



PARECER TÉCNICO Nº /2015

Processo nº 01200.002046/2013-01

Requerente: Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda.

CQB: 107/99

Próton: 19467/2013

Assunto: Liberação comercial de milho MON89034 x MON88017 x TC1507 x DAS-59122-7, com vistas ao livre uso no meio ambiente, registro, consumo humano ou animal, comércio ou uso industrial e qualquer outro uso ou atividade relacionado ao Evento ou seus subprodutos.

Extrato Prévio: 3617/13 publicado em 25 de maio de 2013.

Reunião: 179ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 05 de fevereiro de 2015

Decisão: (x) DEFERIDO

() INDEFERIDO

() DILIGÊNCIA

A CTNBio, após apreciação do processo da Solicitação de Parecer para Liberação comercial de milho geneticamente modificado, **concluiu pelo deferimento**, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

1) Fundamentação técnica

PARECER SOBRE LIBERAÇÃO COMERCIAL DO MILHO MON89034 x MON88017 x TC1507 x DAS-59122-7.

SOLICITAÇÃO:

O milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 é resultado da combinação por cruzamento genético clássico dos eventos singulares MON 89034, MON 88017, TC1507 e DAS-59122-7. O evento MON 89034 contém os genes *cry2Ab2* e *cry1A.105*, que codificam as proteínas CRY2Ab2 e CRY1A.105, envolvidas no controle de lepidópteros que atacam o milho. O evento MON 88017 contém os genes *cry3Bb1* e *cp4 epsps* que codificam as proteínas CRY3Bb1 e CP4 EPSPS, que controla coleópteros que atacam o milho e confere tolerância ao herbicida glifosato, respectivamente. O evento TC1507 contém os genes *cry1F* e *pat* que codificam as proteínas CRY1F e PAT, que controla lepidópteros que atacam o milho e confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, respectivamente. O evento DAS-59122-7 contém os genes *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat*, que codificam as proteínas CRY34Ab1, CRY35Ab1 que controlam coleópteros que atacam o milho e a proteína PAT, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

O milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 expressa portanto as proteínas CRY2Ab2, CRY1A.105, CRY3Bb1, CP4 EPSPS, CRY1F, CRY34Ab1, CRY35Ab1 e PAT, codificadas pelos genes herdados presentes nos quatro eventos parentais, ou seja, apresentam resistência a determinados insetos da parte aérea e das raízes do milho, ao mesmo tempo em que apresenta tolerância às aplicações foliares dos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato.

O milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 foi desenvolvido com o objetivo de fornecer ao produtor uma alternativa simples, eficiente e ambientalmente favorável para o controle de importantes pragas que infestam a cultura do milho (alguns lepidópteros e coleópteros) e para o controle de plantas daninhas com o uso dos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato. Estudos a campo conduzidos com autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) demonstraram a eficácia, a praticabilidade agrônômica e a biossegurança do uso do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 para cultivo em nosso país.

Relatoria: Dr. José F Garcia e Paulo Lee Assessoria: Rubens J Nascimento
SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10
Brasília, DF – CEP: 70610-200
Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317 7475
e-mail: secretariactnbio@mct.gov.br

PRÓTON: 35236 / 15

A adoção desta tecnologia trará benefícios potenciais como a diminuição do uso de inseticidas para o controle de alguns insetos praga, e a utilização dos herbicidas glufosinato de amônio ou glifosato em pós-emergência da cultura do milho, como contribuição para o manejo de resistência de plantas daninhas a outros grupos químicos de herbicidas.

Este produto não difere do milho convencional em sua composição química e nutricional, exceto pela presença e expressão dos genes *cry2Ab2*, *cry1A.105*, *cry3Bb1*, *cp4 epsps*, *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat*, que conferem resistência a alguns insetos e tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato.

O cultivo do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 e o consumo da planta ou de seus derivados não causará efeitos adversos ao meio ambiente ou à saúde humana e/ou animal, sendo tão seguro quando o milho convencional. As proteínas codificadas pelos genes citados não apresentam similaridade com as proteínas consideradas alergênicas ou tóxicas conforme atestado em pareceres anteriores sobre a ocorrência dos mesmos eventos.

O milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7, à semelhança do milho convencional, não exibe tendência a proliferar-se como erva daninha e não é invasivo em ecossistemas naturais. Nenhuma vantagem competitiva será proporcionada pelos genes *cry2Ab2*, *cry1A.105*, *cry3Bb1*, *cp4 epsps*, *cry1F*, *pat*, *cry34Ab1* e *cry35Ab1* introduzidos no milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7, quando comparado ao milho convencional.

A linhagem de milho que contém o evento MON 89034 foi obtida por transformação genética mediada por *Agrobacterium* com a inserção de um fragmento de restrição do plasmídeo vetor PV-ZMIR245, que possui uma construção gênica que contém o gene *cry2Ab2*, de *Bacillus thuringiensis*, e o gene *cry1A105* que se originou do micro-organismo *Streptomyces viridochromogenes*. Os genes *cry2Ab2* e *cry1A.105* codificam as proteínas CRY2Ab2 e CRY1A.105, que conferem às plantas de milho proteção contra o ataque de determinados insetos da ordem Lepidoptera considerados importantes pragas do milho. Entre estes insetos praga estão a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), a broca do colmo (*Diatraea saccharalis*) e a lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*).

A linhagem de milho MON 88017 foi obtida por transformação genética mediada por *Agrobacterium* com a inserção de um fragmento de restrição do plasmídeo vetor PV-ZMIR39, que contém uma construção gênica constituída pelos genes *cry3Bb1* originário de *Bacillus thuringiensis* e *cp4 epsps* proveniente de *Agrobacterium* cepa CP4, que codificam as proteínas CRY3Bb1 e CP4 EPSPS, que conferem às plantas de milho proteção contra determinadas espécies de insetos praga de raiz do gênero *Diabrotica* e tolerância ao herbicida glifosato.

A linhagem de milho que contém o evento TC1507 foi obtida por transformação genética com a inserção de um fragmento de restrição do plasmídeo PHP8999 contendo construção gênica que possuía o gene *cry1F*, de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, e o gene *pat* que se originou do micro-organismo *Streptomyces viridochromogenes*. O gene *cry1F* codifica a proteína CRY1F, que confere às plantas de milho proteção contra o ataque de determinados insetos da ordem Lepidoptera considerados importantes pragas do milho. Entre estes insetos praga estão a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e a broca do colmo (*Diatraea saccharalis*). O gene *pat* expresso no milho TC1507 codifica a proteína fosfotricina acetiltransferase (PAT), que confere às plantas tolerância às aplicações foliares do herbicida glufosinato de amônio.

A linhagem de milho DAS-59122-7 foi obtida por transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Neste processo, a construção gênica compreendida entre as bordas L e R do plasmídeo PHP17662 foi transferida para o genoma da célula vegetal. A construção gênica do evento DAS-59122-7 foi constituída pelos genes *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat*. Os genes *cry34Ab1* e *cry35Ab1* codificam as proteínas CRY34Ab1 e CRY35Ab1 do *Bacillus thuringiensis*, que quando expressas conferem às plantas de milho proteção contra determinadas espécies de insetos praga de raiz do gênero *Diabrotica*. O gene *pat* expresso no milho DAS-59122-7 codifica a proteína fosfotricina acetiltransferase (PAT) do *Streptomyces viridochromogenes*, que confere às plantas tolerância às aplicações foliares do herbicida glufosinato de amônio.

O evento MON 89034 foi aprovado pela CTNBio para cultivo comercial no Brasil (Extrato de Parecer Técnico nº 2052/2009, publicado no D.O.U. em 16/10/2009), e possui aprovações para cultivo e/ou consumo

Relatoria: Dr. José F Garcia e Paulo Lee

Assessoria: Rubens J Nascimento

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

Brasília, DF – CEP: 70610-200

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

e-mail: secretariactnbio@mct.gov.br

PRÓTON: _____ / _____

humano e/ou consumo animal na Argentina, Austrália, Canadá, China, Colômbia, Estados Unidos, União Europeia, Honduras, Indonésia, Japão, México, Nova Zelândia, Filipinas, Rússia, Singapura, África do Sul, Coreia do Sul, Taiwan, Tailândia, Turquia e Vietnã.

O evento MON 88017 foi aprovado pela CTNBio para cultivo comercial no Brasil (Extrato de Parecer Técnico nº 2764/2010, publicado no D.O.U. em 17/12/2010), e possui aprovações para cultivo e/ou consumo humano e/ou consumo animal na Argentina, Austrália, Canadá, China, Colômbia, Estados Unidos, União Europeia, Honduras, Japão, México, Nova Zelândia, Filipinas, Rússia, Singapura, África do Sul, Coreia do Sul, Taiwan, Tailândia, Turquia e Vietnã.

O evento TC1507 foi aprovado pela CTNBio para cultivo comercial no Brasil (Extrato de Parecer Técnico Nº1679/2008, publicado no D.O.U. em 15/12/2008), e possui aprovações para cultivo e/ou consumo humano e/ou consumo animal na Argentina, Austrália, Canadá, China, Colômbia, Estados Unidos, União Europeia, Honduras, Japão, Malásia, México, Nova Zelândia, Panamá, Filipinas, Singapura, África do Sul, Coreia do Sul, Taiwan, Turquia e Uruguai.

O milho portador do evento DAS-59122-7 foi submetido à aprovação da CTNBio para cultivo comercial no Brasil, e possui aprovações para cultivo e/ou consumo humano e/ou consumo animal nos Estados Unidos, Austrália, Canadá, China, Colômbia, União Europeia, Japão, Coreia, México, Filipinas, Taiwan e Turquia.

O evento combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 possui aprovações nos Estados Unidos, Canadá, Colômbia, Japão, Coreia, México, Filipinas e Taiwan.

As características da planta geneticamente modificada, as informações coletadas durante os testes no campo e as análises laboratoriais apresentadas no dossiê comprovam que o cultivo e consumo do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 é tão seguro à saúde humana e/ou animal quanto o milho convencional e, ainda, pode trazer benefícios aos agricultores e consumidores. Também está incluído na solicitação o plano de monitoramento proposto.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA :

O milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 possui os exógenos presentes nos eventos simples MON 89034 (*cry1A.105* e *cry2Ab2*), MON 88017 (*cry3Bb1* e *cp4 epsps*), TC1507 (*cry1F* e *pat*) e DAS-59122-7 (*cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat*), que foram combinados por melhoramento clássico.

Os genes *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *cry1F* codificam as proteínas CRY34Ab1, CRY35Ab1 e CRY1F, respectivamente, e são provenientes do micro-organismo de solo *Bacillus thuringiensis*. As proteínas CRY34Ab1 e CRY35Ab1 são específicas para a defesa das plantas contra determinados insetos praga de raiz da ordem Coleoptera e a proteína CRY1F tem ação específica contra certos insetos praga da ordem Lepidoptera.

O gene *pat* codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT), isolada do micro-organismo não patogênico *Streptomyces viridochromogenes*. Esta enzima garante à planta a tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

O gene *pat* é atualmente o principal gene marcador utilizado em estudos de biologia vegetal que incluem transformação genética. O milho combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 possui duas cópias deste gene, uma oriunda do evento TC1507 e outra, oriunda do evento DAS-59122-7.

Tanto os genes do tipo *cry* quanto o gene *pat* estão presentes em diversos eventos já aprovados comercialmente em vários países. Genes bastante semelhantes em estrutura e mecanismo de ação já vêm sendo amplamente utilizados na agricultura mundial há mais de 15 anos, sem que se tenha reportado qualquer ocorrência de efeito adverso associado a expressão destes genes.

PARECER:

A equivalência substancial do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 comparativamente ao milho convencional, a não similaridade com proteínas consideradas alergênicas ou tóxicas e a rápida desnaturação e degradação das proteínas CRY1F, CRY34Ab1, CRY35Ab1, PAT, CRY2Ab2, CRY1A.105,

Relatoria: Dr. José F Garcia e Paulo Lee

Assessoria: Rubens J Nascimento

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

Brasília, DF – CEP: 70610-200

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

e-mail: secretariactnbio@mct.gov.br

PRÓTON: _____/_____

CRY3Bb1 e CP4 EPSPS durante o seu processamento, garantem a segurança do consumo do milho GM e/ou de seus produtos derivados.

Análises de composição nutricional do milho combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7, em comparação ao milho convencional, mostram semelhança entre os dois produtos com relação ao teor de proteínas, fibras, carboidratos, óleos, cinzas, minerais, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, metabólitos e anti-nutrientes.

Essa similaridade confirma dados publicados em literatura científica relacionada, que descrevem a presença dos genes *cry* como capazes de conferir controle de insetos praga e dos genes *pat* e *cp4 epsps* como capazes de condicionar a tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato, não causando alterações na composição nutricional do OGM, além daquelas que podem ser causadas por fatores bióticos e abióticos.

Os níveis de componentes bioativos, quando quantificados nas amostras de milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7, foram estatisticamente semelhantes aos do milho convencional, com variação observada dentro de intervalos-padrão relatados em literatura.

Nenhuma homologia significativa foi observada entre as proteínas CRY1F, CRY34Ab1, CRY35Ab1 e PAT com relação às proteínas conhecidas como alergênicas ou tóxicas. Esta afirmação também atende às diretrizes formuladas por Gendel (1998) e FAO/WHO (2001), não se detectando similaridades entre essas proteínas CRY1F, CRY34Ab1, CRY35Ab1 e PAT e proteínas alergênicas conhecidas. Após mais de 30 anos de uso comercial, não se conhece qualquer ocorrência de reações alérgicas decorrentes de produtos inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (EPA, 1995a).

As modificações genéticas do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 não alteram as condições de processamento utilizadas para o milho comum, as quais são amplamente conhecidas, tendo sido adquiridas ao longo do tempo.

Com base nestes resultados foi possível demonstrar que o milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 não expressa qualquer proteína tóxica ou alergênica conhecida, de forma que o consumo de milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 e/ou seus produtos é tão seguro quanto o consumo do milho convencional e/ou seus produtos, com relação aos efeitos na cadeia alimentar humana e/ou animal pela ingestão deste OGM e seus derivados.

A transferência de material genético proveniente de grãos de milho ou de produtos feitos à partir de milho, para micro-organismos no sistema gastrointestinal humano é remota. Não existe nenhum mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva de que o DNA poderia se transferir de plantas para micro-organismos (Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh *et al.* 1994; Prins & Zadoks, 1994; Schluter *et al.* 1999) ou diretamente das plantas para células epiteliais no intestino (FDA, 1994; Calgene, 1993). Em *workshop* da OMS (WHO, 1993), sobre a segurança de marcadores para seleção de recombinantes em plantas, cientistas de vários países, presentes no evento, revisaram a informação sobre transferência horizontal de genes não encontrando qualquer indício dessa ocorrência, o que faz valer até hoje o que foi revisado naquela ocasião.

Estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos, que serão detalhados a seguir, demonstram que o milho combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 não difere do milho convencional em relação à composição química e nutricional, confirmando a segurança alimentar do produto combinado. A análise de composição do grão e de silagem (ração) confirma que o milho combinado é substancialmente equivalente ao milho não modificado geneticamente e, por conseguinte, de valor nutritivo comparável.

Outros estudos com os quatro eventos individuais, com os eventos combinados duplos do milho MON 89034 x MON 88017 e TC1507 x DAS-59122-7 e com os eventos singulares foram realizados anteriormente no Brasil e no exterior. Alguns desses estudos realizados no país serão discutidos a seguir para demonstrar que a combinação dos eventos individuais através de cruzamentos clássicos não produzem interações capazes de alterar a composição nutricional do milho combinado.

Para demonstrar a segurança desses eventos, foram comparadas as características do milho geneticamente modificado com o milho convencional de mesmo *background* genético do OGM, para permitir a análise precisa dos efeitos dos genes exógenos na segurança ambiental do produto.

Relatoria: Dr. José F Garcia e Paulo Lee Assessoria: Rubens J Nascimento
SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10
Brasília, DF – CEP: 70610-200
Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317 7475
e-mail: secretariactnbio@mct.gov.br

PRÓTON: _____/_____

Nesses estudos foram utilizados híbridos comercialmente aprovados e cultivados no país, em ambas as versões, para a análise comparativa de melhor qualidade, evitando com isso o possível confundimento com o uso de germoplasma não adaptado nas comparações.

Estudos de segurança alimentar foram realizados no Brasil com os eventos individuais TC1507 e DAS-59122-7, e com o evento combinado TC1507 x DAS-59122-7 (componentes do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7), em Unidades da Dow AgroSciences Sementes e Biotecnologia Ltda., de 2007 a 2010 e sendo demonstrado que não há diferenças entre o milho OGM e o milho convencional.

Os estudos realizados no Brasil demonstraram que o milho combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7, bem como os eventos individuais MON 89034, MON 88017, TC1507 e DAS-59122-7, e os eventos combinados parentais MON 89034 x MON 88017 e TC1507 x DAS-59122-7 não diferem do milho convencional na composição química e nutricional. Apenas diferem nas características de resistência aos insetos pela expressão dos genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry2Ab2*, *cry1A.105* e *cry3Bb1*, na tolerância aos herbicidas à base de glufosinato de amônio pela expressão do gene *pat* e pela tolerância ao glifosato pela expressão do gene *cp4 epsps*.

A análise de composição do grão e de silagem (ração) confirma que a linhagem de milho com evento combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 é substancialmente equivalente ao milho não geneticamente modificado e, conseqüentemente, de valor nutritivo comparável.

Os estudos de alimentação animal foram realizados com os eventos singulares MON 89034, MON 88017, TC1507 e DAS-59122-7, bem como com os eventos combinados MON 89034 x MON 88017 e TC1507 x DAS-59122-7 e finalmente com evento combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 envolvendo os quatro eventos singulares.

Os estudos apresentados no dossiê dos eventos simples, comparativamente aos eventos combinados, mostraram que não ocorre interação entre os genes dos eventos quando combinados por melhoramento convencional, que constitua risco de causar efeito adverso quando utilizado na alimentação humana e/ou animal.

Os estudos de impacto do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 na alimentação de animais monogástricos e ruminantes através do estudo de seus eventos singulares demonstrou total compatibilidade com o extensivo estudo de composição nutricional do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7. Assim, conclui-se que o milho combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 é tão seguro quanto o milho convencional para a alimentação humana e/ou animal.

As proteínas CRY1F, CRY34Ab1 e CRY35Ab1 têm modo de ação e toxicidade altamente específicas para alguns lepidópteros e coleópteros praga. Nenhuma evidência indica que proteínas originárias de *Bacillus thuringiensis* são causadoras de qualquer efeito adverso à saúde humana e animal (EPA, 1995a; McClintock *et al.*, 1995; EPA, 1996). Os resultados obtidos para as proteínas CRY34Ab1, CRY35Ab1 e CRY1F confirmam a ausência de atividade tóxica aguda em mamíferos, devido ao seu mecanismo de ação mediado por receptores específicos presentes unicamente nos insetos alvo.

As proteínas CRY1F, CRY34Ab1 e CRY35Ab1 são rapidamente degradadas sob as condições de fluidos gástricos simulados, conforme demonstrado por géis desnaturantes SDS-PAGE (Korjagin & Ernest, 2000; Schafer & Korjagin, 2001; Herman *et al.*, 2003). A proteína CRY1F é susceptível ao calor, uma vez que sua atividade biológica é interrompida após exposição à temperatura de 75° C por 30 minutos (Herman, 2000a), assim como as proteínas CRY34Ab1 e CRY35Ab1, que perdem sua atividade biológica quando expostas à temperatura de 60° C por 30 minutos (Herman, 2000b).

Nenhuma homologia significativa foi observada entre as proteínas CRY1F, CRY34Ab1, CRY35Ab1 e PAT em relação às proteínas conhecidas como alergênicas. Em estudos baseados nas diretrizes formuladas por Gendel (1998a) e FAO/OMS (2001) não foram identificados elementos para suspeitar de similaridades entre essas proteínas e as proteínas alergênicas conhecidas. Após mais de 30 anos de uso comercial, não se conhece qualquer ocorrência de reações alérgicas decorrentes de produtos inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (EPA, 1995a).

A proteína PAT foi amplamente estudada em organismos geneticamente modificados e nenhum potencial alergênico foi identificado (EPA, 1995b; EPA, 1997; Canadian Food Inspection Agency, 1998; SCP, 1998; OECD, Relatoria: Dr. José F Garcia e Paulo Lee Assessoria: Rubens J Nascimento

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

Brasília, DF – CEP: 70610-200

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

e-mail: secretariactnbio@mct.gov.br

PRÓTON: _____/_____

1999). A proteína PAT não compartilha homologia com toxinas ou proteínas alergênicas (Meye, 1999; Cressman, 2003), além de sofrer rápida degradação quando exposta aos fluidos gástricos simulados (OECD, 1999, Annex 4). Além disso, registra-se mais de 10 anos de uso seguro de plantas portadoras deste gene, em vários países.

Resultados semelhantes têm demonstrado a biossegurança das proteínas CRY1A.105, CRY2Ab2, CRY3Bb1 e CP4 EPSPS na alimentação humana e/ou animal. Estudos realizados no Brasil demonstraram que o milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 não difere do milho convencional em características agrônomicas, morfológicas e reprodutivas, assim como é equivalente em composição química e nutricional e, por conseguinte, de valor nutritivo comparável, como demonstrado nos ensaios de alimentação animal com suas proteínas.

O milho combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 difere do milho convencional apenas nas características de tolerância aos herbicidas à base de glufosinato de amônio, pela expressão do gene *pat*, e para tolerância ao herbicida glifosato, condicionada pelo gene *cp4 epsps*, e pelas características de resistência aos insetos pela expressão dos genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry2Ab2*, *cry1A.105* e *cry3Bb1*.

Por ser seguro à saúde humana e/ou animal, e por ter as mesmas características do milho convencional, o milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 possui aprovações no Canadá, Japão, Coreia, México, Filipinas, Colômbia, Taiwan, África do Sul e Estados Unidos conforme descrito no dossiê e disponível publicamente do site do *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (www.isaaa.org).

O milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 não produz toxinas ou metabólitos que causem efeito ao consumidor, animal ou humano, sendo similar ao milho convencional com relação a essas características. Os resultados de estudos de alimentação com vários animais consumindo dieta com milho contendo as proteínas presentes nos eventos TC1507, DAS-59122-7, MON 89034 e MON 88017, confirmam a ausência de efeitos adversos à saúde animal, como demonstrado em detalhe no dossiê apresentado pela empresa DOW AgroSciences.

Estudos realizados no Brasil demonstraram que o milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 não diferem do milho convencional em características agrônomicas, morfológicas, reprodutivas, assim como é equivalente em composição química e nutricional, com exceção apenas das características de tolerância aos herbicidas à base de glufosinato de amônio, pela expressão do gene *pat*, e glifosato pela expressão do gene *cp4 epsps*, e pelas características de resistência aos insetos pela expressão dos genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry2Ab2*, *cry1A.105* e *cry3Bb1*. A análise de composição do grão e de silagem tem demonstrado que o milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 é substancialmente equivalente ao milho não modificado geneticamente e, por conseguinte de valor nutritivo comparável.

Nenhuma homologia significativa tem sido observada entre as proteínas CRY1F, CRY34Ab1, CRY35Ab1, CRY1A.105, CRY2Ab2, CRY3Bb1 e CP4 EPSPS com relação às proteínas conhecidas como alergênicas ou tóxicas.

As proteínas CRY1F, CRY1A.105 e CRY2Ab2 têm modo de ação e toxicidade altamente específicas para alguns lepidópteros praga da parte aérea das plantas, e as proteínas CRY34Ab1, CRY35Ab1 e CRY3Bb1 têm modo de ação e toxicidade específicas para alguns coleópteros praga que atacam as raízes do milho. Nenhuma evidência indica que proteínas originárias de *Bacillus thuringiensis* possam causar efeito adverso à saúde de humanos e de animais (EPA, 1995a; McClintock *et al.*, 1995; EPA, 1996). Os resultados obtidos para as proteínas CRY1F, CRY34Ab1, CRY35Ab1, CRY1A.105, CRY2Ab2, CRY3Bb1 confirmam a ausência de atividade tóxica aguda em mamíferos, devido aos seus mecanismos de ação mediados por receptores específicos presentes unicamente nos insetos alvo.

Resultados semelhantes demonstraram a biossegurança das proteínas CRY1A.105, CRY2Ab2, CRY3Bb1 e CP4 EPSPS. Com base nestes estudos, foi possível concluir que o milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 não expressa qualquer proteína tóxica ou alergênica conhecida, de forma que seu consumo e/ou de seus produtos é tão seguro quanto o consumo do milho convencional.

A toxicidade potencial para seres humanos e animais da proteína CRY1F foi examinada em um estudo toxicológico oral agudo em ratos, no qual se avaliou o potencial de toxicidade aguda da δ -endotoxina CRY1F do

Bacillus thuringiensis var. *aizawai* (Kuhn, 1998). Nesse estudo, a substância teste, proteína heteróloga CRY1F de origem bacteriana, foi administrada via gavagem a 5 ratos machos e 5 fêmeas da linhagem Harlan Sprague Dawley (CD-1). A substância teste foi adicionada em uma solução aquosa de 2% de carboximetil celulose para produzir uma concentração de 15% de proteína, para ser fornecida aos animais. Uma dose individual foi calculada para cada animal conforme peso do corpo, na base de 33,7 mL/Kg. O volume foi dividido em duas metades fornecidas com uma hora de diferença. O peso corporal dos animais foi avaliado antes da gavagem e nos dias 7 e 14 após o teste. As observações para mortalidade e comportamento clínico de sinais de toxicidade foram feitos pelo menos 3 vezes no dia 0 (zero), de início do teste, e duas vezes ao dia até o dia 14 do experimento.

Não foi observada mortalidade no curso do estudo, não foram apresentados sinais clínicos adversos e nem foram observados resultados adversos nas necrópsias. A DL₅₀ oral aguda da proteína CRY1F foi determinada como sendo maior que 5050 mg/Kg de peso corpóreo em machos e fêmeas.

Estudos realizados por MacKenzie (2003) descartaram efeitos adversos subcrônicos causados pela proteína CRY1F em ratos alimentados durante treze semanas com dietas preparadas à partir do milho TC1507.

A proteína CRY34Ab1 foi testada para avaliar o efeito tóxico potencial para animais e humanos, em estudo de toxicologia oral aguda (Brooks & DeWildt, 2000a). A proteína CRY34Ab1, identificada neste estudo como PS149B1 de 14 kDa (54% de pureza), foi administrada em uma mistura de 20% com metilcelulose aquosa a 5% como veículo. Foram administradas 25 mL/Kg em forma oral a 5 ratos CD-1 machos, equivalente a dose oral aguda de 5000 mg/Kg de peso corporal. Durante o período de duas semanas foi medido o peso corporal dos animais, realizadas observações clínicas e possíveis alterações patológicas. Não foi observado mortalidade, toxicidade ou sinais clínicos adversos. Três ratos perderam peso nos dois primeiros dias, devido ao volume máximo de metilcelulose administrado, que foram recuperados no decorrer do estudo. Os outros dois ratos ganharam peso durante o estudo. Nenhuma alteração patológica relacionada aos tratamentos foi observada. Foi estabelecido, sob as condições do estudo, que a DL₅₀ oral aguda da proteína PS149B1 de 14 kDa (54% de pureza) é maior que 5000 mg/Kg. Expressa como proteína pura, a DL₅₀ oral aguda em ratos foi maior que 2700 mg/Kg.

Exatamente da mesma forma, a proteína CRY35Ab1 também foi testada para avaliar o efeito tóxico potencial para animais e humanos, em estudo de toxicologia oral aguda (Brooks & DeWildt, 2000b). A proteína CRY35Ab1 de 44 kDa (37% de pureza) foi administrada em uma mistura de 20% com metilcelulose aquosa a 5% como veículo. Foram administradas 25 mL/Kg em forma oral a 5 ratos CD-1 machos, equivalente a dose oral aguda de 5000 mg/Kg de peso corporal. Durante o período de duas semanas, foi medido o peso corporal e realizadas observações clínicas e possíveis alterações patológicas. Durante as avaliações não foram observadas mortalidade, toxicidade ou sinais clínicos adversos. Assim como no estudo anterior, três ratos perderam peso nos dois primeiros dias, devido ao volume máximo de metilcelulose administrado, que foram recuperados no decorrer do estudo. Um dos ratos teve peso flutuante também devido ao volume de metilcelulose administrado. Os outros dois ratos ganharam peso durante o estudo. Nenhuma alteração patológica relacionada aos tratamentos foi observada. Foi estabelecido, sob as condições do estudo, que a DL₅₀ oral aguda da proteína PS149B1 de 44 kDa (37% de pureza) é maior que 5000 mg/Kg. Expressa como proteína pura, a DL₅₀ oral aguda em ratos foi maior que 1850 mg/Kg.

A mistura das proteínas CRY34Ab1 e CRY35Ab1 na razão de 1:4 em preparação microbial contendo 54% de CRY34Ab1 e 37% de CRY35Ab1, foi testada em ratos para a avaliação de toxicidade oral aguda. A mistura foi administrada em 5 ratos machos CD-1 e em 5 ratos fêmeas CD-1, na dose de 5000 mg de preparação proteica (54% e 37%, respectivamente) por quilograma de peso vivo. Durante o período de duração do experimento (2 semanas), nenhum efeito adverso foi detectado nos ratos testados, apesar da alta dose aplicada. Todos os indivíduos sobreviveram, sem interferência em seu peso corporal e sem alterações detectadas durante as avaliações clínicas. Sob as condições do experimento, a DL₅₀ da mistura das proteínas CRY34Ab1 e CRY35Ab1 para os ratos CD-1, machos e fêmeas, foi estimada em mais de 2000 mg a.i./Kg (Brooks & DeWildt, 2000c).

Nenhum efeito adverso subcrônico foi observado em estudos com ratos alimentados com dietas preparadas à partir de milho DAS-59122-7 pelo período de 90 dias (Malley, 2004).

O gene *pat* foi originalmente obtido da bactéria *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tü494, que não possui potencial tóxico ou patogênico conhecido. A proteína PAT é enzimaticamente ativa, porém apresenta alta especificidade de substrato para o ingrediente ativo do herbicida glufosinato de amônio (L-PPT).

Estudos de toxicidade conduzidos em ratos alimentados com a proteína PAT, com doses até 5000 mg/Kg de peso vivo, não demonstraram qualquer efeito adverso nos indivíduos (Pfister *et al.*, 1996; Health Canada, 1997) de forma que a dose sem efeito adverso (NOEL) nestes estudos foi equivalente a maior dose testada, ou seja, NOEL \geq 5000 mg/Kg de peso corporal.

Em outro estudo, os ratos foram alimentados com 6000 mg/Kg de produto, que continha aproximadamente 5000 mg da proteína PAT/Kg de peso corporal (Brooks, 2000). Não se produziu observações clínicas relacionadas ao tratamento. Todos os ratos, 5 machos e 5 fêmeas, aumentaram de peso durante o período de observação de duas semanas e não foi observada lesões patológicas em nenhum dos animais em estudo. Os resultados de peso de órgãos, de patologia e histopatologia não mostraram diferenças entre os animais tratados e os animais do controle. Não foram observadas mudanças nas análises hematológicas ou na urina. Nas condições do estudo e devido à ausência de qualquer toxicidade observável, não se pode determinar a DL₅₀ da proteína PAT. Dessa forma, a dose sem efeito adverso (NOEL) para o presente estudo foi equivalente a maior dose testada, ou seja, NOEL \geq 5000 mg/Kg de peso corporal.

A proteína PAT é ativa enzimaticamente, mas apresenta elevada especificidade de substrato e não existem substratos adequados, seja na planta de milho ou nas dietas animais e humanas, sobre os quais possa reagir.

Portanto, conclui-se que a proteína PAT não apresenta nenhuma toxicidade humana ou animal.

Desta forma, podemos considerar que:

1. O evento MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 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;
3. Não foram identificados efeitos pleiotrópicos ou epistáticos nos eventos parentais e em conjunto;
4. A expressão das proteínas 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 agrônômicas e de eficácia do milho MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 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 glufosinato de amônio;

Considerando ainda que:

1. O evento MON 89034 foi aprovado pela CTNBio para cultivo comercial no Brasil (Extrato de Parecer Técnico nº 2052/2009, publicado no D.O.U. em 16/10/2009), e possui aprovações nos Estados Unidos, Argentina, Austrália, Canadá, Colômbia, União Europeia, Japão, Coreia, Filipinas e Taiwan.
2. O evento MON 88017 foi aprovado pela CTNBio para cultivo comercial no Brasil (Extrato de Parecer Técnico nº 2764/2010, publicado no D.O.U. em 17/12/2010).
3. O evento TC1507 foi aprovado pela CTNBio para cultivo comercial no Brasil (Extrato de Parecer Técnico Nº1679/2008, publicado no D.O.U. em 15/12/2008), e possui aprovações nos Estados Unidos, Argentina, Austrália, Canadá, China, Colômbia, El Salvador, União Europeia, Japão, Coreia, México, Filipinas, África do Sul e Taiwan.
4. O milho portador do evento DAS-59122-7 foi submetido à aprovação da CTNBio para cultivo comercial no Brasil, e possui aprovações nos Estados Unidos, Austrália, Canadá, China, Colômbia, União Europeia, Japão, Coreia, México, Filipinas e Taiwan.
5. O evento combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 possui aprovações nos Estados Unidos, Canadá, Colômbia, Japão, Coreia, México, Filipinas e Taiwan.

Relatoria: Dr. José F Garcia e Paulo Lee Assessoria: Rubens J Nascimento
SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10
Brasília, DF – CEP: 70610-200
Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317 7475
e-mail: secretariactnbio@mct.gov.br

PRÓTON: _____/_____

E, 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 saúde humana e animal, e concluiu que o Milho combinado MON 89034 x MON 88017 x TC1507 x DAS-59122-7 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal.

Concluo que sou de parecer *favorável ao deferimento* da solicitação da Dow AgroSciences.

Data: 05/01/2015

DR. JOSÉ FERNADO GARCIA
Membro da CTNBio

DR. PAULO LEE HO
Membro da CTNBio

De acordo,

DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI
Presidente da CTNBio

Assessor Técnico da CTNBio: RUBENS J NASCIMENTO

