

PARECER TÉCNICO N°

Processo n°: 01200.002109/2000-04

Requerente: Syngenta Seeds Ltda.

CNPJ: 49.156.326/0025-79

Endereço: BR 452, Km 142,5, Caixa Postal: 585, Zona Rural, CEP: 38406-270, Uberlândia – MG.

Assunto: Solicitação de Parecer para Liberação Comercial

Extrato Prévio: Comunicado 115/2000 Publicado no D.O.U. de 31 de julho de 2000

Reunião: (deixar em branco)

Decisão: Deferido

A Subcomissão de Biossegurança na Saúde Humana e Animal da CTNBIO, após apreciação do processo em questão, conclui pelo DEFERIMENTO, nos termos deste Parecer Técnico.

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

Solicitação

A instituição solicitou da CTNBio o parecer técnico referente à liberação comercial de todo e qualquer germoplasma de Milho Bt 11 (*Zea mays*). O Milho Bt 11 expressa o gene *cryIA(b)*, derivado da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, linhagem HD-1, que confere ao mesmo, resistência a alguns insetos da Ordem Lepidóptera. A solicitação engloba cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação no meio ambiente e descarte do milho acima citado. A interessada enviou para a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, informações referentes ao organismo parental, caracterização molecular, estabilidade genética dos materiais, interação do milho geneticamente modificado com o meio ambiente, segurança alimentar do milho Bt 11, manejo da resistência de insetos, eficiência do material geneticamente modificado no controle de insetos pragas e efeitos sobre inimigos naturais.

O milho a que se refere esta solicitação foi geneticamente modificado pela inserção do plasmídeo pZ01502 contendo a fusão do gene *cryIA(BtK)* com o gene pat. O gene de resistência à ampicilina do plasmídeo foi retirado previamente ao evento de transformação. O pólen das plantas transformadas foi utilizado para polinizar plantas femininas de uma linhagem endogâmica.

As linhagens transgênicas para as quais se solicita liberação foram então obtidas por retrocruzamento com híbridos comerciais.

PARECER TÉCNICO

Este parecer técnico foi elaborado a partir da consolidação de 6 pareceres previamente aprovados na subcomissão, sendo 4 pareceres ad hoc de pesquisadores com tradição na área de nutrição, equivalência nutricional e toxicologia e 2 pareceres de membros desta subcomissão. Foram também consultados e analisados os documentos protocolados na CTNBIO por ocasião da audiência pública realizada em Brasília no dia 20 de março de 2007.

1) Fundamentação técnica

1- Taxonomia, morfologia, reprodução e características do milho cultivado:

Zea mays Linnaeus, também conhecido como milho é uma gramínea monoécia anual, cultivada em vários países e usada como ração animal, silagem, grão para alimento humano, óleo vegetal, xarope e diversos outros usos. *Zea* é um gênero da família das Gramíneas (Poaceae). O gênero consiste de quatro espécies: *Zea mays*,

milho cultivado e teosinte; *Zea diploperennis*, teosinte diploperenial; *Zea luxurians*; e *Zea perennis*, teosinte perene. O mais próximo parente genérico de *Zea* é o *Tripsacum*, um gênero de sete espécies, três das quais ocorrem nos Estados Unidos. *Tripsacum* difere do milho em vários aspectos, incluindo o número de cromossomos ($n=9$), ao contrário de *Zea* ($n=10$). Todas as espécies de *Tripsacum* podem cruzar com *Zea*, mas somente com dificuldade e somente com extrema esterilidade.

O milho cultivado foi transformado a partir do teosinte, *Zea mays*, subespécies mexicana, há mais de 8.000 anos atrás. Durante esta transformação, o milho cultivado ganhou várias características agrônômicas, mas perdeu a habilidade de sobreviver fora do meio agrícola. O teosinte, entretanto, permanece como gramínea selvagem no México e na Guatemala. Apesar de algumas confusões sobre agrupamento taxonômico de membros não-cultivados de *Zea*, os membros selvagens mantêm um arranjo de plantas bem sucedidas tanto anuais como perenes com peculiaridades cromossômicas e níveis de ploidia, e muitos fenótipos adaptativos macroscópicos. O milho cultivado e membros selvagens de *Zea* diplóide e tetraploide podem cruzar para produzir híbridos F1 férteis. Entretanto, a hibridização introgressiva não ocorre no meio selvagem, devido as diferenças de tempo de florescimento, separação geográfica, bloqueio hereditário, de desenvolvimento, morfológico e de tempo de estruturas reprodutivas, disseminação e dormência.

A segunda maior transformação do milho cultivado ocorreu no século 20 a partir de 1930. Esta transformação ocorreu através de linhagens isogênicas para produção de sementes híbridas e por outros métodos. Praticamente, todo milho cultivado atualmente é proveniente de sementes híbridas que é comprada anualmente de empresas produtoras de sementes; as variedades antigas de polinização aberta são praticamente irrelevantes para o comércio. Esta transformação resultou em plantas comerciais mais uniformes com características agrônômicas superiores, e contribuiu para um incremento em até seis vezes o rendimento por área plantada nos últimos seis anos.

A autopolinização e fertilização e a polinização cruzada e fertilização são normalmente possíveis e as frequências de cada uma são normalmente determinadas pela proximidade física e outras influências físicas sobre a transferência do pólen. Um grande número de variáveis complexas, tais como esterilidade genética e taxas diferenciadas de crescimento dos tubos de pólen podem também influenciar as frequências de auto-fertilização versus fertilização cruzada. O pólen do milho permanece viável por 10 a 30 minutos, podendo, entretanto permanecer viável por muito mais tempo em condições de refrigeração. A genética do milho é uma das mais bem conhecidas. Estudos de polinização de milho têm sido realizados na maioria considerando as necessidades de produção de sementes híbridas. Esta produção envolve o desenvolvimento e manutenção de linhas isogênicas e o subsequente cruzamento para produção da semente comercial. No primeiro caso, a autopolinização é obrigatória. No passo seguinte, a polinização cruzada é obrigatória. Mecanismos foram desenvolvidos para garantir cada tipo de polinização. As sementes destinadas ao plantio são derivadas de sementes auto-polinizadas numa geração de F8 a F10. A produção de sementes básicas exige um isolamento mínimo de distância de modo a evitar contaminação. Outras medidas de segurança tais como bordaduras e barreiras físicas, além de ser evitado o plantio em campos anteriormente plantados com milho, também, são exigidas para diminuir o risco de contaminação. A produção de sementes de híbrido também requer isolamento e medidas semelhantes às adotadas para produção de sementes básicas.

O milho aparece como planta voluntária em alguns campos e na estrada, mas nunca foi capaz de se estabelecer sem os cuidados do cultivo. Algumas outras espécies de *Zea* têm sido identificadas como plantas selvagens, mas não possuem tendência a se transformarem em praga.

2- Caracterização do problema

No Brasil, os danos causados pelos insetos-praga na cultura do milho são de, aproximadamente, 19% e os prejuízos anuais chegam a dois bilhões de reais (WAQUIL e VILELLA, 2004). Entre as principais espécies de insetos que causam danos à cultura do milho, destacam-se os lepidópteros: a lagarta-elasmolepido (*Elasmopalpus lignosellus*), a lagarta-do-cartucho, (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*), a lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) e a broca-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). Para o manejo dessas principais espécies-praga, têm sido utilizados o tratamento de sementes e as aplicações de inseticidas, via pulverização ou quimigação, a um custo anual de cerca de 23 milhões de dólares.

A expansão da área cultivada com o plantio direto no país trouxe inúmeros benefícios para o sistema de produção e para o ambiente, inclusive para o controle de plantas daninhas, mas inviabilizou o seu controle mecânico. Assim, o controle de plantas daninhas ficou altamente dependente do controle químico.

As variedades de milho transgênico tolerantes a herbicidas e a insetos-praga constituem ferramenta potente para o manejo de plantas daninhas e insetos-praga na cultura do milho, podendo ser inseridas nos diferentes sistemas de produção, reduzindo os prejuízos ocasionados pelos insetos-praga e pelas plantas daninhas. Como tem acontecido em outras partes do mundo, a inserção de cultivares de milho transgênico tolerantes a herbicidas ou resistentes a insetos na agricultura brasileira, pode trazer benefícios econômicos e ambientais. Isso ocorre devido à redução de perdas, de custos com manejo e da quantidade de inseticidas utilizados nas lavouras, o que permite melhor equilíbrio biológico no agroecossistema.

3- O milho Bt

O Milho Bt 11 expressa o gene *cryIA(b)*, derivado da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, linhagem HD-1, que confere ao mesmo, resistência a alguns insetos da Ordem Lepidóptera. O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria do solo formadora de endósporo, caracterizado pela presença de cristais protéicos (proteínas *Cry*) dentro do citoplasma das células esporuladas. As diferentes variedades de *B. thuringiensis* possuem diferentes combinações de proteínas *Cry* (também chamadas de toxinas Bt) e cada uma dessas toxinas possuem toxicidade específica para determinados grupos de artrópodes. Elas se ligam a parede intestinal do inseto levando a um processo de lise que conduz à morte do inseto. Inseticidas microbianos têm sido usados desde 1950 em formulações aplicadas às culturas, sobretudo na agricultura orgânica.

O milho Bt foi geneticamente modificado pela inserção do plasmídeo pZ01502 contendo a fusão do gene *cryIA(BtK)* com o gene *pat* (que confere resistência ao glufosinato). O gene de resistência à ampicilina do plasmídeo foi retirado previamente ao evento de transformação. O pólen das plantas transformadas foi utilizado para polinizar plantas femininas de uma linhagem endogâmica.

A determinação clássica da herança e estabilidade fenotípica e genética mostrou que o gene *cryIA(BtK)* é herdado como um locus dominante simples e que somente uma cópia do gene foi inserida na planta.

As expressões dos transgenes na planta foram definidas por ensaios imunológicos que mostraram níveis altos do gene *cryIA* nas folhas e outros tecidos, sendo baixos no grão. Já o gene *pat* não foi detectado em nenhum tecido a não ser nos órgãos sexuais.

Estudos de campo mostraram que o milho Bt11 apresentou resistência ao ataque de várias pragas do tipo lepidóptera como a lagarta do cartucho e outras não alterando por outro lado o número de outros predadores e insetos colonizados como percevejos e tesourinhas que estiveram presentes no mesmo nível em milho Bt11 assim como nos não transgênicos. O milho Bt11 também não mostrou ação sobre insetos não alvo sendo eles terrestres ou aquáticos (abelhas, joaninhas, hymenópteros etc).

4- Redução de micotoxinas em milho Bt:

Um tema pouco discutido, mas que tem grande impacto positivo sobre a saúde humana e animal, além dos aspectos econômicas, é a possibilidade de se ter o melhoramento de características qualitativas por conta da introdução da toxina *Cry* no milho. Estudos recentes têm identificado que as variedades de milho Bt possuem menor concentração de micotoxinas.

As micotoxinas encontradas mais frequentemente no milho são a fumonisina e a aflatoxina. Essas toxinas são produzidas respectivamente por fungos do gênero *Fusarium* e do gênero *Aspergillus*. As micotoxinas são substâncias altamente tóxicas tanto para humanos como para animais levando ao câncer hepático, doenças pulmonares, hemorragias e a morte. Em aves o consumo de ração contaminada com aflatoxina leva a redução da postura e a produção de ovos com baixa qualidade e aumento de suscetibilidade a doenças. Estudos têm identificado que o milho Bt possui bem menos concentração de micotoxinas do que o milho convencional. O milho Bt reduz os níveis de fumonisina em até 95% e o de aflatoxina em até 50%.

5- Medidas de Segurança:

BASES DA AVALIAÇÃO DA BIOSSEGURANÇA DO USO DE ALIMENTOS DERIVADOS DE OGM
PARA A SAÚDE HUMANA E ANIMAL

A avaliação de segurança de alimentos derivados de matérias-primas geneticamente modificadas é baseada na análise de risco, metodologia científica que compreende as etapas de avaliação, gerenciamento e comunicação de risco. Na etapa de avaliação de risco é buscada a caracterização qualitativa e quantitativa dos potenciais efeitos adversos, tendo como balizador o conceito da equivalência substancial, para identificação de eventuais diferenças entre o novo alimento e o seu correspondente convencional.

Para avaliar a segurança de uma matéria-prima alimentar geneticamente modificada, ou sua equivalência ao alimento convencional é recomendável que quatro elementos principais sejam analisados mais notadamente: (1) a variedade parental, ou seja, a planta que deu origem à nova matéria-prima geneticamente modificada; (2) o processo de transformação, incluindo a caracterização da construção utilizada e do evento resultante; (3) o produto do gene inserido e potencial toxicidade e alergenicidade e, finalmente; (4) a composição da nova variedade resultante da transformação genética. O conjunto de dados dessas análises devem permitir a identificação e caracterização dos potenciais efeitos adversos associados com o consumo da nova matéria-prima, subsidiando as etapas de gerenciamento e comunicação de risco.

2) Avaliação de Segurança do Milho Bt11 para alimentação humana e animal

1. Caracterização da variedade parental

De acordo com a requerente, o evento Bt11 deriva da transformação de milho comum *Zea mays*, espécie caracterizada em profundidade e sobre a qual existe sólido histórico de segurança para consumo humano. São relatadas informações sobre a identidade, origem e composição química, tendo sido anexada ao processo cópia de publicação que fornece abundância de dados relativos à sua composição, com destaque para as variações naturalmente observadas na presença de nutrientes (“Corn Chemistry and Technology”, de S.A. Watson e P.A. Ramstad).

2. Caracterização do transgene e do processo de transformação

O milho **Bt** foi geneticamente modificado pela inserção do plasmídeo pZ01502 contendo a fusão do gene *cryIA*(BtK) com o gene *pat*(que confere resistência ao glufosinato). O gene de resistência à ampicilina do plasmídeo foi retirado previamente ao evento de transformação. A determinação de que o gene *ampR* não está presente no milho protegido contra insetos é baseada na análise Southern blot e por testes de PCR com primers específicos para o gene *ampR* realizadas. O pólen das plantas transformadas foi utilizado para polinizar plantas femininas de uma linhagem endogâmica.

3. Caracterização dos produtos de expressão

O milho Bt11 produz a proteína inseticida, Cry1Ab, derivada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) cepa HD-1. Delta-endotoxinas, como a proteína Cry1Ab expressa neste produto, agem pela acoplamento seletivo a sítios específicos localizados na borda ciliar do epitélio do intestino médio de espécies alvo de insetos. Posteriormente ao acoplamento, são formados poros específicos a cátions que destroem o fluxo de íons do intestino médio e, portanto, causam paralisia e morte de insetos alvos. Cry1Ab é inseticida apenas a insetos lepidópteros, e sua especificidade de ação é atribuída diretamente à presença de sítios específicos de acoplamento nos insetos alvo, como comentado. Não há sítios de acoplamento para delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* na superfície das células do intestino de mamíferos e, portanto, animais domésticos e o homem não são suscetíveis a essas proteínas.

O milho Bt11 também foi modificado geneticamente para expressar o gene *pat* clonado do actinomiceto aeróbico comum do solo, *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, que codifica a enzima fosfotransferase (PAT). A enzima PAT foi usada como um marcador para seleção, permitindo a identificação da planta transformada, bem como tornando-a resistente ao herbicida de fosfotransferase (também conhecido como glufosinato de amônio - ingrediente ativo dos herbicidas Basta, Rely, Finale, e Liberty). O glufosinato de

amônio age pela inibição da enzima vegetal glutamina sintetase, a única enzima vegetal que destoxifica amônia pela incorporação à glutamina. A inibição dessa enzima leva a uma acumulação de amônia nos tecidos da planta, que destroem os mesmos após a aplicação. A PAT catalisa a acetilação do herbicida de fosfotricina e, portanto, destoxifica o glufosinato de amônio a um composto inativo. O milho Bt11 confere proteção contra lepidópteros-pragas e permite aos produtores usar herbicidas que contêm fosfotricina para o controle de ervas daninhas no cultivo do milho.

A determinação dos níveis da proteína Btk no tecido de milho foi obtida por ensaio imunológico, o qual determinou os níveis da proteína Btk na folha, palha, colmo, grão de quatro híbridos de milho Bt11. Os níveis mais altos são encontrados nas folhas, variando de 27 a 33 µg de proteína Btk/g de peso fresco. Na palha o nível variou de 3.9 a 5.6 µg, colmo de 2.2 a 3.0 µg, e grãos de 4.2 a 5.0 µg/g de peso fresco. Estudos indicam que os genes Btk e pat são estritamente ligados e herdados de maneira estável como um único locus nas linhagens de milho Bt11.

A) Toxicidade da proteína Btk

O estado da arte na avaliação da toxicidade preconiza o uso de ensaios de experimentação animal, como forma científica da caracterização qualitativa e quantitativa do potencial de efeitos adversos à saúde humana causada pela exposição a toxicantes ambientais ou presentes em alimentos. Desta forma, sempre que viável, realizam-se os ensaios toxicológicos de xenobióticos em animais de experimentação, administrando-os pelas vias de exposição que permitam a extrapolação dos resultados observados em animais para humanos. Esta extrapolação nos permite estabelecer a IDA ou Dose de Referência, cujo conceito é o de que um indivíduo poderá se expor a dose desta substância todos os dias por toda a vida sem que se observem efeitos nocivos decorrentes dessa exposição.

Dessa forma, o estudo da proteína Btk do milho Bt11 foi conduzido por via oral aguda em ratos, bem como ensaios de digestibilidade. No ensaio de digestão simulada observou-se que a meia vida da proteína é inferior a 30 segundos no sistema gástrico e que no sistema intestinal a proteína de cadeia completa é convertida no fragmento central resistente à tripsina. O estudo da toxicidade por via oral aguda foi conduzido em ratos, não se observando efeitos nocivos em nenhuma das doses avaliadas sendo que a maior dose testada, de 4000mg/kg de peso corpóreo, foi a considerada a NOEL do ensaio, ou seja, a maior dose na qual não se observam efeitos nocivos, estimando-se dessa forma a DL₅₀ como sendo superior aos 4000mg/kg de peso corpóreo. Tabelas de classificação toxicológica consideram como de baixa toxicidade doses superiores a 2000mg/kg de peso corpóreo. Pode-se concluir que a ausência de efeitos neste ensaio estava relacionada com o baixo potencial de absorção da proteína demonstrado no estudo de digestibilidade in vitro, onde observou-se sua rápida degradação no fluido gástrico de mamíferos, com menos de 4% de atividade após 2 minutos. Este ensaio demonstrou a estabilidade da proteína por 19h no fluido intestinal. Não se justificaria avaliar a toxicidade desta proteína por via inalatória ou dérmica, pois ela apresenta alto peso molecular, não sendo volátil.

Estudo de toxicidade em ratos alimentados com a proteína em questão durante 14 dias não apresentou evidência de toxicidade.

Estudo de resistência a antibióticos não demonstraram que o milho Bt11 contenha o gene que permita a expressão deste efeito. As evidências apresentadas pela empresa para o milho Bt11 também não demonstram que este possa produzir um efeito alergênico.

B) Alergenicidade do milho BT11

A proteína *cryIA* (BtK) tem sido utilizada a três décadas como ingrediente ativo dos inseticidas microbianos usados em ampla variedade de culturas incluindo produtos de consumo fresco como alface e tomate. Nestes casos não existem relatos de reações alérgicas à exposição oral, dermal ou por inalação tendo em vista que a proteína *cryIA* é de alto peso molecular não sendo volátil nem tendo capacidade de ser absorvida pela pele. Portanto não existem evidências que esta proteína possa ser tóxica ou causar alergia no homem e em animais não alvo.

Estudos sobre o destino da proteína *cryIA* (BtK) em testes de campo mostram que a proteína é rapidamente degradada no solo. No solo menos de 2% da proteína é recuperada e sem atividade após um dia de

incubação. Por outro lado no trato gastrointestinal de homens e animais a proteína é degradada em cerca de 30 segundos.

O potencial para as novas proteínas Cry1Ab e PAT serem alergênicas foi investigada usando-se vários critérios, incluindo homologia da seqüência de aminoácidos com alergênicos conhecidos, história de uso e propriedades físico-químicas comuns de alergênicos, incluindo a sensibilidade à digestão por enzimas digestivas.

As seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas introduzidas foram comparadas com inúmeros alergênicos conhecidos nos bancos de dados de domínio público (Genpept, Swissprot, PIR protein) e nenhuma homologia foi detectada. Ao contrário de alergênicos protéicos conhecidos, os estudos demonstraram que as proteínas Cry1Ab eram rapidamente inativadas quando sujeitas a fluidos gástricos simulados de mamíferos. Similarmente, verificou-se que a proteína PAT era rapidamente digerida em condições que imitam a digestão humana. Do mesmo modo, verificou-se que PAT se está presente em grãos de milho, o faz em níveis muito baixos

Tendo em vista o acima exposto o parecer da subcomissão é:

Parecer

Há extensa documentação no Processo demonstrando a inocuidade do Milho Bt 11 para o ser humano, para animais e para o meio ambiente. Assim, cabe destacar as seguintes informações:

- Apesar de décadas de uso generalizado das proteínas BtK, não existem relatos de reações alérgicas imediatas ou tardias à proteína Btk através de exposição oral, dermal ou por inoculação do produto.
- A proteína PAT não compartilha de seqüência homóloga significativa com quaisquer toxinas protéicas conhecidas, enterotoxinas bacterianas, alergênicos ou venenos; nenhum relato foi encontrado sobre toxidez ou capacidade alergênica associada com acetil-transferase como classe e o organismo doador, *S. viridochromogenes*, não tem potencial patogênico.
- A proteína Cry1A(b) presente no milho não apresenta riscos para seres humanos, animais de produção ou de vida selvagem, insetos benéficos ou para o meio ambiente e tem rápida degradação residual. Esta proteína é uma delta-endotoxina que apresenta atividade específica sobre o sistema digestivo de algumas famílias de insetos. Mais especificamente, sob a ação de proteases presentes no estômago de insetos e no pH estomacal desses insetos transforma-se na forma ativada (núcleo tripsina resistente) que se liga a receptores específicos de alta afinidade presentes em insetos e ausentes em mamíferos.
- A proteína PAT é degradada em meio de cultura semelhante ao suco gástrico, perdendo suas características físico-químicas após exposição oral; desse modo, não é de se esperar que essa proteína seja absorvida na forma íntegra, portanto sendo improvável que produza efeitos adversos ou tóxicos.
- Estudos realizados no Brasil demonstraram ausência de diferenças entre os resíduos de glufosinato de amônio encontrados na variedade parental em relação à variedade transgênica (evento T25) quando o herbicida é aplicado conforme padrões da legislação brasileira para a avaliação dos Limites Máximos de Resíduos.
- Estudos de equivalência de composição centesimal do milho Bt realizados nas linhagens desenvolvidas no Brasil demonstraram ausência de diferenças consideráveis entre a linhagem parental e a linhagem transgênica.
- Estudos de toxicidade oral para camundongos demonstraram que o nível sem efeito observado para o milho Bt é superior a 4000 mg/kg de peso corpóreo, tendo sido proposta uma DL₅₀ aguda para o mesmo superior a esse valor.

Por outro lado, uma consulta mais detalhada feita à bibliografia pertinente, mostra que ensaios de segurança sobre plantas e sementes geneticamente modificadas estão descritos e podem ser encontrados na literatura desde as primeiras publicações sobre essa transformação genética (Padgett *et al.*, *J. Nutr.* 126:717-27, 1996; Hammond *et al.*, *J. Nutr.* 126:717-27, 1996; Harrison *et al.*, *J. Nutr.* 126:728-40, 1996). Mais especificamente e quanto à toxicidade:

- Harrison e colaboradores (*J. Nutr.* 126:728-40,1996) mostraram, através de administração por gavagem de quantidades de molécula protéica superiores em até 1000 vezes àquelas encontradas em sementes modificadas, que o tratamento não causou quaisquer alterações fisiológicas nos animais testados.
- Brake e colaboradores (*Poult. Sci.* 82:551-9,2002) compararam os efeitos nutricionais do milho Bt com milho não modificado em frangos de corte; mostraram que a administração de milho geneticamente modificado durante 35 dias não interferiu com o ganho de peso ou com as características de digestibilidade das proteínas ingeridas pelos frangos. Esses resultados foram confirmados, entre outros, por Taylor e colaboradores (*Poult. Sci.* 84:1893-9,2005).
- Folmer e colaboradores (*J. Anim. Sci.* 80:1352-61,2002) compararam os efeitos nutricionais do milho Bt com milho não modificado em gado de corte; concluíram que a administração do milho Bt não modificou quaisquer parâmetros indicativos de eficiência alimentar ou de ganho de peso dos animais tratados em relação àqueles do grupo controle.
- Ipharraguerre e colaboradores (*J. Dairy Sci.* 86:1734-41, 2003) mostraram que a composição e a produção de leite de vacas alimentadas com forragens e grãos de milho provenientes de plantas geneticamente modificadas não difere daquela proveniente de vacas alimentadas com plantas e sementes convencionais. Trabalho de Donkin e colaboradores (*J. Dairy Sci.* 86:1780-88, 2003) confirma esses dados.
- Hyun e colaboradores mostraram que a administração de milho transgênico (evento nK603) não modifica a performance de suínos em relação àquela de animais tratados com milho convencional (*J. Anim. Sci.* 82: 571-580, 2004).
- Alexander e colaboradores (*J. Biotechnol.* 112:255-66, 2004) avaliaram, em ovelhas, a digestibilidade e o tempo de permanência no trato gastrointestinal dos animais do DNA recombinante proveniente de alimentação dos mesmos com canola tolerante ao glifosato. Mostraram que os genes presentes em rações permanecem íntegros por período relativamente curto, diminuindo a probabilidade de sua absorção pelo animal; mostraram, ainda, que os microorganismos intestinais são os responsáveis pela rápida degradação do DNA a pH 7,0.
- Sanden e colaboradores (*J. Fish Dis.* 28:317-30, 2005), fazendo um estudo de longa duração (8 meses) em salmões, relataram ausência de alterações no desenvolvimento corporal e nos tecidos do cécum pilórico e do intestino médio dos peixes.
- Hammond e colaboradores (*Food Chem. Toxicol.* 44:1092-9,2006) avaliaram a toxicidade sub-crônica (90 dias) do milho Guardiam em ratos; demonstraram que a adição do milho MON810 em níveis de 11% e 33% (11 a 33 g/kg de peso corporal/ dia) em dietas balanceadas não acarretou quaisquer alterações nos animais analisados em relação a outros que receberam linhagem não modificada de milho na ração.

Quanto a possíveis efeitos alergênicos:

- Okumuki e colaboradores (*Shokuhim Eiseigaku Zasshi* 43:68-73, 2002) mostraram que a degradação da proteína Cry1Ab após aquecimento é muito rápida e, considerando a digestibilidade da mesma em fluidos gástricos humanos, sugeriram que ela deva apresentar potencial alergênico nulo ou extremamente baixo.
- Batista e colaboradores (*J. Allergy Clin. Immunol.* 116:403-10,2005) testaram a alergenicidade de soja e milho geneticamente modificados em indivíduos sensibilizados, comparando-a com aquela produzida por sementes convencionais nos mesmos indivíduos. Mostraram que os produtos modificados são seguros quanto ao potencial alergênico.
- Nakajima e colaboradores (*Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47:90-95, 2007) confirmam os dados anteriores ao relatarem ausência de níveis significativos de IgE específicos contra Cry1Ab em soro de pacientes com alergia alimentar.

Finalmente, depreende-se a partir da leitura do Processo que o milho Bt já foi analisado por relevantes organismos internacionais de avaliação de segurança. De fato, lê-se à:

- Página 74 (item 13): Que a Agência de Avaliação de Drogas dos Estados Unidos (FDA/USA) concluiu, em 18 de janeiro de 1996, que o uso agrícola, não confinado, do milho Bt-11 e de suas progêneses não produz qualquer impacto significativo ao meio ambiente (*Federal Register*, vol. 61, pp 2789-2790).

- Página 626: Que o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e o Comitê Assessor sobre Novos Alimentos e Processos do Reino Unido declararam que o milho Bt pode ser considerado semelhante ao milho natural e que pode ser manejado como tal.
- Página 626. Que a Agência Norte Americana para Controle de Drogas (FDA/USA) assim como aquela ligada à Proteção Ambiental (EPA/USA) também afirmaram, após avaliação, que o milho Bt não representa risco para o ser humano, para os animais e para o meio ambiente. Especificamente, a EPA/USA assim se manifestou: “O teste de toxicidade oral aguda com a proteína PAT produzida em bactérias não mostrou nenhuma correlação da substância com mortes numa dose de 2.500 miligramas por quilograma (mg/kg)”, como acessado em 20 de Agosto de 2007. (www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1997/April/Day-11/p9373.htm).
- Página 626: Que conclusões idênticas às apresentadas nos itens anteriores foram feitas pelas autoridades de avaliação de segurança do Japão e da União Européia. Em especial, a Comissão Científica Sobre Plantas da União Européia assim se manifestou em seu Parecer de 1998: “A injeção de grãos de milho geneticamente modificado (evento Bt11) pode ser considerada tão segura quanto a injeção do grão de uma espécie não geneticamente modificada”.
- Mais recentemente, a *Divisão de Saúde e proteção do consumidor* da Comissão Européia assim se expressou: “A enzima PAT não deve apresentar problemas de segurança. Sua função enzimática é específica para um substrato que não está naturalmente presente em humanos chamado fosfoinotricina, além disto ela é degradada e inativada em fluido gástrico simulado contendo pepsina em pH 1-1.2. A proteína PAT (51% de pureza) foi testada para toxicidade aguda em camundongos sem mostrar nenhuma toxicidade numa dose de 5 g por Kg de peso”. Acessado em 20 de Agosto de 2007 em http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm7/out02_en.html.

A posição desses organismos internacionais de avaliação pode ser compreendida se considerarmos que: 1- a concentração de até 4000 mg/kg de milho geneticamente modificado foi incapaz de produzir efeitos tóxicos agudos em camundongos e, 2- na concentração de 11% e 33% na dieta (11g a 33g /Kg de peso corporal), o milho geneticamente modificado foi incapaz de produzir sinais de intoxicação em ratos alimentados por 90 dias.

Ora se o milho geneticamente modificado não produziu sinais de toxicidade aguda ou sub-crônica mesmo em concentrações muito acima daquelas esperadas em condições normais de ingestão por animais ou por seres humanos, como pretender determinar uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o mesmo a exemplo do que normalmente se faz para praguicidas químicos?

Lembra-se, neste momento, que a fórmula usada pelo *Codex alimentarius* da FAO/OMS para o cálculo da IDA (*Evaluation of certain veterinary drug residues in food*. Report of the 66th Meeting of the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2006, 9-12.) é a seguinte:

$$IDA = \frac{NOEL}{FS}$$

Onde:

- IDA= é a maior quantidade em mg/kg de uma substância química que pode ser ingerida por dia pelo ser humano, durante toda sua vida e que não lhe cause nenhum mal.
- NOEL = é a maior dose de uma substância química (mg/kg) que se usa não produz efeitos tóxicos na espécie animal mais sensível.
- FS = fator de segurança, geralmente igual a 100 (dois fatores de ordem 10: o primeiro considerando-se ser o ser humano 10 vezes mais sensível que a mais sensível espécie animal estudada e o segundo considerando a variabilidade individual dentro da espécie humana).

Nesse sentido, uma vez que a maior quantidade de milho geneticamente modificado usada nos ensaios de toxicidade (33g/kg/dia em ensaio sub-crônico no rato) não produziu efeitos tóxicos e, considerando-se ser

impossível administrar por dia quantidade maior que esta para esses animais, depreende-se ser impossível calcular o valor de NOEL. De fato, um rato ingere por dia 10g/100g de peso corporal de ração por dia conforme descrito por Harkness e Wagner (*Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. Roca Ed. 3ª Ed., 1993, pp 49), sendo impossível alimentá-lo com quantidade maior do produto sem desnutri-los por carência de outros componentes normais da ração. Assim, pode-se compreender o porque da inexistência de valores de IDA para o milho geneticamente modificado.

Por outro lado, da análise dos resíduos (proteínas) eventualmente presentes nos alimentos provenientes de milho Bt 11 a serem fornecidos aos animais e ao ser humano depreende-se que nenhum deles tem potencial cancerígeno, teratogênico ou genotóxico. De fato, essas proteínas não guardam qualquer semelhança estrutural com carcinógenos primários ou secundários e não tem condições de ligar-se ao DNA humano como se depreende em Casarett & Doull (*Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Mcmillan Publishing Co., Inc., 1975, pp 313-78). Finalmente, a ausência de efeitos agudos ou sub-crônicos produzidos pelo milho geneticamente modificado descarta, também, qualquer possibilidade de neurotoxicidade tardia. Esse efeito tóxico, na verdade, é exclusivo dos praguicidas organofosforados e não guarda qualquer relação com possíveis resíduos do milho Bt 11.

Nesse contexto, é relevante lembrar que não foram apontados efeitos alergênicos para proteínas provenientes de plantas e/ou sementes geneticamente modificadas e que essas conforme relatado acima são degradadas pela cocção, pelos sucos gástricos e por bactérias presentes no trato gastrintestinal.

Conclusão.

Por tudo quanto exposto não devem ser esperados efeitos adversos, tóxicos e nutricionais em animais e humanos alimentados com o milho Bt 11 da Empresa Sygenta Seeds Ltda objeto do Processo acima referido.

Desta forma o milho Bt11 pode portanto representar mais uma alternativa na ampliação da cultura de milho sem a conseqüente ampliação do uso indiscriminado de inseticidas químicos evitando-se assim a contaminação do homem, dos alimentos, dos rios e nascentes contribuindo para evitar a degradação do meio ambiente e quebra de todo o ecossistema.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, concluímos 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.

Dra. Eliana Abdelhay
Coordenador da Subcomissão Setorial para a Saúde Humana e Animal da CTNBio

Outras Bibliografias consultadas.

Aeschbacher, K., Messikommer, R., Meile, L., Wenk, C. 2005 *Bt176 Corn in Poultry Nutrition: Physiological Characteristics and Fate of Recombinant Plant DNA in Chickens*. *Poultry Science* 84:385-394

Bernstein, I.L., J.A. Bernstein, M. Miller, S. Tierzieva, D.I. Bernstein, Z. Lummus, M.K. Selgrade, D.L. Doerfler, and V.L. Seligy. 1999. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect.* 107:575-582.

Betz, F.S., B.G. Hammond, and R. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32:156-173.

Bhatti, M.A., J. Duan, G. Head, C. Jiang, M.J. McKee, T.E. Nickson, C.L. Pilcher, and C.D. Pilcher. 2005a. Field Evaluation of the Impact of Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-Protected Bt Corn on Ground-Dwelling Invertebrates. *Environ. Entomol.* 34:1325-1335.

Secretaria Executiva da CTNBio

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

- Bhatti, M.A., J. Duan, G. Head, C.Jiang, M.J. McKee, T.E. Nickson, C.L. Pilcher, and C.D. Pilcher. 2005b. Field Evaluation of the Impact of Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-Protected Bt Corn on Foliage-Dwelling Arthropods. *Environ. Entomol.* 34:1336-1345.
- Chowdhury, E.H., H. Kuribara, A. Hino, P. Sultana, O. Mikami, N. Shimada, K.S. Guruge, M. Saito, and Y. Nakajima. 2003. Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1AB protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J. Anim. Sci.* 81:2546-2551.
- Daly, T. and G.D. Buntin. 2005. Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for lepidopteran control on nontarget arthropods. *Environ. Entomol.* 34:1292-1301.
- Herman, R.A., B.W. Schafer, B.A. Korjagin, and A.D. Ernest. 2003. Rapid digestion of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 in simulated gastric fluid. *J. Agric. Food Chem.* 51:6823-6827.
- Lopez, M.D., J.R. Prasifka, D. Bruck, and L.C. Lewis. 2005. Utility of ground beetle species in field tests of potential non-target effects of Bt crops. *Environ. Entomol.* 34:1317-1324.
- Lutz, B., S. Wiedemann, R. Einspanier, J. Mayer, and C. Albrecht. 2005. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *J. Agric. Food Chem.* 53:1453-1456.
- Mendelsohn, M., J. Kough, Z. Vaituzis, and K. Mathews. 2003. Are Bt crops safe? *Nat. Biotechnol.* 21:1003-1009.
- OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* derived control insects proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Available in [http://appli1.oecd.org/olis/2007doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2007\)14](http://appli1.oecd.org/olis/2007doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2007)14)
- Pilcher, C. D., M.E. Rice, and J. J. Obrycki. 2005. Impact of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn and Crop Phenology on Five Nontarget Arthropods. *Environ. Entomol.* 34:1302-1316.
- Romeis, J., M. Meissle, and F. Bigler. 2006b. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat. Biotechnol.* 24:63-71.
- Schulz, A., Esdaile, D. J., Debruyne, E., Hérouet, C., Mallyon, B. A., Currier, T., Hendrickx, K., Klis, R.J. van der, Rouan, D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41 (2) 134-149.
- Siegel, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* 77:13-21.
- Sjogblad, R.D., J.T. McClintock, and R. Engler. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 15:3-9.
- Sutton, S.A., A.H. Assa'ad, C. Steinmetz, and M.E. Rothenberg. 2003. A negative, double-blind, placebo-controlled challenge to genetically modified corn. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:1011-1012.