



**PARECER TÉCNICO CONSOLIDADO SETORIAIS HUM/ANI**



**Processo nº** 01200.001179/2013-51

**Requerente:** Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda.

**CQB:** 177/99

**Próton:** 10279/2013

**Assunto:** Liberação comercial do milho geneticamente modificado designado "Milho DAS-40278-9 x NK603", para efeito de sua liberação no meio ambiente, cultivo, produção, manipulação, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo da liberação e descarte do Organismo Geneticamente Modificado e seus derivados para fins comerciais.

**Extrato Prévio:** 3596/13 publicado em 14 de maio de 2013.

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

**Decisão:** ( X ) DEFERIDO por unanimidade na setorial de 04 de fevereiro de 2015

( ) 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 PIRAMIDADO POR GENÉTICA CLÁSSICA  
DAS-40278-9 x NK603**

**SOLICITAÇÃO**

A empresa Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda solicita liberação comercial do milho DAS-40278-9 x NK603 desenvolvido por melhoramento genético clássico.

O milho DAS-40278-9 x NK603 é um produto transgênico com tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), a determinados herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase) e ariloxifenoxipropionato (AOPP), denominados herbicidas "fop" e ao herbicida glifosato. Esta peculiaridade da tolerância a herbicidas oferecerá aos produtores uma maior flexibilidade ao selecionar herbicidas para melhorar o controle de várias plantas daninhas, e permitirá o uso de um herbicida fop (como o haloxifope-R) para o controle de gramíneas.

Estudos em campo conduzidos com autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) demonstraram a eficácia e praticabilidade agrônômica do uso do milho DAS-40278-9 x NK603 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 dos genes *aad-1* e *cp4 epsps*, os quais conferem resistência aos herbicidas citados.

O cultivo do milho DAS-40278-9 x NK603 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. As proteínas codificadas pelos genes *aad-1* e *cp4 epsps* não apresentam similaridade com proteínas consideradas alergênicas ou tóxicas. O milho DAS-40278-9 x NK603, à semelhança do milho convencional, não exibe tendência à proliferar-se como planta daninha e não é invasivo em ecossistemas naturais. Nenhuma vantagem competitiva para a sobrevivência ou dispersão do milho foi proporcionada pelos genes *aad-1* e *cp4 epsps*, introduzidos no milho DAS-40278-9 x NK603, quando comparado ao milho convencional.

Relatoria: Dr. Maria Lúcia Zaidan Dagli      Assessoria: Allan Edver  
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:** 37269, 15



Este milho piramidado sobre o qual versa a solicitação já está aprovado para cultivo no Canadá (2013 – autorização de cultivo), no Japão em 2013 (consumo humano e animal), México e Taiwan (ambos em 2013 e ambos autorizados para consumo humano ([www.isaaa.org](http://www.isaaa.org))).

Os documentos apresentados nesta solicitação incluem um sumário executivo contendo: Descrição da variedade piramidada, análise molecular comparativa com as linhagens GM separadas, padrão de herança genética de cada evento e do evento piramidado com tabela de frequências dos genótipos herdados, avaliações agrônomicas e eficácia do novo OGM, estudo comparativo da expressão dos genes inseridos no novo OGM. Também está incluído na solicitação o plano de monitoramento proposto.

#### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA :

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  $\alpha$ -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 micro-organismo *Sphingobium herbicidovorans*, uma bactéria gram-negativa comumente isolada do solo e que foi previamente agrupada no gênero *Sphingomonas*. As espécies de *Sphingobium* estão amplamente distribuídas na natureza sendo isoladas de *habitats* tanto terrestres como aquáticos. Devido à capacidade biodegradativa e biossintética, as *Sphingomonas* têm sido bastante utilizadas em aplicações biotecnológicas, incluindo a biorremediação de contaminantes ambientais e a produção de polímeros extracelulares, tais como *Sphinganas*, as quais são extensivamente usadas na indústria de alimentos. A bactéria *Sphingobium herbicidovorans*, formalmente denominada *Sphingomonas herbicidovorans*, é uma bactéria de solo que contém genes que codificam enzimas capazes de facilitar a decomposição dos herbicidas 2,4-D e AOPP, permitindo à 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 assepticamente 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.

O milho NK603 já foi aprovado para uso comercial pela CTNBio em 2008 e já foi utilizado em mais de 20 LPMAs no Brasil, desde o ano 2000.

#### Toxicidade do milho DAS-40278-9 x NK603

A equivalência substancial do milho DAS-40278-9 x NK603 comparativamente ao milho convencional, e a rápida desnaturação e degradação das proteínas AAD-1 e CP4 EPSPS, durante o processamento garantem a segurança do consumo do milho geneticamente modificado e dos produtos dele derivados. Análises de composição nutricional do milho DAS-40278-9 x NK603 em comparação com o milho convencional mostram semelhanças entre os dois produtos com relação ao teor de proteínas, fibras, carboidratos, óleos, cinzas, minerais, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, metabólitos e antinutrientes. Essa similaridade confirma dados publicados em literatura técnico-científica sobre o milho DAS-40278-9 x NK603, de que a presença dos genes *aad-1* e *cp4 epsps*, que conferem tolerância aos herbicidas 2,4-D, haloxifópe-R e glifosato, respectivamente, não causam alterações na composição nutricional do OGM, além daquelas que podem ser causadas por fatores bióticos e abióticos na lavoura.

Os níveis de componentes bioativos quando quantificados nas amostras de milho DAS-40278-9 x NK603 foram estatisticamente semelhantes aos do milho convencional, com variação observada dentro de intervalos padrões relatados em literatura.



Nenhuma homologia significativa foi observada entre as proteínas AAD-1 e CP4 EPSPS com relação às proteínas conhecidas como alergênicas ou tóxicas. Não foi detectada similaridades entre as proteínas AAD-1 e CP4 EPSPS e as proteínas alergênicas conhecidas.

A modificação genética do milho DAS-40278-9 x NK603 não altera as condições de processamento utilizadas para o milho comum, as quais são amplamente conhecidas, adquiridas ao longo do tempo.

Com base nestes resultados a empresa DOW AgroSciences demonstrou que o milho DAS-40278-9 x NK603 não expressa qualquer proteína tóxica ou alergênica conhecida, de forma que o consumo de milho DAS-40278-9 x NK603 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 animal pela ingestão deste OGM e seus derivados.

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 por gavagem, sendo que 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 foram observados efeitos patológicos relacionados ao tratamento e não houve alteração quanto ao ganho de peso entre animais que receberam e os que não receberam tais proteínas.

O estudo permitiu concluir que a  $DL_{50}$  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).

A exposição alimentar da proteína AAD-1 em dietas de animais foi desenvolvida através da combinação das informações de expressão da proteína AAD-1 contendo o evento DAS-40278-9 nas plantas de milho em estudo de campo, com um cálculo da dieta de consumo de milho e forragem de milho pelos animais (frango de corte, galinhas poedeiras, laticínios e na carne bovina de consumo humano). Nenhuma alteração nos animais foi encontrada nestes experimentos.

A empresa apresenta ainda um estudo de resíduos de 2,4-D, glifosato e AMPA em amostras de milho OGM tratadas com este herbicida em 4 localidades no Brasil. As técnicas utilizadas foram todas em BPL e todos os resultados não apresentaram nenhum resíduo de herbicidas (ND, Não Detectado) nas amostras do controle convencional e nas amostras tratadas dos ensaios conduzidos nas 4 localidades.

A composição do alimento é um importante componente para a inferência da biossegurança de alterações genéticas decorrentes de programas de melhoramento genético ou de modificações introduzidas por meio de transformação genética, e para atender à legislação exige estudos de equivalência composicional para comprovar a segurança alimentar de um cultivar geneticamente modificado, como o milho DAS-40278-9 x NK603.

A empresa apresenta os estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos que demonstram que o milho DAS-40278-9 x NK603 não difere do milho convencional na composição nutricional, bem como em características agrônomicas, morfológicas e reprodutivas com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e a herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (haloxifope-R, quizalofope, etc.), pela presença e expressão dos genes *aad-1* e *cp4 epsps*.

Pode-se concluir que a composição do grão do milho DAS-40278-9 x NK603 é similar à composição de nutrientes do milho convencional, portanto não se antevendo efeito adverso à saúde humana e animal com o consumo do novo produto.

#### **Alergenicidade do milho DAS-40278-9 x NK603**

A proteína AAD-1 não tem semelhança significativa com sequências de aminoácidos de toxinas conhecidas. A sequência de aminoácidos da proteína AAD-1 foi avaliada usando uma pesquisa de similaridade através da ferramenta BLASTp contra o banco de dados GenBank de proteínas não redundantes. Nenhuma das proteínas semelhantes identificadas na pesquisa apresenta histórico de risco à biossegurança.

Um estudo de toxicidade oral aguda com a proteína AAD-1 foi realizada em ratos ministrando um nível de 2.000 mg da proteína AAD-1 por kg após o ajuste de pureza. Todos os animais sobreviveram, e nenhum efeito adverso 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 DL<sub>50</sub> 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.

Os níveis dos antinutrientes ácido fítico, rafinose e inibidor de tripsina e dos metabólitos secundários inositol, furfural, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, quantificados nas amostras de milho DAS-40278-9 x NK603 foram estatisticamente semelhantes ao milho controle convencional e os valores obtidos estiveram dentro de intervalos padrões relatados em literatura para o milho convencional.

Portanto o milho DAS-40278-9 x NK603 não produz toxinas ou metabólitos que possam causar efeito ao consumidor humano ou animal, comportando-se como o milho convencional com relação a essas características. O consumo de milho DAS-40278-9 x NK603 e/ou de seus produtos é tão seguro quanto o consumo do milho convencional e/ou seus produtos, com relação às características de segurança alimentar.

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), haloxifope-R e quizalofope, permitindo à bactéria usá-los como fonte de carbono.

*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 sua capacidade biodegradativa e Biosintética, 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 alimentos.

Entre aproximadamente 20 espécies reconhecidas de *Sphingobium*, apenas uma, a *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 à infecção. Há relatos que *Sphingomonas glycolipids* podem produzir antigênicos que podem ter uso terapêutico (Kinjo *et al.*, 2008). Outras *Sphingomonas* relacionadas são conhecidas por produzir *sphingans* (um polissacarídeo extracelular do tipo gelatina), que pode ser utilizado em alimentos como agentes gelificantes, estabilizantes ou agentes de suspensão (van Kranenburg *et al.*, 1999).

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. Nenhuma das proteínas semelhantes identificadas na pesquisa apresenta qualquer ocorrência relatada de risco à biossegurança.

Os resultados demonstraram, ainda, que a proteína AAD-1 é facilmente digerida e não detectável em 30 segundos no suco gástrico simulado. Em todas as condições de aquecimento, foi eliminado acima de 97% da atividade enzimática da proteína, demonstrando que a proteína AAD-1 é termo-lábil. Pode-se concluir desses estudos que é improvável que a proteína AAD-1 possa causar reações alérgicas ou tóxicas em humanos ou em animais.

#### PARECER

Os dados apresentados permitem concluir que:

- 1-Os insertos tiveram sua integridade mantida durante o processo de melhoramento genético clássico.
- 2-O padrão de herança genética demonstrou que os dois eventos são independentes e segregam estavelmente ao longo de sucessivas gerações..
- 3-As avaliações agrônômicas indicaram que não houve expressão de nenhuma nova característica além das esperadas.

Relatoria: Dr. Maria Lúcia Zaidan Dagli      Assessoria: Allan Edver  
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: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_



**Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**  
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio  
Secretaria Executiva



4-O perfil de expressão das proteínas recombinantes não é diferente da expressão obtida nos milhos contendo os eventos separadamente.

5-Todos os testes que envolvam a segurança animal e alimentar do milho **DAS-40278-9 x NK603** demonstram que não há nenhuma evidência toxicológica ou alergênica.

\*Cabe portanto avaliar neste parecer alterações na segurança alimentar devidas a piramidação dos eventos já que separadamente eles foram considerados seguros.

Durante as avaliações para liberação comercial do milho DAS-40278-9 x NK603 a segurança alimentar para consumo humano e animal foi exaustivamente verificada através dos dados brutos de testes de toxicidade, alergenicidade, digestibilidade e composição centesimal das novas variedades tanto *in vitro* quanto *in vivo* conforme descrito na Fundamentação teórica, donde se pode concluir que os eventos não apresentavam perigos maiores do que as variedades parentais.

Tendo em vista que o melhoramento genético clássico não interferiu com a integridade das inserções, que o padrão de segregação das características foi independente e estável, que os fenótipos da planta não apresentam novas características é de se supor que nenhum feito sinérgico das duas características ocorre na linhagem piramidada.

Além disso, as proteínas de cada evento quando quantificadas por Elisa nos diferentes tecidos da planta em vários estágios de desenvolvimento da mesma não apresentaram diferenças em relação a expressão pelas linhagens contendo um único evento.

Estes dados indicam que nenhum efeito sinérgico ocorre na linhagem piramidada, o que era de se esperar tendo em vista que as duas proteínas inseridas atuam em vias metabólicas distintas.

Assim sendo sou de parecer *favorável ao deferimento* da solicitação da Dow AgroSciences.

**Data:** 30/10/2014



DRA. MARIA LÚCIA ZAIDAN DAGLI  
Membro da CTNBio

De acordo,

DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI  
Presidente da CTNBio

**Assessor Técnico da CTNBio: ALLAN EDVER MELLO DO SANTOS**

Relatoria: Dr. Maria Lúcia Zaidan Dagli      Assessoria: Allan Edver  
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: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

