

PARECER TÉCNICO CONSOLIDADO
SETORIAIS HUMANA/ANIMAL



Processo nº: 01200.000124/2012-43

Requerente: Dow AgroSciences Industrial Ltda

CNPJ: 47.180.625/0001-46

Endereço: Av. Nações Unidas 14171 2nd Andar Edifício Diamond Tower, Santo Amaro, São Paulo, SP.

Assunto: Solicitação de Parecer Técnico do pedido de liberação comercial da milho geneticamente modificado denominado DAS-40278 -9

Extrato Prévio: Extrato prévio ° 3190/2012, publicado no DOU 97, em 25 de maio de 2012.

Decisão: Deferido

PARECER TÉCNICO

Geral

A empresa Dow AgroSciences Industrial Ltda solicita pedido de liberação comercial do milho DAS-40278-9 geneticamente modificada pela inserção de um gene que codifica a proteína ariloxialconato dioxigenase (AAD-1), que expressam as proteínas responsáveis pelo atributo de seletividade a herbicidas a 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e a determinados herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase), ariloxifenoxipropionato (AOPP), denominados de herbicidas *fop*. Esta solicitação se refere a liberação no meio ambiente, seu uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a este OGM e quaisquer progênes dele derivados.

O processo enviado a CTNBio compreende: Requerimento de Liberação Comercial, Parecer Técnico da CIBio milho DAS-40278-9 geneticamente modificada, O Relatório Técnico compreende 381 páginas (sem inclusão de anexo), onde são fornecidas, Informações Relativas ao monitoramento pos-lançamento comercial a ser submetido (anexo I), ao OGM (anexo II), Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal (anexo III), Avaliação de Risco ao Meio Ambiente (anexo IV), referencias bibliográficas e 3 apêndice, sendo o segundo com solicitação de confidencialidade deste dado.

Observações Preliminares

O parecer aqui apresentado analisou os aspectos relativos à toxicidade, à alergenicidade e ao valor nutricional para humanos e animais do evento enquanto os aspectos agrícolas e ambientais contidos no processo não foram abordados.

Resumo executivo

A Dow AgroSciences Industrial Ltda., requer a emissão de parecer técnico para liberação comercial de uma linhagem de milho e seus derivados com o evento DAS-40278-9 (OECD número de identificação DAS-40278-9), referido como milho DAS-40278-9, nos termos da Resolução Normativa Nº 5 da CTNBio, do Decreto Nº 5.591 e da Lei Nº 11.105/05. O milho DAS-40278-9 é um produto transgênico com tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e a determinados herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase) ariloxifenoxipropionato (AOPP), denominados herbicidas “fop” que oferecerá aos produtores uma maior flexibilidade ao selecionar herbicidas e melhor controle de plantas daninhas. Estudos, com autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), demonstraram a eficácia e praticabilidade agrônômica do uso do milho DAS-40278-9 em condições de cultivo em nosso país. Este produto não difere do

milho convencional em sua composição química e nutricional, exceto pela presença e expressão do gene *aad-1* que confere resistência aos herbicidas citados.

O cultivo do milho DAS-40278-9 e o consumo da planta ou de seus derivados não causam efeitos adversos ao meio ambiente ou à saúde humana e animal, sendo tão seguro quanto o milho convencional. A proteína codificada pelo gene *aad-1* não apresenta similaridade com proteínas consideradas alergênicas ou tóxicas. O milho DAS-40278-9 não mostra tendência a proliferar-se como planta daninha e não é invasivo em ecossistemas naturais. Nenhuma vantagem competitiva de sobrevivência ou dispersão do milho foi observado na transgene do *aad-1*, quando comparado ao milho convencional. A proteína AAD-1 é uma enzima com uma atividade dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato que inativa a via metabólica dos herbicidas da família ariloxialcanoato. O gene *aad-1* isolado de *Sphingobium herbicidovorans*, uma bactéria de solo gram-negativa pertence ao gênero *Sphingobium* que proliferam-se no meio ambiente e, por essa razão, animais e humanos estão naturalmente expostos ao organismo e seus componentes, sem consequências adversas. O gene *aad-1* foi introduzido ao milho DAS-40278-9 utilizando uma transformação mediada por *whiskers*. A caracterização do evento DAS-40278-9 pela análise de Southern confirmou que uma única inserção intacta do gene *aad-1* foi integrada de forma estável no genoma do milho. Uma única cópia de cada elemento genético do cassete de expressão do *aad-1* está presente e a integridade do fragmento de DNA inserido no milho foi demonstrada ao longo de cinco gerações de cultivo, confirmando a estabilidade genética esperada para cultivo comercial do cereal. A Southern blot confirmou a ausência de fragmento do esqueleto molecular do DNA do plasmídeo no milho DAS-40278-9. A análise da segregação genética dos indivíduos ao longo de seis gerações confirmou a herança mendeliana monofatorial do gene *aad-1*. A expressão da proteína foi analisada na folha, na raiz, no pólen, na planta inteira e nos tecidos de grão coletados durante o período de cultivo de plantas DAS-40278-9 sem aplicação de herbicidas e tratadas com os herbicidas 2,4-D e haloxifope-R por ELISA. Os resultados mostraram baixo nível de expressão da proteína AAD-1 nos vários tecidos das plantas que receberam aplicação dos herbicidas, indicando um baixo risco de exposição a humanos e animais. A proteína AAD-1 foi avaliada para se detectar possíveis efeitos adversos em animais e humanos que poderiam surgir com o cultivo do milho contendo a proteína AAD-1. Utilizou-se uma abordagem passo a passo para avaliar potenciais efeitos tóxicos e alergênicos da proteína AAD-1. A análise bioinformática da sequência de aminoácidos da proteína AAD-1 não revelou homologia significativa com alérgenos e toxinas conhecidas. A proteína AAD-1 foi hidrolisada rapidamente em fluido gástrico simulado e não houve evidências de toxicidade aguda em ratos com dose de 2.000 mg/kg de peso corporal. A análise da glicosilação da planta e da proteína AAD-1 derivada de microrganismo não detectou ligação covalente de carboidratos. Estudo de segurança da proteína AAD-1 indicam que é improvável a ocorrência de efeitos alergênicos ou tóxicos em humanos e animais. O milho DAS-40278-9 foi avaliado em campos experimentais de várias regiões dos Estados Unidos e Canadá, e posteriormente no Brasil, através de Liberações Planejadas no Meio Ambiente (LPMA), autorizadas pela CTNBio. Foram conduzidas avaliações de desempenho agrônomo para medir características das plantas, como emergência, vigor, altura da planta, rendimento e parâmetros referentes ao pólen. Em todos os experimentos de campo foram avaliadas respostas das plantas em relação a doenças ou insetos e características fenotípicas da espécie. Não houve diferença significativa entre o milho DAS-40278-9 e o milho controle convencional para características de sanidade das plantas, bem como nenhuma indicação de vantagem seletiva que poderia resultar no aumento de plantas daninhas com o cultivo do milho DAS-40278-9.

A análise de composição de nutrientes de forragem e grão foi conduzida para se comparar a composição do milho DAS-40278-9 com o milho controle não transgênico correspondente (iso-híbrido). A análise da composição permitiu avaliar possíveis alterações nos principais níveis de nutrientes e antinutrientes do milho DAS-40278-9 pulverizado com 2,4-D e haloxifope-R. Estes estudos sugeriram fortemente que o milho DAS-40278-9 é equivalente ao milho convencional. Em estudos para avaliar modificações da planta de milho DAS-40278-9 na capacidade de adicionar ou remover substâncias do solo e no estado nutricional das

plantas, não foram observadas diferenças entre o milho DAS-40278-9, com e sem a aplicação de herbicidas, e o iso-híbrido convencional, em relação à macro e micro nutrientes bem como na granulometria do solo. Foi demonstrado também que as plantas do milho geneticamente modificado DAS-40278-9, com ou sem aplicação de herbicida, não apresentam diferenças na concentração de nutrientes nas folhas em relação às plantas do seu controle convencional iso-híbrido. A ocorrência de possíveis modificações da biodegradabilidade da planta de milho DAS-40278-9 foi avaliada comparativamente ao milho controle convencional. A decomposição da matéria orgânica de plantas de milho DAS-40278-9, com ou sem aplicação dos herbicidas, não diferiu das plantas do controle iso-híbrido, indicando similaridade na biodegradabilidade do milho DAS-40278-9 e do controle convencional. As informações coletadas durante a experimentação em ambientes de clima temperado e tropical demonstram que o milho DAS-40278-9 não exibiu características de patogenicidade ou comportamento de planta daninha. É, dessa forma, improvável que plantas com a proteína AAD-1 alterem as propriedades de plantas daninhas da lavoura ou mesmo de espécies selvagens.

A disponibilidade do milho DAS-40278-9 terá um impacto positivo nas práticas de controle de plantas daninhas, constituindo-se numa alternativa importante para atender às necessidades dos produtores de milho no Brasil. O uso do milho DAS-40278-9 permitirá que os produtores lidem proativamente com as populações de plantas daninhas, mantendo a cultura “no limpo”, evitando alterações adversas na população de invasoras.

As características da planta geneticamente modificada, através das informações coletadas durante os experimentos de campos e análises laboratoriais, apresentadas neste documento, comprovam que o cultivo e consumo do milho DAS-40278-9 é tão seguro ao meio ambiente e à saúde humana e animal quanto o milho convencional.

Genes introduzidos, organismos de origem e suas funções específicas

Vetor utilizado e seu espectro de hospedeiros.

O evento DAS-40278-9 foi gerado pela introdução de um fragmento linear de restrição FspI do plasmídeo pDAS1740 contendo o gene *aad-1* proveniente do *Sphingobium herbicidovorans* otimizado para expressão em plantas. O cassete de expressão de *aad-1* contido no fragmento pDAS1740/Fsp I expressa o ariloxialcanoato dioxigenase (proteína de 296 aa com peso molecular de cerca de 33 KDa) otimizado para plantas (*aad-1*). O gene *aad-1* utilizado é a versão sintética otimizada para aproximar a dos códons mais típico de genes de plantas. A inserção do gene *aad-1* em milho confere tolerância aos herbicidas 2,4-D e AOPPs (ÒfopÓ). *Sphingobium herbicidovorans* desenvolveu a capacidade de usar a fenóxi auxina e herbicidas AOPP como fontes de carbono para crescimento, conferindo, assim, a bactéria, uma vantagem competitiva no solo (Wright et al., 2009). O cassete de expressão pDAS1740/Fsp I é regulada pelo promotor ZmUbi1 e pela sequência de terminação ZmPer5 3'UTR, ambos de *Zea mays*. O promotor ZmUbi1 já foi usado em produtos previamente aprovados para cultivo (USDA, 2001; USDA, 2005), e, sabidamente, condiciona uma expressão constitutiva dos genes. (Christensen e Quail, 1996). Regiões de ligação a matriz nuclear (MARs) da *Nicotiana tabacum* foram incluídas no cassete de expressão de ambas as extremidades flanqueadoras da unidade transcricional de *aad-1* para aumentar potencialmente a expressão do gene *aad-1* na planta. Quando posicionadas nas extremidades flanqueadoras de cassetes de expressão, algumas MARs demonstraram aumentar a expressão de transgenes e reduzir a incidência de silenciamento gênico (Abranches et al., 2005; Han et al., 1997; Verma et al., 2005). Especula-se que as MARs podem suavizar os efeitos de sequências cromossômicas vizinhas que poderiam desestabilizar a expressão de genes (Allen et al., 2000). O DNA da transformação consistiu de fragmentos isolados do plasmídeo pDAS1740. O fragmento foi isolado através da digestão do DNA plasmidial com a enzima de restrição FspI, originando, além do fragmento de inserção desejado, múltiplos fragmentos do gene de resistência a ampicilina. Os menores fragmentos foram separados dos maiores através de cromatografia de coluna. O fragmento final obtido foi um segmento de DNA linear de 6236 pb contendo o cassete de expressão de *aad-1*. Este fragmento foi utilizado para inserção no

genoma da planta. O fragmento isolado de pDAS1740 continha os seguintes elementos: RB7 MAR v3, o promotor ZmUbi1 de milho, o gene *aad-1*, a região ZmPer5 3.UTR de milho e RB7 MAR v4.

Caracterização Molecular da construção

Número de cópias inseridas do gene *aad-1* foi confirmado ser de apenas uma, após hibridação únicas de aproximadamente 12k pb, 4k pb e 16k pb respectivamente nas digestões com as enzimas *EcoRI*, *NcoI* e *Sac I*. A dupla digestão com enzimas *EcoRI* e *Hind III*, liberando 3361pb do gene com o promotor no genoma do milho DAS40278-9 foi observado (fig.9-12). Foi também avaliado por restrição enzimática *NcoI*, *SacI* e *FseI/Hind III* a região promotora ZmUbi1 do evento DAS40278-9. As digestões com *NcoI* e *SacI* produziram fragmentos com cerca de 3472 pb e 4389 pb respectivamente por sonda deste promotor. Na avaliação por hibridação pós restrição com *NcoI* observou-se duas bandas de 6300bp do plasmídeo pDAS1740 e uma de 3600 (comprovada de inespecífica), concluindo portanto a inserção de apenas cópia única do inserto proveniente do plasmídeo DAS1740 no genoma do milho DAS 40278-9 (fig 13-15 do relatório). Foram também avaliadas a sequência Terminadora ZmPer 3'UTR utilizando a dupla digestão com *FseI* e *Hind III*. Apesar de ocorrer fragmentos de tamanho de 3361, que caracteriza a região desejada outra de 2100pb foi identificada que esta ocorreu nos controles, caracterizando inespecificidade.(Fig 16 a 18). O sequenciamento confirmou as inserções do gene *aad-1*, do promotor *ZmUbi1*.

Objetivo do OGM.

O milho DAS-40278-9 é um transgênico que apresenta tolerância aos herbicidas 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e ariloxifenoxipropionatos (AOPPs). Híbridos de milho DAS-40278-9 representam uma excelente alternativa para os produtores na escolha dos herbicidas e no controle de importantes plantas daninhas que estão presentes na cultura do milho. O milho DAS-40278-9 pode ser utilizado pelo produtor como uma planta tolerante aos herbicidas 2,4-D e haloxifop-R. Ambos apresentam antecedentes de uso seguro como herbicida do milho, não se conhecendo efeitos ambientais adversos desses produtos. As plantas de milho contendo o evento DAS-40278-9 foram geneticamente modificadas para expressar a proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-1). A proteína AAD-1 é uma enzima com uma atividade dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato que resulta na inativação metabólica dos herbicidas da família ariloxialcanoato. O gene *aad-1* v3 é um gene sintético, versão otimizada para expressar em plantas a enzima ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-1), originário do microrganismo *Sphingobium herbicidovorans*, uma bactéria gram-negativa comumente isolada do solo e da água. A bactéria *Sphingobium* que contém genes codificadoras de enzimas capazes de facilitar a decomposição dos herbicidas 2,4-D e AOPP, permitindo a bactéria usá-los como fonte de carbono. O gene *aad-1* foi introduzido no milho DAS-40278-9 via transformação genética mediada por whiskers. Para tanto, embriões imaturos de milho foram asépticamente removidos de cariopses e dispostos em meio semi sólido, onde deram origem a calli embriogênicos. Em seguida estes calli foram transferidos para meio de cultura líquido, originando a suspensão celular embriogênica. A suspensão estabelecida foi agitada com fragmentos de DNA do plasmídeo pDAS1740 e fibras whisker de carbeto de silício, desta forma promovendo orifícios na membrana celular para entrada dos fragmentos de DNA nas células.

Utilização do OGM e de seus derivados.

O milho é uma das espécies cultivadas mais importantes para a sobrevivência do homem e com certeza a mais importante na indústria de alimentos. Originário do México e Guatemala, o milho se difundiu em todos os continentes e é hoje produzido na maioria dos países do mundo. Em função de sua alta produtividade por unidade de área, o milho atingiu o primeiro lugar em produção mundial no ano de 2009, atingindo 826,7 milhões de toneladas, seguido do

arroz com 689,1 milhões de toneladas e do trigo com 683,1 milhões de toneladas (www.fao.org). O milho é processado na indústria principalmente através de moagem úmida para seu uso em alimentos, na indústria em geral (papel, tecidos, etc.) e para ração animal. A moagem úmida é utilizada para extrair os componentes do grão de milho, como por exemplo, amido, glúten e gérmen, os quais podem ser utilizados em uma grande variedade de alimentos, assim como também para fins farmacêuticos e na indústria em geral. A moagem seca do milho é utilizada na elaboração de alimentos balanceados para animais, nos cereais matinais para o consumo humano, na indústria cervejeira e na produção de outros alimentos.

A classificação de risco do organismo geneticamente modificado.

O organismo objeto desta solicitação enquadra-se na Classe de Risco 1 (baixo risco individual e coletividade), de acordo com o Artigo 8 da Resolução Normativa Nº 2 de 27 de novembro de 2006 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança:

Classe de Risco 1 (baixo risco individual e a coletividade): O OGM que contém sequências de ADN/ARN de organismo doador e receptor que não causem agravos saúde humana e animal e efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Ausência das sequências do vetor original.

A ausência de sequências indesejadas do vetor original no genoma do milho DAS-40278-9, foram avaliados utilizando sondas que flanqueiam toda a sequência do vetor original (OLP4A, B e C), que não fazem parte da construção gênica de interesse. Neste experimento utilizaram-se combinações das tres sondas em concentração molar equivalente (Tabela 3). Observou-se que nenhum sinal de hibridização específico foi positivo com as combinações das sondas do vetor original (Tabela 4). Após as digestões com Nco I e Sac I, nenhum sinal de hibridização foi visto nas amostras DAS-40278-9 (Figura 23 e Figura 24). Os resultados indicam que apenas o inserto desejado foi inserido no genoma do milho DAS-40278-9, sem qualquer outra sequência adicional.

Estabilidade do inserto através das gerações.

Hibridizações realizadas com cinco gerações distintas, T3, T4, BC3S1, BC3S2 e BC3S3, do evento DAS-40278-9 (ver diagrama de cruzamentos do milho DAS-40278-9, Figura 4 do relatório. Em alguns casos, a geração utilizada foi uma segregação do evento DAS-40278-9 e, portanto, antes do início do Southern blot, todas as plantas também foram testadas para a expressão da proteína AAD-1 usando um *strip* test para permitir a confirmação das plantas positivas. Todas as sondas dos elementos genéticos; *gene aad-1*, promotor ZmUbi1, terminador ZmPer5, RB7 MAR v3, RB7 MAR v4, e as sondas no plasmídeo original (OLP4A, B e C), foram hibridizados com as cinco gerações do milho DAS-40278-9. Conforme descrito anteriormente, os resultados em todas as amostras que continham o evento DAS-40278-9 foram positivos (Tabela 4 e Figura 9 a Figura 24), indicando herança estável do gene.

Coleta de amostras e extração de DNA.

Amostras de folhas das plantas de milho do evento DAS-40278-9 e do controle XHH13 coletadas na estufa foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. O DNA genômico foi extraído do tecido da folha congelada do milho usando o método CTAB. Após a extração do DNA foi completamente dissolvido em tampão TE antes de ser quantificado por espectrofluorometria usando o reagente Pico Green (Invitrogen). O DNA foi visualizado por eletroforese em gel de agarose para determinar a qualidade do DNA e confirmar a análise quantitativa Pico Green.

Sequência nucleotídica do transgene e elementos gênicos.

Estas informações estão descritas em volume separado anexo ao relatório (confidencial)

Identidade e função da proteína AAD-1.

A proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-1) foi obtida pela recombinação do *Sphingobium herbicidovorans*, uma bactéria gram-negativa de solo. O transgene *aad-1* no evento DAS-40278-9 codifica uma proteína idêntica a proteína AAD-1 nativa, composta de 296 aminoácidos com peso molecular de 33 kDa. AAD-1 é uma enzima dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato que catalisa a conversão de 2,4-D em diclorofenol (DCP), sem atividade herbicida (Wright et al. 2009). A proteína AAD-1 é capaz de degradar R-enantiômeros das auxinas fenoxi quirais (exemplo, dicloropropo e mecopropo), além de auxinas fenoxi aquirais (exemplo, 2,4-D, MCPA, 4-clorofenoxiacético ácido). A enzima AAD-1 também catalisa a reação de degradação da classe geral de herbicidas conhecidos como ariloxifenoxipropionatos (AOPPs), tais como quizalofop e haloxifop-R, aos seus correspondentes fenóis inativos (Wright et al., 2009). A enzima AAD-1 foi selecionada por ensaio enzimático in vitro com substratos endógenos de plantas (Luo et al., 2006). Os substratos testados foram separados em tres grupos, hormônios vegetais naturais (ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas, e aminociclopropano-1-carboxilato), intermediários fenilpropanóides (cinamato, coumarato e sinapato), e L-aminoácidos. O substrato dicloropropo racêmico, controle positivo, mostrou alta atividade no ensaio enzimático. Os compostos testados com a AAD-1 nas mesmas condições de ensaio não foram oxidados, resultando em valores iguais ou inferiores ao limite de detecção (<3% do valor comparado ao controle positivo). Com base nesta pesquisa de substratos em potencial, pode se concluir que não há nenhuma indicação de que a proteína AAD-1 tenha atividade sobre substratos endógenos de plantas.

Caracterização bioquímica da proteína AAD-1.

São necessárias grandes quantidades de proteína AAD-1 purificada para realizar os estudos de avaliação de segurança. Já que é tecnicamente impraticável extrair e purificar quantidades suficientes de proteína AAD-1 de plantas transgênicas, a proteína foi produzida em sistema heterólogo usando o microorganismo *Pseudomonas fluorescens* (Pf). Os testes de caracterização foram feitos para confirmar a equivalência da proteína AAD-1 expressa in planta no milho DAS-40278-9 com a proteína AAD-1 derivada do microorganismo *P. fluorescens*. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), o Western Blot, a detecção de glicoproteína, a análise por espectrometria de Massa (MALDI-TOF MS) e a análise do sequenciamento da proteína foram utilizados para confirmar as propriedades bioquímicas da proteína. Usando esses métodos, a proteína AAD-1 produzida em *P. fluorescens* e a produzida pelo milho transgênico DAS-40278-9 mostraram ser bioquimicamente equivalentes, dando suporte ao uso da proteína heteróloga nos estudos de biossegurança. Os métodos e resultados da caracterização bioquímica da proteína AAD-1 derivada de *P. fluorescens* e da planta DAS-40278-9 estão descritos detalhadamente no item 11. Ambas as proteínas resultou com peso molecular de aproximadamente 33 kDa e foram imunorreativas no Western Blot. Não houve evidencia de glicosilação da proteína AAD-1 derivada do milho DAS-40278-9. A composição de aminoácidos foi confirmada pela espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Observou-se que a metionina N-terminal foi clivada e a N-terminal da proteína expressa pelo milho DAS-40278-9 foi acetilada. Esses dois processos cotranslacionais, clivagem do resíduo da metionina N-terminal e a acetilação N-terminal são modificações comuns que ocorrem na maioria (aproximadamente 85%) das proteínas eucarióticas (Polevoda e Sherman, 2000).

Métodos e resultados para caracterização da proteína AAD-1.

Foi conduzido um estudo para a caracterização da proteína AAD-1 (Schafer et al, 2009, Estudo 080142), onde os métodos e resultados estão descritos a seguir.

Material do milho DAS-40278-9.

Plantas híbridas F1 com o evento DAS-40278-9 cultivadas em casa de vegetação foram usadas como fonte para extração da proteína AAD-1. Antes de serem usadas, as plantas individuais tiveram as folhas testadas para confirmar a expressão da proteína AAD-1 usando um teste de fita de fluxo de lateral (strip test), de acordo com as instruções do fabricante. Os talos das plantas que expressam AAD-1 foram colhidos, liofilizados e moídos até obter um pó fino, congelados e armazenados até serem usados.

Material controle do milho.

A linhagem controle do milho XHH13 foi utilizada como controle negativo, não contendo o evento DAS-40278-9. A ausência da expressão de AAD-1 nas plantas controle foi confirmada pelo teste das folhas usando o teste de fita de fluxo lateral específico para AAD-1. Os talos das plantas controle foram colhidos, liofilizados, moídos e armazenados sob as mesmas condições das amostras do milho DAS-40278-9.

Material de referência.

A proteína microbiana recombinante AAD-1 foi produzida em *Pseudomonas fluorescens* (Pf), purificada, liofilizada e armazenada. Para utilização, a proteína AAD-1 heteróloga armazenada foi novamente suspensa em solução tampão imediatamente antes do uso.

Purificação da proteína do tecido de milho DAS-40278-9.

A proteína AAD-1 foi extraída do talo liofilizado em tampão PBST (solução tampão fosfato salina, com 0,5% de fosfato e Tween 20, pH 7,4) com estabilizadores. A fração solúvel contendo a proteína foi coletada por centrifugação. O sobrenadante foi filtrado e purificado em coluna de imunoafinidade contendo anticorpo monoclonal específico (anti-AAD-1) conjugado. As proteínas não ligadas foram coletadas da coluna e a coluna foi repetidamente lavada com 20 mM de solução de bicarbonato de amônia tamponada, pH 8,0. As proteínas ligadas a resina foram extraídas com uma solução tampão 3,5 M de NaSCN, 50 mM de Tris, pH 8,0 e analisadas em SDS-PAGE e Western Blot. 10.3.5. Análises SDS-PAGE e Western Blot dos extratos brutos. Os tecidos liofilizados do evento DAS-40278-9 e do controle XHH13 foram ressuspensos em tampão PBST contendo 10% de coquetel inibidor de protease (Sigma) e a fração proteica extraída com um agitador orbital Geno-Grinder. As amostras foram centrifugadas as suspensões foram misturadas com um tampão da amostra Laemmli Sample Buffer, aquecidas e submetidas a leve centrifugação. As amostras foram carregadas diretamente em um gel Bio-Rad Criterion SDS-PAGE. O padrão de referência positivo, a proteína AAD-1 produzida em sistema heterólogo, também foi misturada com tampão da amostra e aplicada no gel. A eletroforese foi conduzida com o tampão Tris/glicina/Tampão SDS (Bio-Rad). Após a eletroforese, o gel foi separado em duas partes, uma metade foi corada com corante de proteína Azul Pierce GelCode, e a outra metade foi transferida (blot) para membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi então hibridizada com o anticorpo policlonal específico para AAD-1. O substrato quimioluminescente foi usado para visualizar as bandas imunorreativas.

Deteção da glicosilação pós-traducional.

A proteína purificada das plantas foi analisada quanto evidência de glicosilação por eletroforese em comparação com a proteína AAD-1 heteróloga derivada do microorganismo, utilizando o inibidor de tripsina de soja, a albumina de soro bovino e a peroxidase de raiz de

rabano silvestre como controle. As amostras das proteínas controle foram ajustadas em concentrações iguais as da proteína AAD-1 de planta e foram misturadas com tampão Laemmli. As amostras foram aquecidas, centrifugadas e colocadas diretamente em um gel Bio-Rad Criterion SDS-PAGE. Após a eletroforese, o gel foi dividido ao meio. Uma parte foi corada com corante Pierce GelCode Azul para visualização da proteína total. A outra parte do gel foi tingida com corante GelCode de glicoproteína para visualizar as glicoproteínas. As glicoproteínas presentes no gel foram visualizadas como bandas de cor magenta em um fundo rosa claro.

Espectrometria de massa de peptídeos e sequenciamento da proteína AAD-1 derivada de microorganismo e plantas.

A análise por espectrometria de massa da proteína AAD-1 derivada de microorganismo e planta foi conduzida no laboratório de Ciências Analíticas da The Dow Chemical Company. A imunoespecificidade da proteína AAD-1 derivada de planta foi submetida a digestão em solução de tripsina e em seguida submetida ao processo de ionização por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). As proteínas foram também submetidas a espectrometria de massa ESI-LC. Os resíduos de aminoácidos nas extremidades amino (N) e carboxi (C) terminais da proteína AAD-1 derivada de planta foram também sequenciados por espectrometria de massa e comparados à sequência da proteína heteróloga produzida em *P. fluorescens*.

Resultados das análises SDS-PAGE e Western Blot.

Os extratos das plantas controle não transgênicas e das plantas de milho DAS-40278-9 podem ser visualizados nas canaletas 1 e 2 do gel de SDS-PAGE corado com Coomassie Blue (Figura 28, painel A). A proteína AAD-1 produzida no microorganismo pode ser visualizada na canaleta 3 correspondendo ao tamanho esperado de aproximadamente 33 kDa. Quando hibridada com o anticorpo policlonal anti-AAD-1 na análise por Western Blot, a proteína AAD-1 heteróloga e o extrato de tecido da planta de milho DAS-40278-9 também corresponderam ao tamanho esperado (Figura 28, Painel B). Nenhuma banda foi observada no extrato da planta controle não transgênica.

Resultados do sequenciamento de fragmentos tripticos.

As sequências dos primeiros 11 resíduos da proteína AAD-1 derivada do microorganismo e da planta foram também obtidas através da espectrometria de massa. A sequência dos aminoácidos para ambas as proteínas foi A1 H A A L S P L S Q R11, indicando que a metionina N-terminal foi removida (Tabela 5). Além disso, depois da metionina removida, uma porção do peptídeo N-terminal da proteína AAD-1 foi acetilado. Esses dois processos cotransacionais, remoção do resíduo da metionina N-terminal e a acetilação N-terminal são modificações comuns que ocorrem na maioria (aproximadamente 85%) das proteínas eucarióticas (Polevoda e Sherman, 2002), sem significado biológico relevante no presente contexto de biossegurança. Além da N-acetilação, houve um truncamento N-terminal curto (perda de aminoácidos A2, H3, A4) que apareceram durante a purificação da proteína de origem vegetal AAD-1 (Tabela 5 e Figura 31A). Este truncamento pode ter ocorrido durante a purificação da proteína AAD-1 uma vez que a sonda para Western blot é de extrato bruto, apenas uma banda única e nítida com o mesmo peso molecular da proteína AAD-1 derivada de microorganismo foi visualizada. As sequências C-terminal das proteínas AAD-1 de planta e a derivada de microorganismo foram obtidas e se mostraram idênticas as sequências esperadas (Tabela 6 e Figura 31B).

Estudos de Expressão da proteína AAD-1 no milho DAS-40278-9.

Expressão da proteína AAD-1 no milho DAS-40278-9 em experimentos realizados no Brasil (Galan, 2011, Estudo 091167). Durante a safra 2010/11 conduziram-se novos estudos de expressão da proteína em diferentes tecidos de milho com o evento DAS-40278-9. Os ensaios foram conduzidos nas Unidades Operativas da Dow AgroSciences em Mogi Mirim (SP), e Indianópolis (MG) (processo CTNBio no 01200.000083/2009-90). O delineamento utilizado em cada experimento foi de blocos casualizados, com trs (3) repetições de cada tratamento designados como:

Tratamento 01: iso-híbrido,

Tratamento 02: milho DAS-40278-9 sem pulverização

Tratamento 03: milho DAS-40278-9 com aplicação de 2,4-D (GF-2665)

Tratamento 04: milho DAS-40278-9 com aplicação de haloxifope-R (GF-142).

Cada parcela foi constituída de 10 (dez) fileiras por 6 (seis) metros de comprimento. O espaçamento entre linhas foi de 0,76 metros e de 20 cm entre plantas dentro da linha, e a taxa de semeadura foi de aproximadamente 35 sementes por 6 m de linha. Em conformidade com os requisitos regulamentares as parcelas experimentais foram cercadas por 20 linhas de bordadura de um híbrido de milho não-transgênico de maturidade semelhante. Para manutenção da sanidade da cultura práticas apropriadas de controle de insetos, plantas daninhas e doenças foram aplicadas conforme relatado na Tabela 7 do relatório apresentado. A média de temperaturas mensais mínimas e máximas, juntamente com chuva e irrigação esta ilustrada na tabela 8 do relatório apresentado. As amostras foram obtidas de folha, planta inteira, raiz, pólen, forragem e grão de milho para a análise de expressão e armazenadas a -80°C ate o momento de liofilização e determinação de proteínas na Dow Agrascience de Mogi Mirim, SP pelo método de ELISA.

Limite de detecção nas amostras de milho.

O limite de detecção (LOP) e o limite de quantificação (LOQ) para os tecidos foi de 0,2 a 0,4ng/mg respectivamente.

Resultados das análises de expressão da planta.

Os tecidos de folha (V2-V4, V9, e R1), planta inteira (R6), raiz (R1), pólen (R1), forragem (R4) e grão(R6) foram analisados para determinação do nível de expressão da proteína AAD-1. A concentração da proteína nas matrizes (ng/mg) foi expressa com base na massa de tecido seco. Um sumário das concentrações da proteína AAD-1 (média combinada das localidades) nos vários tecidos de milho nas duas localidades variou entre 2,18 ng/mg em grão no estúdio R6 a 182,99 ng/mg em pólen no estádio R1. A proteína AAD-1 não foi detectada nas amostras do controle Iso-híbrido, como seria esperado, porque se trata do controle convencional. Os valores de expressão da proteína AAD-1 foram similares para o milho DAS-40278-9 sem aplicação de herbicidas e para os dois tratamentos com o milho DAS-40278-9 que receberam aplicação dos herbicidas 2,4-D (GF-2665) e haloxifope-R (GF-142). Os resultados individuais de expressão da proteína em cada amostra são mostrados na Tabela 113.

Expressão da proteína AAD-1 no milho DAS-40278-9 em experimentos realizados na América do Norte.

Durante o ano de 2008 conduziram-se estudos de expressão da proteína em diferentes tecidos de milho com o evento DAS-40278-9 (Phillips et al., 2009, Estudo 090084). Os ensaios foram conduzidos em 5 locais nos Estados Unidos (Iowa, dois locais em Illinois, Indiana e Nebraska) e em Ontário no Canadá em 2008, com diferentes condições ambientais e práticas agronômicas. Quatro tratamentos do milho DAS-40278-9 foram testados (não pulverizado, pulverizado com 2,4-D, pulverizado com quizalofope e pulverizados com 2,4-D e

quizalofope). Amostras dos tecidos de plantas foram coletadas incluindo: folhas, raízes, toda a planta, pólen e grão. Os tecidos foram coletados no período de cultivo do milho nos estádios V2-V4, V9, R1, R4 e R6 (estádios das plantas descritos por Ritchie et al., 2008), conforme descrito na Tabela 12.

Resultados das análises de expressão .

A proteína AAD-1 extraível e solúvel foi quantificada por ELISA. (Tabela 13 deste relatório). O valor medio variou de 2,87 ng/mg de peso seco no estadio de raiz R1 a 127 ng/mg no tecido de pólen. Os valores da expressão foram semelhantes no tratamento não pulverizado e nas parcelas pulverizadas com os herbicidas 2,4-D e quizalofope.

Em 2009 conduziram-se novos estudos de expressão da proteína em diferentes tecidos de milho com o evento DAS-40278-9, em 8 regiões representativas do cultivo do milho nos EUA, com diferentes condições ambientais e práticas agronomicas (Phillips e Lepping, 2010, Estudo 091033.02). .

Os valores médios variaram entre 2,08 ng/mg de peso de planta inteira no R6 a 101,62 ng/mg no pólen e semelhantes nos diversos tratamentos descritos acima de diversas localidades.

Tratamento estatístico.

O tratamento estatístico dos dados deste estudo consistiu em cálculos de média, desvios padrão e análise de regressão da curva de calibração.

Conclusão do estudo de expressão da proteína AAD-1 no milho DAS-68416-4

Os estudos no Brasil, Estados Unidos e no Canada foram realizadas em condições ambientais, agronômicas e germoplasmas distintas, a variação na expressão da proteína AAD-1 nos vários tecidos mostraram padrão semelhante. Resumindo maior expressão no polem, (157 - 183ng/mg no Brasil, 108 a 127 ng/mg nos EUA,e no Canada de 91,7 a 101,6 ng/mg. Os valores mais inferiores de expressão foi observada na raiz R1, e na planta inteira, variando de 2,18 a 4,14 ng/mg no Brasil de 2,87 a 5,16 nos EUA e no Canada de 2,08 a 4,78ng/mg. Na folhaV2-V4 e forragem ficaram com valores intermediários aos descritos na planta, grão e raiz. A proteína AAD-1 sofre rápida desnaturação com o aumento da temperatura no processamento do alimento, e rapidamente degradados em fragmentos de peptídeos no ambiente do trato gastrointestinal de animais ou seres humanos. Testes simulados de digestibilidade da proteína AAD-1 indicaram que sua degradação ocorre em alguns segundos sugerindo ser digerida rapidamente no trato intestinal (vide item 5, Anexo III). Os conhecimentos acumulados em segurança alimentar do milho DAS-40278-9 demonstram que o OGM não difere do milho convencional em características agronômicas, morfológicas, reprodutivas (itens 2.2. e 2.3., Anexo IV) e também na composição química e nutricional do alimento (itens 3.1.1. a 3.1.3., Anexo III). Resultados mostram que a proteína AAD-1 não tem características de compostos alergênicos, que é degradada rapidamente em suco gástrico simulado e que é termo-lábil. Essas características do milho DAS-40278-9 tornam altamente improvável que o produto novo possa causar possíveis efeitos deletérios em animais prenhes e potencial teratogênico.

Estudo da Avaliação de risco a saúde humana e animal

A Dow AgroSciences conduziu uma avaliação de segurança detalhada da proteína AAD-1 para avaliar a possibilidade da ocorrência de efeitos adversos em humanos ou animais resultante da liberação de plantações no meio ambiente contendo a proteína AAD-1. A avaliação concluiu que a proteína AAD-1 possui pouca probabilidade de causar reações tóxicas ou alérgicas a humanos e animais. Em 6 de setembro de 2007 a Dow AgroSciences apresentou uma avaliação detalhada do milho DAS-40278-9 para a agência regulatória de saúde dos Estados Unidos, FDA, como parte do processo de consulta para alimentos

resultantes de bioengenharia. Nesta consulta destaca-se o milho *Zea mays mays*, pela sua importância econômica mundial, e o organismo doador, *Sphingobium herbicidovorans*, uma bactéria do solo. O microrganismo é portador de genes que codificam enzimas capazes de utilizar fenoxi auxinas e herbicidas AOPP como fontes de carbono para a bactéria (Wright et al., 2009). Nesse estudo foi utilizada uma abordagem passo a passo, e por força de evidência (Codex, 2009) para avaliar os potenciais efeitos tóxicos e alérgicos da proteína AAD-1. A proteína AAD-1 não compartilha semelhanças significativas na sequência de aminoácidos com alérgenos conhecidos. Nenhuma homologia significativa foi identificada quando a sequência da proteína AAD-1 foi comparada aos alérgenos conhecidos no banco de dados da versão 7.00 do FARRP (Food Allergy Research & Resource Program - Programa de Pesquisa e Recursos Alérgicos da Indústria Alimentícia), usando o critério de busca de comparação de pelo menos oito ou mais aminoácidos contíguos idênticos, com sequências de aminoácidos em compostos alergênicos ou mais de 35% de identidade numa sequência de 80 aminoácidos. A proteína AAD-1 é degradada rápida e totalmente em fluido gástrico simulado (SGS). Além disso, essa proteína é rapidamente digerida, ou seja, não detectável após 30 segundos sob as condições do SGS in vitro (0,32% de pepsina, pH 1,2 a 37°C), como demonstrado pelo SDS-PAGE e pela análise Western Blot.

A proteína AAD-1 não está presente no estado glicosilado. Nenhuma glicosilação da proteína AAD-1 foi detectada usando o SDS-PAGE e um sistema de detecção de glicosilação de risco à biossegurança.

Nos testes de toxicidade em ratos, não houve sinais de mortalidade ou clínicos nos animais CD-1 após a administração oral da proteína AAD-1 na dose de 2.000 mg proteína por kg de peso corporal. Além disso, foram realizados estudos da expressão da proteína AAD-1 em plantas DAS-40278-9 através da análise de folhas, raiz, pólen, tecidos do grão e da planta inteira, com e sem aplicação de herbicidas. O baixo nível de expressão da proteína AAD-1 apresenta baixo risco de exposição a humanos e animais. Os resultados da avaliação geral de segurança da proteína AAD-1 indicaram que é pouco provável que ocorra reações alérgicas em humanos ou que seja tóxica para humanos ou animais. 2. Possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão de OGM e seus derivados.

Efeitos da proteína AAD-1.

O milho é extensivamente cultivado e consumido no Brasil e tem uma ampla história de uso seguro. Na forma de grãos, forragem, ou derivados não é considerado causador de efeitos tóxicos em humanos, animais ou outros organismos (Della Valle, 1983).

Por não ter características patogênicas e efeitos adversos na alimentação humana, tem sido cultivado de forma extensiva desde períodos pré-colombianos, por civilizações mesoamericanas, notadamente Astecas, Maias e Incas.

Estudos realizados no Brasil, Canadá e Estados Unidos, demonstraram que o milho DAS-40278-9 não difere do milho convencional em características agrônomicas, morfológicas, reprodutivas (itens 2.2 e 2.3, Anexo IV) e na composição química e nutricional (itens 3.1.1. a 3.1.3., Anexo III). A análise de composição do grão e de forragem (ração) confirma que o milho DAS-40278-9 é substancialmente equivalente ao milho não modificado geneticamente e, por conseguinte, de valor nutritivo comparável.

A quantia de metabólitos secundários quantificados nas amostras de milho DAS-40278-9 (inositol, rafinose, furfural, ácido p-cumárico, ácido ferúlico) foram estatisticamente semelhantes ($P < 0,05$) aos intervalos padrões relatados em literatura. Os valores dos antinutrientes quantificados nas amostras de milho DAS-40278-9 (ácido fítico e inibidor da tripsina) foram estatisticamente semelhantes ($P < 0,05$) aos intervalos padrões relatados em literatura. Nenhuma das proteínas identificadas na pesquisa apresenta qualquer ocorrência relatada de risco à biossegurança.

Estudo in silico de semelhança da sequência da proteína AAD1 e toxinas.

A proteína AAD-1 não mostrou homologia significativa com alérgenos conhecidos. Segundo os bancos de dados criados pelo Comitê da FAO/WHO Expert Consultation (2001) e Codex Alimentarius (Codex Ad Hoc Open-ended Working group on Allergenicity, 2001). A comparação com o banco de dados de DNA padrão e de sequências de proteínas (FARRP Allergen Database Version 9.00) com a proteína AAD-1 e sequências de 8 ou mais aminoácidos contíguos ou superior a 35% de sequências de 80 aminoácidos de alérgenos conhecidos. A proteína AAD-1 não apresentou também semelhança significativa com sequências de aminoácidos de toxinas conhecidas. A pesquisa de similaridade foi realizada através da ferramenta BLASTp contra o banco de dados GenBank de proteínas não redundantes (publicado em 10 de fevereiro de 2007 com 4.554.902 sequências com 1.568.234.006 aminoácidos). A única semelhante encontrada foi com outra dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato, a mesma classe da enzima AAD-1. Nenhuma das proteínas semelhantes identificadas na pesquisa apresenta histórico de risco à biossegurança.

Estudos de transferência genica

A transferência de material genético provenientes de grãos de milho ou de produtos feitos a partir de milho, para microrganismos no sistema gastrointestinal humano é insignificante. Não existe nenhum mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva de que o DNA poderia se transferir de plantas para microrganismos (Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh et al. 1994; Prins e Zadoks, 1994; Schluter et al. 1999) ou diretamente das plantas para células epiteliais no baixo estômago (FDA, 1994; Calgene, 1993). Em um 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. O workshop concluiu que não há evidência que comprove a transferência de genes de plantas para microrganismos do trato digestivo. Caso a transferência pudesse ocorrer, problemas de saúde dependeriam de muitos fatores, incluindo a habilidade do microrganismo transformado replicar no trato digestivo e expressar o produto gênico. Isso exigiria que o gene transferido estivesse também sob o controle de promotores da bactéria (também ausente em plantas).

Risco na dieta.

Devido ao fato das proteínas que apresentam efeitos tóxicos atuarem através da exposição oral e em forma aguda (Pariza e Foster, 1983; Sjoblad et al., 1992; Pariza e Johnson, 2001), foi avaliado a segurança da proteína AAD-1 em um estudo de toxicidade oral aguda (Wiescinski, 2007). Os resultados confirmam a ausência de atividade tóxica aguda desta proteína em mamíferos. A toxicidade desta proteína para os seres humanos e animais foi examinada em um estudo no qual se avaliou a toxicidade oral aguda em ratos. A proteína foi administrada em forma oral por meio de sonda gástrica. A dose mais alta testada foi de 2.000 mg de AAD-1 por kg de peso corporal. Todos os animais sobreviveram e não foram observados sintomas clínicos durante o estudo. No momento da finalização do estudo (15-dias) não foi observado efeitos patológicos relacionados ao tratamento e todos os animais haviam adquirido ganho de peso. O estudo permitiu concluir que a DL50 da proteína AAD-1 em ratos (fêmeas e machos) foi maior que 2.000 mg/kg. Desse modo a dose observada sem efeito, NOEL, foi considerada como sendo maior que 2.000 mg/kg PC (maior dose testada).

O consumo de milho.

Foram utilizados dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (WHO), sobre limites máximos de consumo de cada alimento para a exposição aguda em todo o mundo, com base na informação aportada por vários países (http://www.who.int/foodsafety/chem/acute_data/en/, Table Highest Reported 97.5th Percentile Consumption Figures (Eaters Only) for Various Commodities by the General Population & Children Ages 6 & Under, Updated April 2008). A Tabela 20 inclui os valores máximos de percentil 97,5 para o milho e

outras commodities relacionadas, estimados em vários países. Para o milho DAS-40278-9, valor máximo de consumo adequado está associado ao grupo "Milho GC 645" reportado pela França. Outras informações para milho doce e milho pipoca são apresentadas aqui como dados complementares, contudo não existem planos de introdução da proteína AAD-1 nestas commodities. Informações para o óleo de milho são apresentadas também como um dado complementar, pois é sabido que os óleos e outras frações altamente refinados não contêm quantidades significativas de proteínas. Além disso, o consumo total agudo em todas estas commodities não tem sentido de ser calculado, pois não é apropriado associar valores de resultados da pesquisa de diferentes países.

Quantidade de proteína no grão.

Foi considerado o valor médio do teor de proteína AAD-1 de 4,81 ng/mg de peso seco de grãos dos 4 tratamentos de milho DAS-40278-9 calculado da Tabela 13 do Anexo II. Utilizando a informação da WHO para o milho "GC 645" e o nível médio da expressão da proteína AAD-1 no grão observado em ensaio de campo no valor de 4,81 ng/mg, o limite máximo de exposição aguda da proteína do milho DAS-40278-9 pode ser estimado como:

Exposição = Consumo x Concentração de Proteína no grão.

Exposição (adulto) = 4,06 g/kg/dia x 4,81 ng/mg = 0,0195 mg/proteína/kg PC/dia.

Exposição (criança) = 6,17 g/kg/dia x 4,81 ng/mg = 0,0297 mg/proteína/kg PC/dia.

Cálculo da Margem de Exposição.

Estudo de toxicidade aguda realizado com material contendo a proteína AAD-1 permitiu concluir que sua toxicidade é baixa. Como não houve efeitos relacionados com o milho DAS-40278-9, é estabelecido que o nível sem efeito observado (NOEL, Nível Sem Efeito Observado) foi superior à dose mais elevada testada: NOEL > 2.000 mg/kg de AAD-1. Avaliações de risco agudo geralmente não são exigidas para substâncias com valores de NOEL acima de 500 mg/kg de peso corporal por dia ou para compostos que não têm mortalidade abaixo de 1.000 mg/kg de peso corporal em estudos de dose única (Solecki et al., 2005). No entanto, para realizar uma estimativa de exposição da proteína AAD-1 no contexto, uma comparação das informações de exposição para o limite inferior NOEL foi feita para fornecer margens de exposição (MOE) para a proteína AAD-1, onde: MOE = NOEL / Exposição. Quanto maior o valor MOE, menor a probabilidade que ocorram efeitos adversos, porque a exposição está bem abaixo do limite estabelecido NOEL (Tabela 21). Os valores calculados para MOE da proteína AAD-1 do milho são extremamente altos, indicando que dificilmente irá ocorrer efeitos adversos da exposição alimentar aguda através do milho

A ingestão de proteína.

Considerando o consumo de milho, e os conteúdos da proteína AAD-1 expressas no grão, foi calculado o limite máximo de ingestão ou potencial de exposição aguda dessa proteína, ou seja, o montante máximo que pode ser ingerido diariamente (Tabela 22).

Realizou-se uma avaliação de risco do consumo do grão de milho contendo a proteína AAD-1. Comparando-se o consumo de milho e, portanto, da proteína, e o NOEL pode-se fazer uma avaliação de risco dietário agudo da proteína expressa no grão de milho DAS-40278-9 que é apresentada na Tabela 22.

Quantidade de grão necessária de ser consumido diariamente para alcançar um valor de ingestão equivalente ao NOEL.

Adultos.

O valor da margem de exposição de 102.564 foi extremamente elevado. Para colocar isto em perspectiva, uma pessoa deve consumir ao redor de 25.000 kg de grãos de milho contendo o

evento DAS-40278-9 por dia para coincidir com o consumo definido como nível sem efeito (NOEL) da proteína AAD-1.

Crianças de 6 anos.

A margem de exposição foi maior que 67.000. A criança deveria consumir ao redor de 8.300 kg de grãos de milho que contém o evento DAS-40278-9 por dia para coincidir com o consumo definido como nível sem efeito (NOEL) da proteína.

Conclusão da avaliação de risco do milho DAS-40278-9.

A margem de exposição calculada indica que a ocorrência de efeitos adversos à saúde humana, resultante do consumo de grãos do milho DAS-40278-9 é praticamente nula. Os valores estimados estão possivelmente superestimados, porque a exposição real à proteína AAD-1 deve ser menor, decorrente da degradação da proteína durante a colheita, da estocagem dos grãos, de seu processamento e preparação dos alimentos. A presença da proteína AAD-1 no milho e seus produtos no momento do consumo é esperada ser menor do que o índice medido no momento da colheita cujo valor foi utilizado para a avaliação de risco.

Estudo da composição centesimal

No presente relatório também foi realizada uma análise minuciosa da composição nutricional do milho DAS-40278-9, comparando-se sempre a variante convencional. Pôde-se concluir no trabalho que a composição nutricional é similar, corroborando com fato de que o milho geneticamente modificado não deve gerar efeitos deletérios à saúde humana e animal. Ainda soma-se a este fato que a proteína AAD-1 não apresenta homologia alguma com proteínas reconhecidamente alergênicas ou tóxicas, legitimando a ausência de efeitos adversos pelo consumo do referido milho.

As conclusões de análises imunológicas e histológicas de tecidos relevantes, especialmente do trato digestivo.

Um estudo de toxicidade oral aguda com a proteína AAD-1 foi realizada em ratos ministrando de 2.000 mg da proteína AAD-1 por kg após o ajuste de pureza. Todos os animais sobreviveram, e nenhum sinal clínico foi observado durante o estudo. Todos os animais ganharam peso 15 dias após o término do estudo. Não foram relacionadas observações patológicas com o tratamento aplicado. O relatório conclui que, nas condições do estudo, a DL50 oral aguda do milho DAS-40278-9 em ratos machos e fêmeas foi maior que 2.000 mg/kg. O NOEL foi superior a 2.000 mg/kg com base no fato de que nenhuma mortalidade foi observada e não houve nenhum efeito adverso ou não adverso com os animais tratados com milho DAS-40278-9. A agência EPA dos EUA classifica a DL50 oral aguda do milho DAS-40278-9 superior a 2.000 mg/kg, na categoria III de toxicidade oral aguda, de uma escala de I a IV, indicando uma leve toxicidade. Entende-se, portanto, que a proteína AAD-1 apresenta baixo potencial de toxicidade aguda.

Capacidade do OGM de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos ao consumidor, animal ou humano, relatando as evidências experimentais.

Estudos realizados nos Estados Unidos e Canadá e confirmados com estudos feitos no Brasil demonstrou que o milho DAS-40278-9 não difere do milho convencional em características agrônomicas, morfológicas, reprodutivas (itens 2.2. e 2.3., Anexo IV) e na composição química e nutricional (itens 3.1.1. a 3.1.3., Anexo III). A análise de composição do grão e de forragem (ração) confirma que o milho DAS-40278-9 é substancialmente equivalente ao milho não modificado geneticamente e, por conseguinte, de valor nutritivo comparável. Os antinutrientes ácido fítico, rafinose e inibidor de tripsina e dos metabólitos

secundários inositol, furfural, ácido p-cumarico, ácido ferúlico, quantificados nas amostras de milho DAS-40278-9 foram estatisticamente semelhantes ($P < 0,05$) ao milho controle convencional e os valores obtidos estiveram dentro de intervalos padrões relatados em literatura. Pode-se propor que o milho DAS-40278-9 não produz toxinas ou metabólitos que prejudique o consumidor humano ou animal como o milho convencional. O consumo de milho DAS-40278-9 e/ou de seus produtos são tão seguros quanto o consumo do milho convencional e/ou seus produtos neste quesito.

As avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais.

Estudos realizados no Brasil, Canadá e Estados Unidos, demonstraram que o Milho AAD-1 (evento DAS-40278-9) não difere do milho convencional com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas. Os níveis dos antinutrientes ácido fítico, rafinose e inibidor da tripsina e dos metabólitos secundários inositol, furfural, ácido p-cumárico, ácido ferulico, quantificados nas amostras de milho DAS-40278-9 foram estatisticamente semelhantes ($P < 0,05$) ao milho controle convencional e os valores obtidos estiveram dentro de intervalos padrões relatados em literatura. Portanto o milho DAS-40278-9 não produz toxinas ou metabólitos que possam causar efeito ao consumidor humano ou animal comportando-se como o milho convencional com relação as essas características. Os dados obtidos confirmam a ausência de interações genéticas adversas resultantes do processo de transformação.

A análise de composição do grão e de forragem (ração) confirma que a linhagem de milho AAD-1 (evento DAS-40278-9) É substancialmente equivalente ao milho não modificado geneticamente e, por conseguinte de valor nutritivo comparável.

O consumo de milho DAS-40278-9 e/ou de seus produtos é tão seguro quanto o consumo do milho convencional e/ou seus produtos, com relação as características de segurança alimentar.

Estudos de alimentação de ratos com a proteína AAD-1.

Para confirmar a similaridade do milho AAD-1 com o milho convencional com relação a aspecto de toxicidade oral aguda da proteína AAD-1 foi realizado por Thomas e Marshal (2010), um estudo com ratos ministrando-se rações variando de 0,452 a 45,23 mg/kg peso corporal/dia (mkd) em comparação com uma dieta contendo 45,23 mg/kg peso corporal/dia de albumina de soro bovino, por período de 28 dias (2010). As médias de peso corporal e ganho de peso para ratos machos e fêmeas são mostradas na Tabela 70 e na Tabela 71. Não houve diferença estatística significativa entre os dois tipos de milho para peso corporal e ganho de peso nos dois sexos e nas diferentes doses usadas da proteína AAD-1. Porém as médias de peso corporal e do ganho de peso das fêmeas na dose mais baixa de 0,452 mkd do grupo AAD-1 foram marginalmente mais baixas do que o valor do controle aos 29 dias do experimento (diferenças estatísticas não significativas). Para a variável, consumo de ração, nenhuma diferença significativa foi observada nos dois sexos, entre o grupo que recebeu a dieta com a proteína AAD-1 e o grupo controle.

Nos estudos de patologia clínica, em hematologia, a análise estatística entre os animais que receberam a proteína AAD-1 e o grupo controle não revelou diferenças significativas entre os dois tratamentos, ou seja, a dieta com a proteína AAD-1 não produziu alterações em relação ao grupo controle. Não houve diferenças estatísticas significativas para ambos os sexos no grupo que recebeu a proteína AAD-1 em comparação com o controle para os parâmetros bioquímicos. Na anatomia patológica não houve diferenças estatísticas significativas no peso de órgãos de machos e de fêmeas corrigidos com o peso corporal entre animais que receberam a proteína AAD-1 e grupo controle para a maior parte dos órgãos avaliados. Para os machos foram avaliados peso de órgãos em relação ao peso corporal para glândula suprarrenal, coração, rim, fígado, cérebro, próstata, próstata+vesícula seminal, baço, testículo, timo e epidídimos.

Observou-se pequenas diferenças, que foram significativas para peso do coração no grupo dos machos tratados com AAD-1, considerado dentro da variabilidade experimental, pelo

histórico pesquisas semelhantes do laboratório, assim como, não foram observados efeitos histo-patológicos associados a essa diferença. O mesmo ocorreu com o peso da próstata que foi estatisticamente inferior ao do controle, mas sem alterações histo-patológicas significativas, quando ocorreram foram consideradas ao acaso e sem relação com a dieta contendo a proteína AAD-1.

Em outro estudo os autores Wiescinski e Golden, 2007 concluíram que a DL50 oral aguda de AAD-1 em ratos machos e fêmeas foi maior que 2.000 mg/kg (5000 mg/kg de substância teste com 40% de pureza). O NOEL, portanto esteve acima de 2.000 mg/kg baseado no fato de que nenhuma mortalidade foi observada e não houve nenhum efeito adverso ou não adverso, com os animais tratados com AAD-1. Todos os animais ganharam de peso nos 15 dias de teste. A agência EPA dos EUA classificaria a DL50 oral aguda do milho AAD-1 superior a 2.000 mg/kg, na categoria III de toxicidade oral aguda, em uma escala de I a IV. Conclui-se que a proteína AAD-1 apresenta baixo potencial de toxicidade aguda.

Estudo em animais para avaliação de similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos, relatando possíveis reações alérgicas
Utilizando os critérios de decisão de alergenicidade da ILFSI-IFBC (Metcalf et al., 1996) a proteína AAD-1 do evento DAS-40278-9 foi testada quanto ao potencial alergênico através dos seguintes procedimentos:

Avaliação do potencial alergênico do organismo doador do gene.

O organismo doador, *Sphingobium herbicidovorans* (anteriormente designado *Sphingomonas herbicidovorans*), é uma bactéria presente no solo portadora de genes que codificam enzimas que facilitam a decomposição dos herbicidas fenoxi auxina (2,4-D) e AOPP (haloxifope-R, quizalofope, etc.) permitindo a bactéria usá-los como fonte de carbono (Wright et al. 2009). *Sphingobium herbicidovorans* faz parte do gênero *Sphingomonas*, largamente distribuído na natureza, sendo isolada de habitats tanto terrestres como aquáticos, de raízes de plantas, etc. Devido a suas capacidade biodegradativa e biossintética as *Sphingomonas* têm sido largamente usadas em aplicações biotecnológicas, incluindo biorremediação de contaminantes ambientais para produção de polímeros extracelulares tais como Sphinganas os quais são extensivamente usados na indústria de alimento (Bower et al., 2006; Pollock e Armentrout, 1999; Lal et al. 2006; Johnsen et al., 2005). O microrganismo *S. herbicidovorans* é um candidato para uso em biorremediação de poluentes tóxicos com base no complemento de enzimas de degradação xenobioticas. As investigações deste organismo têm focado a caracterização de enzimas que metabolizam o herbicida, como a proteína AAD-1, que facilita a utilização de herbicidas fenoxi auxina (2,4-D) e AOPP como fontes de carbono para a bactéria (Wright et al., 2009). Não há relatos de *S. herbicidovorans* sendo apontado como um patógeno humano ou capaz de produzir alérgenos. Entre aproximadamente 20 espécies reconhecidas de *Sphingobium*, apenas um, *S. yanoikuyae* foi isolado a partir de um ambiente clínico. Entretanto, outros gêneros relacionados, são conhecidos por causar infecções raras que são geralmente limitadas na virulência (Balkwill et al., 2006). Por causa de sua onipresença e capacidade de adaptação, *Sphingomonas* são frequentemente encontrados na prática clínica, mas geralmente não associados a infecção. Há relatos de *Sphingomonas* produtores de glicolípides antigênicas que podem ter uso como terapêutica (Kinjo et al., 2008). Outras *Sphingomonas* relacionadas são conhecidas por produzir *sphingans* (um polissacarídeo extracelular do tipo gelana), que pode ser utilizado em alimentos como agentes gelificantes, estabilizantes ou agentes de suspensão (van Kranenburg et al., 1999).

Busca da homologia com alérgenos conhecidos.

A proteína AAD-1 não tem homologia significativa com alérgenos conhecidos. Isso foi constatado através de um programa de avaliação de sequências de aminoácidos de proteínas elaborado pelos Comites da FAO/WHO Expert Consultation (2001) e Codex Alimentarius (Codex Ad Hoc Open-ended Working group on Allergenicity, 2001). Foi feita uma busca no banco de dados de DNA padrão e de sequências de proteínas (FARRP

Allergen Database Version 9.00) procurando homologia significativa entre sequência de aminoácidos da proteína AAD-1 com sequências de 8 ou mais aminoácidos contíguos ou superior a 35% de identidade de sequência a 80 aminoácidos de alérgenos conhecidos. Esta pesquisa não mostrou registros significativos de similaridade da proteína AAD-1 com alérgenos de ação conhecida. A proteína AAD-1 não tem semelhança significativa com sequências de aminoácidos de toxinas conhecidas. Aminoácidos semelhantes da proteína AAD-1 foram avaliados usando uma pesquisa de similaridade através da ferramenta BLASTp contra o banco de dados GenBank de proteínas não redundantes (publicado em 10 de fevereiro de 2007 com 4.554.902 sequências com 1.568.234.006 aminoácidos). A única semelhança encontrada foi com outra dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato, a mesma classe da enzima AAD-1. Nenhuma das proteínas semelhantes identificadas na pesquisa apresenta qualquer ocorrência relatada de risco a biossegurança.

c. Estudos de digestão simulada in vitro.

A digestibilidade da proteína AAD-1 foi testada in vitro, utilizando suco gástrico simulado (SGS). Para o método SGS, a proteína AAD-1 (0,074 mM) produzida em sistema heterólogo usando o microorganismo *Pseudomonas fluorescens* foi incubada em SGS (0,32% w/v pepsina em pH 1,2; U.S. Pharmacopeia) nos intervalos de tempo programado (0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 minutos), 0,1 ml da mistura de reação foi removida e colocada em um tubo de microcentrífuga contendo 0,04 ml de uma solução para parar a reação (200 mM Na₂CO₃, pH de aproximadamente 11,0). As amostras foram então analisadas por SDS-PAGE e Western Blot usando um anticorpo específico para AAD-1. Os resultados demonstraram que a proteína AAD-1 é facilmente digerida e não detectável em 30 segundos no SGS (item 5, Anexo III).

d. Determinação da estabilidade ao calor.

A estabilidade térmica da proteína AAD-1 foi estudada pelo aquecimento de soluções de proteína por 30 min a 50, 70 e 95°C e 20 min. em uma autoclave (120°C a aproximadamente 117 kPa (17 PSI)) em uma solução de fosfato básico. A atividade da proteína AAD-1 foi medida por um ensaio de enzima modificada através do procedimento descrito por Fukumori e Hausinger (1993). Todas as condições de aquecimento, foi eliminado acima de 97% da atividade enzimática da proteína, demonstrando que a proteína AAD-1 é termo-lábil (item 5, Anexo III). Conclui-se desses estudos que é improvável que a proteína AAD-1 possa causar reações alérgicas ou tóxicas em humanos ou em animais.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Abranches, R.; Schultz, R.; Allen, G. C. (2005). Matrix attachment regions & regulated transcription increase & stabilize transgene expression. *Plant Biotechnology Journal* 3, pp. 535-543.

ALAM - Asociacion latinoamericana de malezas. (1974). Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. *ALAM*, v.1, n.1, p.35-38.

Allen, G. C.; Spiker, S.; Thompson, W. F. (2000). Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology* 43: 361-376. M.A.

Armstrong, C.; L.; Green, C. E.; Phillips, R. L. (1991). Development & availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 65: 92-93.

Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

Balkwill, D. L.; Fredrickson, J. K.; Romine, M. F. (2006). *Sphingomonas* & Related Genera. *Prokaryotes* (2006) 7:605-629. Chapter 6.10. DOI: 10.1007/0-387-30747-8_23.

Bower, S. Burke, E.; Harding, N.E.; Patel, Y.N.; Schneider, J.C.; Meissner, D.; Morrison, N.A. & Bezanson, R. (2006). Mutant bacterial strains of the genus *Sphingomonas* deficient in production of polyhydroxybutyrate & a process of clarification of sphingans & compositions thereof. U.S. Patent #20060121578.

Calgene, Inc. (1993). Food additive petition for the APH(3.) II as a processing aid FDA Docket Number: 93F-0232.

Cleveland, C. B.; Herman, R. A.; Tagliani, L. A. (2009). Human and Livestock Exposure Assessment for AAD-1 Protein in DAS-40278-9 Maize. Dow AgroSciences. Unpublished report. Study 091115.

Christensen, A. H.; Quail, P. H. (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5, 213-218.

Codex Alimentarius, (2003). Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, 30 June- 5 July, (2003). Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants, & Appendix IV, Annex on the assessment of possible allergenicity, pp. 47-60.

Codex Alimentarius, (2009). Codex Alimentarius Special Publications, Foods Derived from Modern Biotechnology (Second Edition), 2009; Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants; Annex 1: Assessment of Possible Allergenicity, 22-27.

Connor, J. A. Glare, T. R. Nap, J. P. (2003). The release of genetically modified crops into environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal*. 33, 19-46.

Cressman R. F., Ladics G., (2009). Further evaluation of the utility of sliding window FASTA in predicting cross-reactivity with allergenic proteins. *Regul Toxicol Pharmacol*, 54:S20-S25.

Cruz, M. C. P.; Ferreira, M. E.; Gravena, R.; Cordioli, V. H.; Guimarães, J. R. D. O.; Amorim, L. C. S. (2011a). Impacto do milho geneticamente modificado contendo o evento DAS-40278-9 em características físico-químicas do solo e concentração de nutrientes nas folhas. Relatório não publicado. Gravena / UNESP / Dow AgroSciences.

Cruz, M. C. P.; Ferreira, M. E.; Gravena, R.; Cordioli, V. H.; Guimarães, J. R. D. O.; Amorim, L. C. S. (2011b). Decomposição de plantas de milho geneticamente modificado contendo o evento DAS-40278-9. Relatório publicado. Gravena / UNESP / Dow AgroSciences.

Doebley, J. F. & Iltis, H. H. (1980). Taxonomy of *Zea* (Graminae). I. Subspecific classification with key to taxa. *American Journal of Botany* 67: 986-983.

Dow AgroSciences (2005b). Determination of haloxyphop-R and haloxyphop-R-methyl-ester as the acid equivalent in baby foods by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. Unpublished method. GRM 05-09.

Dow AgroSciences (2010). Analytical Summary for Magnitude of the Residue of 2,4-D and

- Quizalofop-P-ethyl in/on Herbicide Tolerant Field Corn Containing the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1) Gene. ARA-09-15-10.
- Embrey, S. K.; Korjagin, V. A. (2008). In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (abbreviation AAD-1). Dow AgroSciences. Unpublished report. Study 080062.
- FAO/WHO. (2001). Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology - Allergenicity of Genetically Modified Foods - Rome, 22 - 25 January 2001. Rome: Food & Agriculture Organisation of the United Nations. Section 6.1, page 12 (<http://www.fao.org/es/esn/gm/allergygm.pdf>).
- FDA (Food & Drug Administration). (1994). U. S. Food & Drug Administration. Statement of policy: foods derived from new plant varieties. Fed. Reg. (USA). 57:22984-23005.
- FDA. (1992). Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. Fed. Reg., 57, 104, pp. 22984-23005. 1992.
- Fujii, K.; Urano, N.; Ushio, H.; Satomi, M. & Kimura, S. (2001). *Sphingomonas cloacae* sp. nov; a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 603-610
- Fukumori, F. & Hausinger, R. P. (1993). Purification & Characterization of 2,4-Dichlorophenoxyacetate/-Ketoglutarate Dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 268, 15: 24300-24317.
- Galan, M. P. R. (2011). Expressãode proteína em ensaios de campo, composição nutricional e caracterização agronomica de uma linhagem de milho híbrido contendo AAD-1 evento DAS-40278-9. Dow AgroSciences. Relatório publicado. Estudo 091167.
- Goodman R. E., Vieths S., Sampson H. A., Hill D., Ebisawa M., Taylor S. L., van Ree R. (2008). Allergenicity assessment of genetically modified crops Ð what makes sense? *Nat Biotech*, 26:73-81
- Herman R., Song P., ThirumalaiswamySekhar A. (2009). Value of eight-amino-acid matches in predicting the allergenicity status of proteins: an empirical bioinformatic investigation. *Clinical and Molecular Allergy*, 7:9.
- Hinteregger, C. and Streichsbier, F. (2004). Continuous biodegradation of phenoxyalkanoate herbicides by *Sphingomonas herbicidovorans* MH in a PU-supplied bubble reactor. *Acta Biothechnologica* 19 94): 279-292.
- ILSI (International Life Sciences Institute). (2010). ILSI Crop Composition Database. www.cropcomposition.org. Version 3.0 <http://www.cropcomposition.org/>.
- Iltis, H. H. (1983). From teosinte to maize. The catastrophic sexual transmutation. *Science* 222: 886- 894.
- Iltis, H. H.; J. F. Doebley. (1980). Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex & generic synopsis. *American Journal of Botany* 67: 994-1004.
- Koehler, H. P. E. (1999). *Sphingomonas herbicidovorans* MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1999) 23, 336-340.

Ladics G. S., (2008). Current Codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity. *Food Chem Toxicol* 2008, 46:S20-S23.

Luo, L.; Pappalardi, M. B.; Tummino, P. J.; Copeland, R. A.; Fraser, M. E.; Grzyska, P. K.; Hausinger, R. P. (2006). An assay for Fe (II)/2 oxoglutarate-dependent dioxigenases by enzyme-coupled detection of succinate formation. *Analytical Biochemistry* 353 (2006) 69-74. Ed Elsevier.

Metcalfe, D. D.; Astwood, J. D.; Townsend, R.; Sampson, H. A.; Taylor, S. L. & Fuchs, R. L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, pp. S165-S186.

Muller T. A.; Byrde S. M.; Werlen C.; van der Meer J. R.; Koehler H. P. (2004). Genetic analysis of phenoxyalkanoic acid degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl Environ Microbiol* 70:6066-6075.

Nickel, K.; Suter, M. J. F.; Kohler, H. P. E. (1997). Involvement of two.-ketoglutarate-dependent dioxigenases in enantioselective degradation of (R)- & (S)-mecoprop by *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *J Bacteriol* 179:6674-6679.

OECD. (2002). Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*) : Key food & feed nutrients, anti-nutrients & secondary plant metabolites. *ENV/JM/MONO*, 25. 42p.

Pariza, M. W. & Johnson E. A. (2001). Evaluating the safety of the microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new Century. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 33, 173-186.

Pearson, W. R., (2000). Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol Biol* 132:185-219.

Petolino, J. F. & Arnold, N. L. (2009). whiskers-Mediated Maize Transformation. *Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize*, vol. 526. Humana Press, a part of Springer Science

Phillips, A. M.; Lepping, M. D. (2010). Field expression, nutrient composition analysis and agronomic characteristics of a hybrid maize line containing aryloxyalkanoate dioxygenase-1 (AAD-1) event DAS-40278-9. *Studies* 091033.02.

Polevoda, B. & Sherman, F. (2000). N-terminal Acetylation of Eukaryotic Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 275:47, 36479-36482.

Pollock, T. & Armentrout, R. (1999). Planktonic/sessile dimorphism of polysaccharide-encapsulated *Sphingomonas*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23 (4-5): 436-441.

Prins, T. W. & Zadoks, J. C. (1994). Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a literature review. *Euphytica* 76:133-138.

Rampazzo, P. E. (2011a). Resíduos de 2,4-D em milho geneticamente modificado com gene para tolerancia a 2,4-D ap—s aplicaçãode GF-2665, herbicida, Brasil. *Dow AgroSciences. Estudo* 101751.

Redenbaugh, K.; Hiatt, W.; Martineau, B.; Linfrman. J. & Emlay, D. (1994). Aminoglycoside 3-phosphotransferase II (aph (3.)II): review of its safety & use the production of genetically

engineered plants. *Food Biotechnology* 8 137-165.

SAS Institute Inc. (2009). *SAS/STAT[®] 9.2 User's Guide*, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schafer, B. W.; and Embrey, S. K. (2009). Characterization of the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1) Protein Derived from Transgenic Maize Event DAS-40278-9.

Shan, G. (2007). Determination of AAD-1 Protein in Maize Tissues by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). GRM 04.19. unpublished method of Dow AgroSciences LLC.

Schnable, P. S. et al. (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, & Dynamics. *Science* Vol. 326 no. 5956 pp. 1112-1115.

Silvanovich A., Nemeth M. A., Song P, Herman R, Tagliani L, Bannon, G. A. 2006. The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity. *Tox Sci*, 90:252-258

Sjogblad, R. D.; McClintock, J. T. & R. Engler. (1992). Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 15:3-9.

Smith, J. S. C.; Goodman, C. W.; Stuber, C. W. (1985). Relationships between maize & teosinte of Mexico & Guatemala: numerical analysis of allozyme data. *Economic Botany*. 39:12-24.

Solecki, R.; Davies, L.; Dellarco, V.; Dewhurst, I.; Raaij, M. V.; Tritscher, A. (2005). Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides. *Food & Chemical toxicology* 43 (2005) 1569-1593. Ed. Elsevier.

Song, P.; (2010b); Potential Allergenicity Assessment of AAD-1 Protein Expressed in Maize Event DAS-40278-9 by Bioinformatics Analysis (Update: March, 2010). Study: 101570.

Stadler M. B., Stadler, B. M., (2003). Allergenicity prediction by protein sequence. *FASEB J.*, 17:1141-1143.

Thomas, J.; Marshall, V. A. (2010). Dow AgroSciences LL. Study 091026. AAD-1 protein: 28 day dietary toxicity study in CRE-CD1 (ICR) mice.

Thomas K., Herouet-Guicheney C., Ladics G., McClain S., MacIntosh S., Privalle L., Woolhiser M., (2008). Current and future methods for evaluating the allergenic potential of proteins: International workshop report 23-25 October 2007. *Food Chem Tox*, 46:3219- 3225.

USDA (2001). United States Department of Agriculture, Animal & Plant Health Inspection Service. Availability of determination of non-regulated status for corn genetically engineered for insect resistance & glufosinate herbicide tolerance (Docket no. 00-070-3). *Federal Register*. 66: 157, 2001.

USDA (2005). United States Department of Agriculture, Animal & Plant Health Inspection Service. Availability of Determination of Nonregulated Status for Genetically Engineered Corn *Federal Register* / Vol. 70, no. 194 / Friday, October 7, 2005 / Notices.

Watson, S. A. (1982). Maize: amazing maize, *CRC Handbook of Processing & Utilization in Agriculture*, vol. II, Part 1. Plant Products I. A. Wolf (ed.) CRC Press Inc., pp. 3-29, Florida.

Westendorf, A.; Benndorf, D.; Muller, R.H.; Babel, W. (2002). The two enantiospecific dichlorprop/-.ketoglutarate-dioxigenases from *Delftia acidovorans* MC1-protein & sequence data of RdpA & SdpA. *Microbiol. Res.* 157:317-22.

White, P.J. & Pollak, L.M.(1995). Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, products, composition, & nutritive values. *Cereal Foods World*, 40,10, pp.756-762.

WHO. (2008). http://www.who.int/foodsafety/chem/acute_data/en/, Tabla Highest Reported 97.5th Percentile Consumption Figures (Eaters Only) for Various Commodities by the General Population & Children Ages 6 & Under, Updated April 2008).

Wiescinski, M. S.; Golden R. M. (2007). AAD-1: Acute oral toxicity study in CRL:CD1 (ICR) mice. Dow AgroSciences unpublished report ID 071128.

Wright, T. R.; Lira, J. M.; Merlo, D. J. & Hopkins, N. (2009). Novel Herbicide Resistance Genes. U.S. Patent # 2009/0093366.

Zhuang, M.; Poorbaugh, J. D.; Richey, K. A.; Cruse, J. (2009b). Molecular Characterization of AAD-1 Corn Event DAS-40278-9 in a single generation. Dow AgroSciences. Unpublished report. Estudy 081120.

Zipper, C.; Nickel, K. Angst, W. Koehler, H. P. (1996). Complete Microbial Degradation of Both Enantiomers of the Chiral Herbicide Mecoprop [(RS)-2-(4-Chloro-2-Methylphenoxy) propionic Acid] in an Enantioselective Manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. *American Society for Microbiology*. 0099-2240/96/\$04.0010.

Conclusão final

Os dados apresentados no relatório e os conhecimentos descritos na literatura científica nos dão bases de segurança nutricional, toxicológica e alergênica do milho DAS -40278-9. Portanto o parecer é favorável a liberação comercial para ser usado na alimentação humana e de animais.

Caso o produto seja aprovado pela CTNBio, a proponente deverá observar os prazos e normas da Resolução Normativa 09 para o monitoramento de riscos negligenciáveis associados ao uso do evento.

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
Membro da CTNBio

