

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

A empresa Dow AgroSciences Industrial Ltda, vem por meio do relatório de biossegurança do milho DAS-40278-9, solicitar liberação comercial do referido milho transgênico e seus derivados, baseado nos termos da Lei nº 11.105/05 do Decreto nº 5.591 e da Resolução Normativa nº 5 da CTNBio.

O documento apresenta descrição extremamente detalhada de todos os experimentos necessários para liberação comercial de acordo com a legislação vigente, desde características do transgene e do processo de modificação genética, como da segurança alimentar para animais e humanos e também de experimentos que atestam a sua segurança para o meio ambiente. Abaixo descrevo parecer técnico detalhado sobre itens específicos presentes no documento.

O milho DAS-40278-9 é um produto com duas características adquiridas pelo processo de transgenia, a saber: tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e a determinados herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase) ariloxifenoxipropionato (AOPP), conhecidos como herbicidas “fop”. Estas características poderão oferecer ao produtor de milho maior flexibilidade para aquisição de herbicidas para controle de plantas daninhas e gramíneas invasoras ao seu cultivo.

O milho DAS-40278-9 advém de modificação genética por processo de transgenia onde se buscou inserir uma cópia do gene responsável para expressão da proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-1). Esta é uma proteína de 296 aminoácidos e com peso molecular de aproximadamente 33Kda, sendo uma enzima com capacidade de atividade dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato, responsável pela inativação metabólica de herbicidas da família ariloxialcanoato. O gene para produção da proteína foi otimizado em laboratório para aproximar a utilização de códons mais típicos para plantas que bactérias (códon usage), já que este gene foi isolado de uma bactéria gram-negativa presente em solos denominada

*Sphingobium herbicidovorans*. As bactérias do gênero *Sphingobium spp.* têm sido encontradas em diversos ambientes terrestres e aquáticos onde há presença de humanos e animais, sem ter sido demonstrada qualquer relação com consequências adversas até o momento.

O processo de transgenia consistiu na transformação de células de milho Hi-II com fragmento de DNA recombinante que continha em sua estrutura o gene *aad-1* sintético sendo mediada por fibras do tipo *whiskers*, que são microestruturas de carbeto de silício com capacidade de permear as membranas das células fazendo com que o DNA exógeno adentre as células. Foram realizados experimentos para seleção de células que fossem resistentes ao herbicida Haloxifope-R, representante da classe dos herbicidas “fop”. Estas células originaram tecidos embriogênicos verificados quanto à presença de cópia do gene *aad-1* no genoma do milho (verificado por ensaios de Southern blot, vide figura 9). Posteriormente as células foram utilizadas para reconstituir plântulas transgênicas (T<sub>0</sub>) que foram cruzadas com linhagens da própria Dow AgroSciences com a finalidade de gerar cultivares que expressassem a proteína AAD-1 (T<sub>1</sub>) que posteriormente deram origem a vários híbridos utilizados para caracterização do evento em questão. Foram utilizadas plantas de até a 6<sup>o</sup> geração para verificar que realmente apenas uma inserção do cassete de expressão do gene *aad-1* foi integrada em apenas um local do genoma do milho, apresentando segregação mendeliana esperada. Não há verificação de possíveis efeitos pleiotrópicos ou epistáticos pelos genes inseridos no milho em questão já que nenhuma alteração significativa foi observada na análise de caracteres fenotípicos, agrônômicos, composição de nutrientes, efeito sobre características físico-químicas do solo, degradabilidade de matéria orgânica do solo e efeito sobre o estado nutricional das plantas. Ainda pelos resultados demonstrados no presente relatório, não há indício que o milho DAS-40278-9 possa ter vantagem adaptativa ou reprodutiva em relação aos outros cultivares de milho transgênicos disponíveis no mercado atualmente.

A caracterização bioquímica da proteína AAD-1 foi realizada pelas técnicas de western blot, avaliação de glicosilação pós-traducional e MALDI-TOF para detecção proteica no milho DAS-40278-9, avaliação de glicosilação da proteína *aad-1* e seu sequenciamento proteico, respectivamente. Como era de se esperar, a proteína detectada purificada da planta apresentou peso molecular de aproximadamente 33 KDa pela técnica de Western blot (Fig. 28), ausência de glicosilação (Fig. 29) e a composição de aminoácidos validada pela técnica de MALDI-TOF (Figs. 30 e 31). A expressão proteica de AAD-1 variou entre 2,18 a 182,99 ng/mg, não sendo detectada no controle iso-híbrido convencional como esperado. Estas concentrações foram

semelhantes às encontradas em outros experimentos onde se avaliou a concentração de AAD-1 no milho DAS-40278-9 na América do Norte.

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.

Referente à inocuidade do milho DAS-40278-9 para alimentação humana e animal, foi realizada avaliação de risco baseada no consumo médio e exposição à proteína AAD-1 em humanos e animais. Pôde-se inferir que a magnitude dos valores estimados da ingestão aparente em relação à ingestão diária aceitável confirmaram as expectativas da avaliação de risco dietário agudo da proteína AAD-1 presente no milho DAS-40278-9 indicando ausência de atividade tóxica aguda em humanos e animais. Também foram realizados experimentos em aves de corte recebendo até 60% de sua dieta de milho DAS40278-9 dependendo da fase de crescimento durante sua vida de 42 dias. Não houve diferenças significativas em relação à sanidade e desempenho produtivo das aves em relação a três dietas baseadas em cultivares comerciais de milho e a uma dieta com milho iso-híbrido, o que atesta a inocuidade do referido milho para consumo animal, já que dentre as espécies de produção domésticas, as aves são as que mais consomem milho proporcionalmente em relação aos bovinos, ovinos caprinos e suínos. Ainda foram realizados de toxicidade aguda em ratos onde também não se verificou diferenças significativas entre o milho DAS-40278-9 e o milho convencional.

No que tange a avaliação de risco ao meio ambiente, foram realizadas avaliações sobre os parâmetros agronômicos, reprodutivos, de crescimento da planta e avaliação de doenças e insetos nos estudos de campo. Todos ensaios demonstraram equivalência entre o milho DAS40278-9 com milho convencional não transgênico em variadas condições ambientais e de germoplasma. Ainda foram analisados os efeitos do herbicida haloxifope-R primeiramente sobre plantas de milho DAS40278-9 e milho convencional, sendo que o primeiro foi visivelmente resistente aos efeitos do herbicida, devido a metabolização do herbicida pela enzima AAD-1. Demonstrou-se ainda que o haloxifope-R teve efeito no controle de pragas daninhas dicotiledôneas atingindo níveis comerciais em aplicações única ou sequencial, sendo similar ao herbicida utilizado como padrão do ensaio realizado. Notabilizou-se também que o milho DAS40278-9 com ou sem aplicação de herbicidas, não causou

impacto nas características físico-químicas do solo nem na concentração de nutrientes nas folhas em relação ao milho convencional não-transgênico.

Por fim, cabe ressaltar que o milho DAS40278-9 foi submetido à aprovação para liberação comercial em 5 países diferentes e na união européia. Dentre estes, já fora aprovado nos EUA, Taiwan, Austrália e Nova Zelândia, o que também atesta a inocuidade do referido cultivar já que fora analisado e aprovado por outras diferentes comissões técnicas como a CTNBio. Portanto, as informações contidas no presente relatório assim como os resultados experimentais nos permite prever que o milho DAS-40278-9 é equivalente ao milho convencional em todas suas características fenotípicas, genotípicas e bioquímicas, sendo as únicas diferenças relacionadas à resistência aos herbicidas conferida pela inserção e expressão do gene aad-1 no genoma.

Desta forma, sou favorável a aprovação do referido pedido de liberação comercial.

***Heidge Fukumasu, DVM, PhD***

*Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos*

*Universidade de São Paulo*