWLER, J. Are biological insecticides harmful to the honey bee. *Am. Bee J.*, v. 112, p. 294-296, 1972.
21. 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.
22. 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.
23. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidance for the re-registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. Springfield, VA.: US EPA/National Technical Information Service, 1988. v. 89, p. 164-198.
24. Monsanto do Brasil Ltda. 2004. Avaliação de Biossegurança do Milho NK 603 tolerante ao glifosato. Processo: 01200.002293/2004-16.
25. Padgett, SR., G.F. Barry, D.B. Re, D.A. Eichholtz, M. Weldon, K. Kolacz, 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.
26. TAYLOR, M.L.; HARTNELL, G.; NEMETH, M.; KARUNANANDAA, K.; GEORGE, B. 2005. Comparison of broiler performance when fed diets containing corn grain with insect-protected (corn rootworm and European corn borer) and herbicide-tolerant (glyphosate) traits, control corn, or commercial reference corn—revisited. *Poult. Sci.* 84: 1893-1899.
27. TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204.
28. SILVA-WERNECK, J.O.; SOUZA, M.T.; DIAS, J.M.C.S.; RIBEIRO, B.M. 1999. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain S93 effective against the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Canadian Journal of Microbiology* 45: 464-471.
29. Haslam, E. 1993. Shikimic acid: metabolism and metabolites. University of Sheffield, UK;
30. Steinrücken, H.C.; Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl- shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94:1207-1212.
31. Monsanto do Brasil Ltda. 2009. Relatório de Biossegurança Ambiental e Alimentar do Milho MON 89034 × NK603. Processo: 01200.003952/2009-38.

32. International Life Sciences Institute (ILSI) 2006. Crop Compositions Database, Version 3.0. <http://www.cropcomposition.org>. Search criteria: corn seed or corn forage, all locations, all years, all proximates dry weight, other than moisture. Acessado em 17 de fevereiro de 2009.
33. Kimber, I., N.I. Kerkvliet, S.L. Taylor, J.D. Astwood, K. Sarlo, e R.J. Dearman. 1999. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. *Toxicol Sci* 48:157-62.
34. Fuchs, R.L. 1996a. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food technology* 50:83-88.
35. Fuchs, R.L. 1996b. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered plants: glyphosate tolerant soybean as a case study. *DFG: Food allergies and intolerances Chapter 17*:212-221.
36. Astwood, J.D., e R.L. Fuchs. 1996a. Allergenicity of Foods Derived from Transgenic Crops. *Monographs in Allergy*:105-120.
37. Astwood, J.D., R.L. Fuchs, e P.B. Lavrik. 1996b. *Food biotechnology and genetic engineering. second edition ed.*, St Louis
38. Metcalfe, D., J. Astwood, T. R., S. H., T.M. L., e F. R. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36:165-186.
39. Astwood, J.D. 1995a. *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 insecticidal protein (Btk HD-1 protein) is homologous to proteins of the Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein gene family, but not to protein toxins found in public domain sequence databases.* Monsanto Technical Report MSL 14283.
40. Astwood, J.D. 1995b. *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 insecticidal protein (Btk HD-1 protein) shares no significant sequence similarity with proteins associated with allergy or coeliac disease.* Monsanto Technical Report MSL 14172.
41. Croon, K.A., R.S. Sidhu, e C. Deatherage. 2000a. Safety, Compositional and nutritional aspects of Roundup Ready corn line NK603. Conclusions based on studies and information evaluated according to FDA's policy on foods from plant varieties (FDA - Food and Feed Safety). (February/2000). Monsanto Company, St. Louis, MO, USA
42. Croon, K.A., R.S. Sidhu, e C. Deatherage. 2000b. Request for extension of determination of nonregulated status for Roundup Ready corn line NK603 (USDA - Nonregulated Status). (January/2000). Monsanto Company, St. Louis, MO, USA.
43. Croon, K.A., T.G.A. Clemence, R.S. Sidhu, C. Deatherage, L.K. Lahman, E. Jacobs, e J. Costa. 2001. Application for consent to place on the market NK603 Roundup Ready® maize for import and use as any other maize, including the cultivation of varieties, in the European Union. . Monsanto Company represented by Monsanto Europe S.A., Brussels, Belgium
44. Rice, E.A., R.E. Goodman, A. Silvanovich, R.E. Hieman, e J.D. Astwood. 2001. Bioinformatic analysis of the CP4 EPSPS protein utilizing ALLERGEN3 and current public domain sequence databases. Monsanto Technical Report MSL 17172.
45. McClintock, J.T., R.D. Sjoblad, e R. Engler. 1992. Toxicological evaluation of genetically engineered plant pesticides. *Food Safety Assessment, ACS Symposium Series 484*:41-47.

46. Mcclintock, J.T., C.R. Schaffer, e R.D. Sjoblad. 1995a. A Comparative Review of the Mammalian Toxicity of Bacillus Thuringiensis-Based Pesticides. *Pesticide Science* 45:95-105
47. Pariza, M.W., e E.A. Johnson. 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul Toxicol Pharmacol* 33:173-86.
48. Harrison, L., M. Bailey, M. Naylor, J. Ream, B.G. Hammond, D. Nida, e B. Burnette. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *Journal of Nutrition* 126:728-740.
49. Groten, J.P., E.D. Schoen, P.J. Van Bladeren, C.F. Kuiper, J.A. van Zorge, e V.J. Feron. 1997. Subacute toxicity of a mixture of nine chemicals in rats: detecting interactive effects with a fractionated two level factorial design. *Fundam. Appl. Toxicol.* 36:15-29.
50. Jonker, D., R.A. Woutersen, e V.J. Feron. 1996. Toxicity of mixtures of nephrotoxins with similar or dissimilar mode of action. *Food Chem. Toxicol.* 34:1075-1082.
51. Jonker, D., R.A. Woutersen, P.J. van Bladeren, H.P. Til, e V.J. Feron. 1990. 4-week oral toxicity of a combination of eight chemicals in rats: comparison with the toxicity of the individual compounds. *Food Chem. Toxicol.* 28:623-631.
52. Jonker, D., R.A. Woutersen, P.J. van Bladeren, H.P. Til, e V.J. Feron. 1993. Subacute (4-wk) oral toxicity of a combination of four nephrotoxins in rats: comparison with the toxicity of the individual compounds. *Food Chem. Toxicol.* 31:125-136.
53. XU, W.; CAO, S.; HE, X.; LUO, Y.; GUO, X.; YUAN, Y.; HUANG, K. Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein. *Food Chemistry Toxicology*, 47, 1459-1465, 2009
54. ONOSE, J.; IMAI, T.; HASUMURA, M.; UEDA, M.; OZEKI, Y.; HIROSE, M. Evaluation of subchronic toxicity of dietary administered Cry1Ab protein from Bacillus thuringiensis var. Kurustaki HD-1 in F344 male rats with chemically induced gastrointestinal impairment. *Food Chemistry Toxicology*, 46, 2184-2189, 2008.
55. HEALY, C.; HAMMOND, B.; KIRKPATRICK, J. 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, 2008
56. PAUL, V.; GUERTLER, P.; WIEDEMANN, S.; MEYER, H.H. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total dietary feed proteins in dairy cow digestion. *Transgenic Research*, PubMed PMID: 19888668, 2009
57. BATISTA, R.; NUNES, B.; CARMO, M.; CARDOSO, C.; JOSE, H.S.; ALMEIDA, A.B.D. MANIQUE, A.; BENTO, L.P., RICARDO, C.P. E OLIVEIRA, M.M. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:403-410, 2005
58. TAKAGI, K.; TESHIMA, R. e NAKAGIMA, O. 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, 2006

59. Taylor, M.; Lucas, D.; Nemeth, M.; Davis, S.; Hartnell, G. 2007. Comparison of Broiler Performance and Carcass Parameters When Fed Diets Containing Combined Trait Insect-Protected and Glyphosate-Tolerant Corn (MON 89034 × NK603), Control, or Conventional Reference Corn. Poultry Science Association Inc.
60. Wu F, Miller JD, Casman, EA (2004) The economic impact of Bt corn resulting from mycotoxin reduction. Journal of Toxicology 23:397-424.
61. Heil, M.; Baldwin, I. T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. Trends in Plant Science. 7(2):61-67.
62. Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment. Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for MON89034×NK603
63. World Health Organization, 1999. Microbial Pest Control Agent: Bacillus thuringiensis. Environmental Health Criteria 217.
64. SANDERS, P. R.; LEE, T. C.; GROTH, M. E.; ASTWOOD, J. D.; FUCHS, R. L. Safety assessment of insect-protected corn. In: THOMAS, J. A. Biotechnology and Safety Assessment. 2 ed. Taylor and Francis, 1998. p. 241-256.
65. 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.
66. BROOKES, G.; BARFOOT, P.; MELÉ, E.; MESSEGUER, J.; BÉNÉTRIX, F. BLOC, D.; FOUEILLASSAR, X; FABIÉ, A.; POEYDOMENGE, C. 2004. Genetically modified maize: pollen movement and crop co-existence. Dorchester, UK: PG Economics, 20pp.
67. 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.
68. 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

Brasília, 18 de novembro de 2010

Edilson Paiva
Presidente da CTNBio

Assessora Técnica: Thais Haline Vaz

Voto divergente:

Os membros da CTNBio Dr. José Maria Gusman Ferraz e Dr. Leonardo Melgarejo, ambos da Subcomissão Setorial Permanente da Área Ambiental, e Dra. Graziela Almeida da Silva, da Subcomissão Setorial Permanente da Área Humana, votaram contrariamente à

liberação comercial do milho MON 89034 x NK603. O Dr. Pedro Canísio Binsfeld (Subcomissão Setorial Permanente da Área Animal) se absteve da votação.

O relator Dr. José Maria Gusman Ferraz emitiu parecer contrário à aprovação deste produto por considerar que a literatura disponível apresenta informações de que existem evidências de risco, pelos argumentos expostos a seguir:

1. O item equivalência substancial utilizado seria questionável frente aos estudos apresentados;
2. Não existiriam estudos toxicológicos com a toxina da planta geneticamente modificada (PGM);
3. Haveria grandes riscos, não avaliados, de ocorrência de efeitos pleiotrópicos e de epistasia;
4. Haveria possíveis riscos à saúde humana e animal e impactos ao meio ambiente advindos do aumento do resíduo do herbicida no milho;
5. Haveria falta de informação e conseqüentemente possibilidade de dano aos organismos não-alvo que agem no controle biológico natural e sobre a biota do solo, e em abelhas, notadamente nas nativas;
6. Existiriam fatos que reforçariam a atenção e responsabilidade associada à uma liberação comercial de organismos geneticamente modificados, pois esta implicaria em situações de saúde pública, ambiental e social diretamente correlacionadas à ela.