

PARECER TÉCNICO Nº 4406/2015

Processo nº: 01200.000124/2012-43

Data de Protocolo: 13/01/2012

Requerente: Dow AgroSciences Industrial Ltda

CQB: 107/99

CNPJ: 08.636.452/0001-76

Endereço: Avenida das Nações Unidas, 14.171, 2º Andar, Ed. Diamond Tower, Santo Amaro, 04794-000, São Paulo, SP

Presidente da CIBio: Mário Von Zuben

Extrato Prévio: 3190/2012 publicado em 21/05/2012

Reunião: 180ª Reunião ordinária, ocorrida em 05 de março de 2015.

Decisão: Deferido

Título da proposta: "Liberação comercial do milho DAS-40278-9"

Descrição dos OGM: milho geneticamente modificado DAS-40278-9 que confere tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e a determinados herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase (ACCase) ariloxifenoxipropionato (AOPP)

Finalidade (objetivo): liberação no meio ambiente para cultivo, produção, manipulação, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, da liberação e do descarte do organismo geneticamente modificado e de seus derivados para fins comerciais.

FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA

1. Solicitação

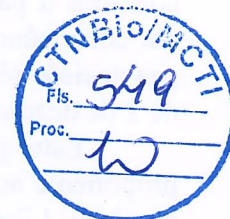
A empresa DOW AGROSCIENCES INDUSTRIAL LTDA solicita a liberação comercial do milho geneticamente modificado evento DAS-40278-9, o qual é uma planta geneticamente modificada (PGM) que apresenta tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e a determinados herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (AOPPs), como o haloxifope-R e quizalofope.

A solicitação de liberação do milho DAS-40278-9 no meio ambiente é para as finalidades de cultivo, produção, manipulação, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte do Organismo Geneticamente Modificado e de seus derivados para fins comerciais.

Este milho, sobre o qual versa a solicitação, já foi aprovado para plantio e/ou consumo animal e humano em diversos países, tais como Estados Unidos, Canadá, Japão, México, Coréia do Sul, Austrália e Nova Zelândia, Colômbia, Taiwan e África do Sul, conforme detalhado mais abaixo neste parecer.

A solicitação é acompanhada de um Relatório de Biossegurança contendo: Sumário executivo, Informações relativas ao OGM (Anexo II), Avaliação de risco à saúde humana e animal (Anexo III) e Avaliação de risco ao meio ambiente (Anexo IV).

O plano de monitoramento pós-liberação comercial não está apresentado junto com a solicitação. O mesmo será submetido à avaliação da CTNBio no prazo de 30 (trinta) dias,



contados a partir da publicação do deferimento do pedido de liberação comercial do OGM, em consonância com a avaliação de risco da CTNBio, bem como com o parecer contido na sua decisão técnica, em consonância com o Art. 3º da Resolução Normativa Nº 9 da CTNBio, de 2 de dezembro de 2011.

Este parecer foi feito levando-se em consideração: os dados apresentados pela proponente no Relatório de Biossegurança submetido à CTNBio e nas informações adicionais de duas Liberações Planejadas no Meio Ambiente concluídas durante a tramitação do Processo na CTNBio; os 03 (três) pareceres emitidos pelos relatores das Subcomissões Vegetal e Ambiental (dois favoráveis e um contrário à solicitação) e as informações dos participantes da Audiência Pública realizada.

2. Aprovações regulatórias do milho DAS-40278-9

O milho DAS-40278-9 já foi APROVADO em 10 países (África do Sul, Austrália, Canadá, Colômbia, Coréia do Sul, Estados Unidos da América, Japão, México, Nova Zelândia e Taiwan) seja para plantio, ração animal ou alimentação humana, conforme discriminado abaixo. Estas informações foram obtidas junto aos sítios dos órgãos regulatórios destes países. Entretanto, estas mesmas informações podem ser encontradas no banco de dados do International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=139>, acessado em janeiro de 2015).

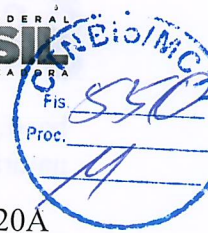
Nestes 10 países em que já houve uma decisão em relação à biossegurança do milho evento DAS-40278-9, o mesmo obteve aprovação para uso na alimentação humana em todos eles, sendo que em 05 deles obteve aprovação também para uso na ração animal e, no Canadá e Japão em 2012, e nos Estados Unidos em 2014, obteve também aprovação para plantio. Em todos estes países a aprovação ocorreu para as finalidades solicitadas. Ou seja, este evento já foi avaliado por órgãos regulatórios de outros países e nenhum deles identificou qualquer risco em relação à saúde pública e meio ambiente em função da modificação genética introduzida, bem como concluíram que este milho GM é equivalente, em termos de segurança para o consumo humano e adequação nutritiva, aos demais cultivares de milho disponíveis comercialmente.

Países em que o milho DAS-40278-9 já foi avaliado e aprovado

País	Plantio	Ração Animal	Alimentação Humana
África do Sul ¹		2012	2012
Austrália ²			2011
Canadá ³	2012	2012	2012
Colômbia ⁴			2014
Coréia do Sul ⁵		2014	2014
Estados Unidos da América ⁶	2014	2011	2011
Japão ⁷	2012	2012	2012
México ⁸			2011

2

Nova Zelândia ⁹			2011
Taiwan ¹⁰			2011



¹<http://www.nda.agric.za/doaDev/sideMenu/biosafety/doc/Commowdity%20Clearance%20Approvals.pdf>

²<http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A1042%20GM%20Corn%20DAS-40278-9%20AppR%20FINAL.pdf>

³<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/approved-under-review/decision-documents/dd-2012-92/eng/1362599848427/1362600537809>

⁴<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=105559>

⁵<http://www.biosafety.or.kr/english/decisions/decisions.asp?schOrganism=Maize&eventKeyword=DAS-40278-9&x=54&y=10>

⁶<https://www.federalregister.gov/articles/2014/09/22/2014-22409/dow-agrosciences-llc-determination-of-nonregulated-status-of-herbicide-resistant-corn-and-soybeans>

⁷http://www.bch.biodic.go.jp/english/lmo_2012.html

⁸http://www.bch.biodic.go.jp/download/en_lmo/H24.12.5_English3-1.pdf

⁹<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Lista.aspx>

⁹<http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A1042%20GM%20Corn%20DAS-40278-9%20AppR%20FINAL.pdf>

¹⁰http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Taipei_Taiwan_10-1-2012.pdf

3. Descrição do OGM, proteínas expressas e identificação do transgene

O milho DAS-40278-9, uma planta GM da espécie *Zea mays* L. ssp. *Mays*, classificado como Classe de Risco I, foi obtido pela inserção de uma versão sintética do gene *aad-1v3* da bactéria *Sphingobium herbicidorovans* (*Sphingomonas herbicidorovans*), uma bactéria gram-negativa encontrada naturalmente no solo. O gene *aad-1v3* teve sua sequência de nucleotídeos otimizada (substituição dos códons raros) para expressar em plantas de milho a enzima ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-1). A proteína AAD-1 codificada pelo transgene *aad-1 v3* presente no evento DAS-40278-9 tem sequência de aminoácidos idêntica à proteína AAD-1 nativa de *Sphingobium herbicidorovans*, que contém 296 aminoácidos e apresenta massa molecular de aproximadamente 33 kDa. A enzima AAD-1 é capaz de degradar o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), que não tem atividade herbicida (Wright *et al.*, 2009, Wright *et al.*, 2010). Assim, plantas contendo o gene *aad-1v3* de *S. herbicidorovans* apresentam tolerância ao herbicida 2,4-D, molécula que atua como uma auxina. A enzima AAD-1 também é capaz de catalisar a degradação de herbicidas da classe geral dos ariloxifenoxipropionatos (AOPPs), como o haloxifope-R e quizalofope, aos seus correspondentes fenóis inativos (Wright *et al.*, 2009, Wright *et al.*, 2010), o que confere à planta GM tolerância a estes herbicidas. Os AOPPs atuam como inibidores da via de biossíntese de lipídeos em gramíneas, inibindo a isoforma da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCase) presente no cloroplasto (Délye *et al.*, 2005). Portanto, o milho DAS-40278-9 apresenta tolerância ao herbicida 2,4-D e a determinados herbicidas da classe dos ariloxifenoxipropionatos porque expressa a enzima ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-1) da



bactéria de solo *Sphingobium herbicidorovans*, enzima esta que já se encontra presente naturalmente no solo.

O gene *aad-1* foi introduzido na linhagem de milho Hi-II via transformação genética mediada por fibras *whiskers* de carbeto de silício. Esta característica foi transferida para outras linhagens de milho por retrocruzamentos e autopolinização para a obtenção de linhagens elite. Para a transformação foi utilizado um fragmento linear de DNA de 6.236 pb liberado do plasmídeo pDAS1740 pela digestão com a enzima de restrição *FspI*. Este fragmento, contendo o cassete de expressão do gene *aad-1*, foi inserido em embriões imaturos de milho via transformação genética mediada por fibras *whiskers* de carbeto de silício, com os transformantes sendo selecionados com o herbicida haloxifope-R. Além do gene *aad-1* proveniente de *S. herbicidovorans* otimizado para expressão em plantas, o cassete de expressão contém o promotor *ZmUbi1* e a sequência de terminação *ZmPer5 3' UTR*, ambos de *Zea mays*, e as regiões de ligação à matriz nuclear *MAR v3* e *MAR v4* de *Nicotiana tabacum* foram inseridas em ambas as extremidades flanqueadoras da unidade transcricional com a finalidade de potencialmente aumentar a expressão do gene *aad-1* nas plantas transgênicas.

A caracterização molecular do inserto no transgene, feita por *Southern Blot* com DNA proveniente de folhas de cinco gerações distintas de milho contendo o evento DAS-40278-9 e utilizando sondas específicas para gene, promotor, terminador e outros elementos presentes no plasmídeo pDAS1740, mostraram que o evento DAS-40278-9 contém uma única cópia intacta do cassete de expressão do gene *aad-1*, que está integrada em um único local do genoma. Nenhuma sequência indesejada do vetor original foi detectada. A análise do padrão de hibridização de *Southern Blot* em cinco gerações (T3, T4, BC3S1, BC3S2, BC3S3) mostrou resultados idênticos, o que sugere que a inserção está integrada no genoma do milho DAS-40278-9 de forma estável (Zhuang *et al.*, 2009a). Um estudo com 85 plantas individuais de uma linhagem BC3S1 do milho DAS-40278-9, realizado para testar a segregação dentro de uma geração por análise de *Southern Blot* e pela detecção da proteína AAD-1, demonstrou a ocorrência de segregação mendeliana monofatorial para o inserto contendo o gene *aad-1* (Zhuang *et al.*, 2009b). Em um outro estudo, as taxas de segregação de seis gerações de milho DAS-40278-9 foram analisadas pela pulverização das plantas com o herbicida quizalofope para verificação da herança do evento com base nas taxas de segregação observadas e esperadas. O padrão de herança obtido nas seis gerações segregantes concordou com as proporções mendelianas esperadas, confirmando que o evento DAS-40278-9 é estável ao longo de várias gerações. Os resultados apresentados mostram que: a) o evento DAS-40278-9 contém uma única cópia intacta do cassete de expressão do gene *aad-1*, que está integrada em um único local do genoma, sem nenhuma outra sequência do vetor presente; b) a inserção se mostrou estável após 5 gerações; c) o tipo de herança da nova característica é segregação mendeliana monofatorial.

A expressão da proteína AAD-1 no milho DAS-40278-9 foi determinada em diferentes tecidos em três estudos conduzidos para esta finalidade. Em 2008 os experimentos foram conduzidos em 5 locais nos Estados Unidos (Iowa, dois locais em Illinois, Indiana e Nebraska) e em Ontário no Canadá, com diferentes condições ambientais e práticas agrônômicas (Phillips *et al.*, 2009). Em 2009 novos estudos foram conduzidos em 8 regiões representativas do cultivo do milho nos Estados Unidos, também com diferentes condições

4



ambientais e práticas agronômicas (Phillips e Lepping, 2010). No Brasil, foram conduzidos estudos de expressão da proteína AAD-1 em 03 (três) Liberações Planejadas no Meio Ambiente (LPMA): na safra de verão 2010/2011 (plantio em agosto de 2010), nas Unidades Operativas da Dow AgroSciences em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG) (processo CTNBio nº 01200.000083/2009-90), na safrinha 2012 (plantio em janeiro de 2012), nas Unidades Operativas de Indianópolis (MG) e Montividiu (GO) (processo CTNBio nº 01200.004686/2010-02) e na safrinha 2013 (plantio em fevereiro de 2013), nas Unidades Operativas de Indianópolis (MG) e Cravinhos (SP) (processo CTNBio nº 01200.003094/2011-46). Os estudos realizados no Brasil, nos Estados Unidos e no Canadá foram realizados em condições ambientais, agronômicas e com germoplasmas distintos. Entretanto, ainda assim, a variação na expressão da proteína AAD-1 nos vários tecidos mostrou padrão semelhante. Em todos os estudos realizados, a maior expressão da proteína AAD-1 foi detectada no pólen, variando de 108 a 127 ng/mg no primeiro estudo no Estados Unidos e no Canadá e de 91,7 a 101,6 ng/mg no segundo estudo nos Estados Unidos. Nos estudos realizados no Brasil a expressão da proteína no pólen foi de 157,6 a 183,0 ng/mg na safra de verão e de 128,1 e 105,4 nas safrinhas de 2012 e 2013, respectivamente. Os valores mais baixos de expressão foram encontrados nas amostras de raiz, grão e planta inteira, variando de 2,87 a 5,16 ng/mg nos Estados Unidos e Canadá, de 2,08 a 4,78 ng/mg nos Estados Unidos e, no Brasil, de 2,18 a 4,14 ng/mg na safra de verão e de 2,23 a 5,8 na safrinha de 2012 e de 2,6 a 2,4 na safrinha de 2013. Os tecidos folha V2-V4 e forragem apresentaram níveis intermediários nos 05 (cinco) estudos. Nos experimentos onde se comparou a expressão da proteína AAD-1 em parcelas pulverizadas e não-pulverizadas com os herbicidas 2,4-D e quizalofope, os valores de expressão foram semelhantes. Em resumo: a) a proteína ADD-1 é expressa em todas as partes da planta que foram analisadas; b) a maior expressão foi detectada no pólen; c) a menor expressão foi detectada na raiz, grãos e planta inteira; d) a pulverização com os herbicidas 2,4-D e quizalofope não alteraram os valores de expressão.

Em relação à identificação de plantas GM contendo o evento DAS-40278-9, os genes introduzidos neste evento podem ser identificados em grãos, forragem e seus derivados, bem como em outras matrizes através de métodos moleculares de detecção como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou o *Southern Blot*. A presença da proteína AAD-1 pode ser detectada através de teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), sendo que kits de detecção estão disponíveis no mercado. Um método biológico pode ser utilizado para identificar linhagens e cultivares de milho contendo o evento DAS-40278-9, bastando para isso a aplicação sequencial do herbicida 2,4-D. As plantas que sobreviverem à aplicação deste herbicida expressam a proteína AAD-1. Portanto, se necessário, a identificação do OGM em questão ou de seu derivado pode ser realizada de maneira rápida e precisa.

4. Classificação de risco do organismo geneticamente modificado.

De acordo com o Artigo 8 da Resolução Normativa Nº 2 da CTNBio, de 27 de novembro de 2006, o organismo objeto desta solicitação, milho DAS-40278-9, enquadra-se na Classe de Risco 1 (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade): "O OGM que contém sequências de ADN/ARN de organismo doador e receptor que não causem agravos à saúde humana e animal e efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente".

5

5. ASPECTOS RELACIONADOS À SAÚDE HUMANA E ANIMAL (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 seqüência de aminoácidos com alérgenos conhecidos. Nenhuma homologia significativa foi identificada quando a seqüência 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 seqüências de aminoácidos em compostos alergênicos ou mais de 35% de identidade numa seqüência 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.

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 agrônômicas, 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 sequencia 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 a 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 a 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).

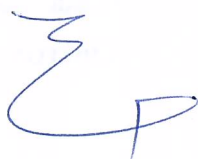
O consumo de milho.

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, o 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

10

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 antigênicos 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.

6. ANÁLISE DA BIOSSEGURANÇA AMBIENTAL

Em relação à biossegurança ambiental, serão abordados e discutidos os aspectos pertinentes à avaliação de risco do OGM.

a) Características agronômicas do milho DAS-40278-9

O comportamento apresentado pelo OGM em relação ao iso-híbrido e outros milhos comerciais é fundamental para se avaliar a sua biossegurança. Para responder estas perguntas, a proponente conduziu estudos no Brasil (Galan, 2011) e nos Estados Unidos e Canadá (Phillips et al., 2009).

Para a avaliação de características agronômicas no Brasil, três estudos foram conduzidos pela proponente: na safra 2010/11 em Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG) (Galan, 2011), na safra 2012 em Indianópolis (MG) e Montividiu (GO) (Proc. CTNBio nº 01200.004686/2010-02) e na safra 2013 em Indianópolis (MG) e Cravinhos (SP) (Proc. CTNBio nº 01200.003094/2011-46). No primeiro estudo os tratamentos foram: iso-híbrido, milho DAS-40278-9 sem pulverização, milho DAS-40278-9 pulverizado com 2,4-D e milho DAS-40278-9 pulverizado com haloxifope-R. Nos estudos dois e três os tratamentos foram: iso-híbrido e milho DAS-40278-9 pulverizado com os dois herbicidas (2,4-D e haloxifope-R). Na análise comparativa dos tratamentos nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre o milho transgênico e o milho convencional para as características avaliadas (estande inicial e final; vigor da semente; florescimento masculino e feminino; formato, cor e viabilidade de pólen; quebramento; tombamento; altura da espiga principal; altura da planta; incidência de doenças (R4 e R6) e dano de inseto na fase vegetativa.

No estudo conduzido nos Estados Unidos e Canadá, em seis localidades (Phillips et al., 2009), os tratamentos incluíram o milho DAS-40278-9 sem pulverização, o milho DAS-40278-9 pulverizado com os herbicidas 2,4-D, o milho DAS-40278-9 pulverizado com quizalofope, o milho DAS-40278-9 pulverizado com os herbicidas 2,4-D e quizalofope e o iso-híbrido convencional. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos no vigor da semente, injúria da cultura, florescimento masculino, florescimento feminino, altura da planta, acamamento, quebramento, vigor final e dias para a maturidade. A incidência de doenças e pragas (dano de inseto), monitorada visualmente por técnicos especializados, não mostrou nenhuma diferença significativa entre os tratamentos.

b) Germinação e dormência da semente

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 histopatológicos associados a essa diferença. O mesmo ocorreu com o peso da próstata que foi estatisticamente inferior ao do controle, mas sem alterações histopatológicas 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-40273-9 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

A dormência da semente foi avaliada através da germinação das sementes do milho DAS-40278-9 em comparação à do iso-híbrido em condições a quente (25°C por 7 dias) e a frio (10°C por 7 dias + 25°C por 5 dias). Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre a germinação do milho DAS-40278-9 e do iso-híbrido, sob as duas condições de germinação. Portanto, a característica de dormência da semente não foi alterada no milho GM DAS-40278-9 pela introdução do transgene.

c) Morfologia e viabilidade do pólen

As análises realizadas com o pólen coletado a campo nos Estados Unidos em 2008 mostraram que não houve nenhuma diferença estatística significativa entre o milho DAS-40278-9 e o controle convencional, tanto para as características morfológicas (forma e cor) como para a viabilidade (teste histoquímico) do pólen. Nas três liberações planejadas no meio ambiente realizadas no Brasil, em seis localidades, a análise da forma e cor do pólen também não mostrou nenhuma diferença estatística significativa entre o milho DAS-40278-9 e o controle convencional. Portanto, a morfologia e a viabilidade do pólen não foram alteradas no milho GM DAS-40278-9 pela introdução do transgene.

d) Capacidade de dispersão das estruturas de propagação e reprodução do milho DAS-40278-9

O processo de domesticação tornou o milho atual uma planta altamente dependente do homem para se reproduzir. A dispersão das sementes do milho somente ocorre através da intervenção do homem. Sem o plantio das sementes e os tratos culturais a espécie não sobrevive no campo. O milho convencional não é uma espécie invasiva em ecossistemas naturais e nem exibe tendência de proliferar-se como planta daninha (CFIA, 1994). Portanto, como o milho GM DAS-40278-9 não apresentou nenhuma característica diferente do iso-híbrido em relação a características agrônômicas, germinação e dormência da semente e morfologia e viabilidade do pólen, não se vislumbra que o mesmo venha a ter um comportamento de invasibilidade ou de planta daninha.

Não há nenhum registro de regeneração natural do milho a partir de tecido vegetativo. As sementes são as únicas estruturas de sobrevivência, não apresentam dormência e estão aptas para germinação logo após a maturação fisiológica. Em condições de campo, perdem rapidamente o poder germinativo quando expostas, na superfície do solo, à umidade e alta temperatura. Sementes remanescentes no solo de uma safra para a seguinte podem germinar, em condições favoráveis de temperatura e umidade do solo. Entretanto, as plantas voluntárias de milho com o gene *aad-1*, assim como as do milho convencional, são facilmente eliminadas através de métodos manuais, mecânicos ou químicos (herbicidas). A única diferença é que as plantas voluntárias deste milho GM deverão ser controladas com herbicidas cujo ingrediente ativo seja diferente de 2,4-D e/ou haloxifope-R.

e) Fluxo gênico

O milho é uma planta alógama, com taxa de cruzamento de aproximadamente 90% (Bueno *et al.*, 2013). A polinização é feita pela ação dos ventos, embora ocorra a presença de insetos polinizadores de outros vegetais na época da antese, principalmente abelhas e vespas, à procura de pólen. O milho DAS-40278-9, por ser similar ao milho convencional, cruza com

15

facilidade com outros milhos cultivados, bem como com espécies selvagens próximas. A espécie mais estreitamente relacionada com o milho é o teosinte (*Zea mays mexicana*), que se encontra em algumas regiões do México e Guatemala e cruza, eventualmente, com o milho produzindo descendentes férteis. Smith *et al.* (1985), entretanto, não conseguiram demonstrar a ocorrência de introgressão recente entre o milho e teosinte. Outro parente mais distante do milho é o *Tripsacum*, que ocorre na América do Sul, incluindo o Brasil. Não se tem, entretanto, evidências de introgressão natural ou retrocruzamentos entre *Tripsacum* e o milho (De Wet *et al.*, 1981). Embora algumas espécies de *Tripsacum* possam cruzar com o milho através de polinização artificial, em condições de laboratório, de casa de vegetação ou de campo, é altamente improvável, se não impossível, que ocorram cruzamentos entre as duas espécies através de fertilização natural (Beadle, 1980). Os híbridos produzidos sob condições controladas são estéreis ou sua progênie apresenta fertilidade significativamente reduzida (Galinat, 1988).

O milho DAS-40278-9, assim como o milho convencional é sexualmente compatível com outros indivíduos não-GM da mesma espécie, quer sejam de variedades crioulas, de variedades sintéticas ou de milhos híbridos. Existem, entretanto, medidas simples para evitar o cruzamento entre diferentes híbridos (ou cultivares) de milho, como por exemplo o isolamento temporal ou o isolamento espacial. Portanto, o plantio do milho DAS-40278-9, após sua liberação comercial, deverá obedecer à legislação brasileira vigente que trata da coexistência entre lavouras de milho GM e lavouras de milho convencional, impedindo assim o fluxo gênico.

Conclusão: Assim, tanto os estudos conduzidos no Brasil como nos Estados Unidos e Canadá, mostraram que o milho GM DAS-40278-9 não difere do milho convencional em características morfológicas, agrônômicas e reprodutivas. A única diferença é sua característica de tolerância a herbicidas à base de 2,4-D e haloxifope-R, propriedade esta que é conferida pela presença e expressão funcional do gene *aad-1* da bactéria de solo *Sphingobium herbicidorovans*. O fenótipo das plantas transformadas é equivalente ao fenótipo da planta original convencional no que se refere aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento e ao método de propagação, o que evidencia a ausência de interações genéticas adversas resultantes do processo de transformação. As modificações genéticas introduzidas no OGM não alteram sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos. A transferência do transgene para outras culturas de milho pode ser evitada, desde que sejam adotadas as medidas descritas na legislação vigente sobre a coexistência entre lavouras GM e lavouras convencionais.

f) Efeito do milho DAS-40278-9 em características físico-químicas do solo e concentração de nutrientes nas folhas

Os experimentos para avaliar estes parâmetros foram instalados nas Unidades Experimentais da Dow AgroSciences Industrial Ltda. localizadas nos municípios de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG) (Cruz *et al.*, 2011a). Os 4 tratamentos foram: Iso-híbrido (convencional), milho DAS-40278-9 pulverizado com 2,4-D (GF-2665), milho DAS-40278-9 pulverizado com haloxifop-R (GF-142) e milho DAS-40278-9 sem a aplicação de herbicida.

16

Características físicas e químicas do solo (Cruz *et al.*, 2011): foram avaliadas em amostras coletadas em duas ocasiões: na semeadura e aproximadamente cinco meses mais tarde, após a colheita da cultura. A análise da primeira amostragem (semeadura) foi realizada para detectar desuniformidades preexistentes entre as parcelas, que poderiam ser equivocadamente atribuídas aos tratamentos na amostragem após o ciclo da cultura. Os resultados mostraram diferenças entre locais, mas nenhum impacto foi detectado nas características químicas-físicas do solo pela presença do milho DAS-40278-9, com ou sem aplicação de herbicidas. As diferenças entre locais são esperadas, uma vez que os solos são formados a partir de materiais de origem diferentes e com históricos de culturas e de práticas de calagem e adubação não necessariamente semelhantes.

Estado nutricional das plantas (Cruz *et al.*, 2011): foi coletada uma amostra composta de 30 folhas de cada parcela, no florescimento, logo após a polinização. Na análise conjunta, a concentração dos macronutrientes (N, P, Ca, Mg e S) e dos micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) nas folhas do milho não variou em função dos tratamentos. Ocorreram, entretanto, diferenças significativas entre os locais para Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn, com valores superiores para as plantas de Mogi Mirim. Isto pode ser atribuído a diferenças no teor de nutrientes no solo. No entanto, outros fatores podem fazer as concentrações de nutrientes nas folhas variarem, como quantidades de nutrientes aplicadas, temperatura e disponibilidade de água, interações entre nutrientes e luminosidade. A combinação destes fatores em cada local de condução dos experimentos explica as variações obtidas. Para concentração de K houve interação local x tratamento. No entanto, em Indianópolis, a maior concentração foi determinada nas plantas GM com a aplicação de haloxifop-R, enquanto em Mogi Mirim foi observado nas plantas GM com a aplicação de 2,4-D. Em Mogi Mirim as concentrações de K foram maiores em quase todos os tratamentos, o que pode ser resultado de adubações realizadas.

Conclusões: Quando comparado como seu controle iso-híbrido, o milho GM DAS-40278-9, com ou sem aplicação de herbicidas, não causa impacto nas características físico-químicas do solo e nem apresenta diferenças na concentração de nutrientes nas folhas.

g) Biodegradabilidade da planta GM

Para avaliar a decomposição de plantas do milho DAS-40278-9, comparativamente com seu controle convencional, um estudo foi conduzido nas Unidades Operativas de Indianópolis (MG) e Mogi Mirim (SP). Os 4 tratamentos foram: Iso-híbrido (convencional), milho DAS-40278-9 pulverizado com 2,4-D, milho DAS-40278-9 pulverizado com haloxifop-R e milho DAS-40278-9 sem a aplicação de herbicida. A decomposição dos restos culturais no campo foi avaliada pelo método de sacos de nylon (Santos e Whitford, 1981). O processamento das amostras e análises foram realizadas no laboratório da Gravena Ltda, Unidade Experimental de Jaboticabal. Na época da colheita, 4 a 5 plantas/parcela/tratamento foram coletadas. As amostras (colmos e as folhas) foram secas em estufa. Em cada saco de nylon foram colocados 10 g de material (~ 5,5 g de colmo e 4,5 g de folha). Em cada parcela do ensaio colhido foram enterrados 12 sacos. As amostragens foram feitas 30, 60, 90 e 120 dias após o início da incubação da matéria orgânica no solo. Os resultados das análises

mostraram que as amostras do milho DAS-40278-9 e de seu isso-híbrido apresentaram o mesmo padrão de decomposição no intervalo de tempo avaliado, diferindo apenas em função do local, na avaliação aos 30 dias de incubação. Da mesma forma a relação C/N das plantas de milho DAS-40278-9, com ou sem aplicação dos herbicidas, não diferiu das plantas do controle iso-híbrido.

Conclusão: A biodegradabilidade do milho GM DAS-40278-9 e a relação C/N, com ou sem aplicação de herbicidas, não foram alteradas quando comparadas com a do milho controle convencional (iso-híbrido). Portanto, não há razão para esperar que os restos culturais do milho GM afetem as características do solo e sua biota de maneira diferente do milho convencional.

h) Transferência horizontal da característica introduzida no OGM para a microbiota do solo

O gene *aad-1* que codifica a proteína AAD-1, que confere tolerância ao herbicida 2,4-D e alguns herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionato, foi isolado da bactéria de solo *Sphingobium herbicidovorans*, ou seja, de um organismo que já ocorre nos ambientes naturais de plantio de milho. Associado a isso, não há na literatura descrição de mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva, da transferência de DNA de plantas para microrganismos (Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh *et al.* 1994; Prins e Zadoks, 1994; Schluter *et al.* 1999; Connor *et al.*, 2003). Mas, supondo que fosse possível a transferência horizontal, o microrganismo recipiente dessa transferência do gene *aad-1* teria o mesmo risco de receber o gene do próprio *Sphingobium herbicidovorans*, organismo a que seres humanos e animais já estão expostos, e do qual o gene é originário. Além disso, os dados de biossegurança apresentados na presente solicitação em relação à proteína AAD-1 indicam claramente que a mesma não apresenta riscos para a saúde humana, animal e para o meio ambiente. Os herbicidas aos quais o OGM é tolerante não apresentam ação antibiótica.

Conclusão: Chance de ocorrer transferência horizontal é muito remota e o risco é negligenciável.

i) Impactos negativos ou positivos aos organismos alvo e não-alvos com a liberação do milho DAS-40278-9

No presente caso, a presença do gene *aad-1* da bactéria de solo *Sphingobium herbicidovorans* confere ao milho GM DAS-40278-9 apenas tolerância aos herbicidas à base de 2,4-D e herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (AOPPs). Afora esta característica, os estudos realizados mostraram que o milho GM DAS-40278-9 não difere do milho convencional em características agrônômicas, morfológicas e reprodutivas, assim como é equivalente em composição química e nutricional ao milho convencional, sendo tão seguro quanto o mesmo. A proteína AAD-1 produzida pelo milho GM DAS-40278-9 é uma enzima que não tem efeito inseticida, nematicida, fungicida, bactericida ou outros efeitos que não o de inativar os herbicidas 2,4-D e determinados herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos. Portanto, o conceito de “organismo alvo” não se aplica ao milho GM DAS-40278-9. Este conceito se aplica por exemplo a OGMs que apresentam resistência a insetos.

A expressão do gene *aad-1* permite que o milho DAS-40278-9 tolere a aplicação dos herbicidas à base de 2,4-D e herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (haloxifope-R, quizalofope, etc.), enquanto que as plantas que não o expressam morrem após a aplicação desses herbicidas. Quando aplicados sobre a lavoura de milho DAS-40278-9, eliminarão as plantas daninhas sensíveis a seus ingredientes ativos, levando a alterações no número de indivíduos destas populações na área de cultivo e provavelmente a redução em seu banco de sementes no solo. Esse efeito é observado em áreas onde se implementa qualquer estratégia de controle de plantas daninhas, tanto através de métodos químicos por outros herbicidas, como através de métodos mecânicos como capina ou gradagem.

Os herbicida 2,4-D e haloxifope-R estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O 2,4-D (registro N° 02108604) é amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas latifoliadas, em aplicações pós-emergentes nas culturas do trigo, milho, arroz, cana-de-açúcar e pastagens, e em pré-plantio das culturas de soja e cana-de-açúcar. O haloxifope-R (registro N°. 007194) é amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas de folhas estreitas, em pós-emergência das culturas da soja, algodão e feijão.

A disponibilidade do milho DAS-40278-9 para os agricultores brasileiros será mais uma tecnologia disponível para o controle de plantas daninhas na lavoura de milho, permitindo o uso rotativo de herbicidas, o que é benéfico. Sua introdução terá um impacto definitivo nas práticas de controle de plantas daninhas, como uma nova ferramenta para garantir a expressão do potencial produtivo dos híbridos de sua escolha. O cultivo do milho DAS-40278-9 permitirá aos agricultores lidarem proativamente com as populações de plantas daninhas, mantendo a cultura “no limpo” e, ao mesmo tempo, evitando alterações adversas na população de invasoras.

Como foi demonstrado que o milho DAS-40278-9 é tão seguro quanto o milho convencional, não se espera efeitos adversos de sua introdução sobre os diferentes organismos presentes no meio ambiente diferente daqueles ocasionados pelo milho convencional. Assim, nenhum efeito diferente daquele do milho convencional é esperado para organismos indicadores relevantes, simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores com o cultivo do milho DAS-40278-9.

A proteína AAD-1 expressa pelo milho DAS-40278-9 não apresenta similaridade com proteínas reconhecidamente alergênicas ou tóxicas; portanto, seu consumo não representa risco à saúde de humanos e animais.

O milho DAS-40278-9, à semelhança do milho convencional, não tem características de espécie invasora ou propriedades de plantas daninhas, exibindo apenas a característica nova de tolerância a alguns herbicidas.

Conclusão: Pelos resultados dos estudos apresentados e do conhecimento disponível na literatura, pode-se concluir que o evento DAS-40278-9 não produz alterações significativas em organismos que compartilham o mesmo ambiente da lavoura diferente daquele que ocorre no cultivo do milho convencional. O milho é uma base alimentar importante para milhares de pessoas no mundo e também muito utilizado para ração animal, ou seja, é uma das principais fontes de proteína vegetal para transformação em proteína animal.

7 - Restrições ao uso do OGM e seus derivados

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação”.

8. Considerações sobre particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização)

No Brasil, não há espécies silvestres nativas que possam ser polinizadas pelo milho. A espécie silvestre mais próxima ao milho é o teosinte, encontrado no México e em alguns locais da América Central, onde pode cruzar com o milho cultivado em campos de produção. Assim, não há motivos para se restringir o plantio do milho GM no que diz respeito à possibilidade de o mesmo cruzar com espécies silvestres nativas da flora brasileira.

9. CONCLUSÃO

Considerando que:

- 1) O milho é a espécie que atingiu o mais elevado grau de domesticação entre as plantas cultivadas, sendo incapaz de sobreviver na natureza sem intervenção humana;
- 2) Não há no Brasil espécies silvestres nativas com que o milho possa se inter cruzar;
- 3) Os estudos realizados no Brasil, Canadá e Estados Unidos, demonstraram que o milho DAS-40278-9 não difere do milho convencional em características agrônômicas, morfológicas, reprodutivas, nas características de sobrevivência e na forma de disseminação das plantas, na resposta aos principais patógenos e pragas, bem como na composição química e nutricional, com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas à base de 2,4-D e a herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (haloxifope-R, quizalofope, etc.), conferida pela presença e expressão do gene *aad-1*.
- 4) A biossegurança deste evento já foi avaliada pelos sistemas regulatórios de 10 países, sendo aprovado em todos para o uso pretendido (plantio, ração animal, nutrição humana);
- 5) O OGM apresenta risco negligenciável de alergenicidade e de toxicidade, bem como risco negligenciável para a saúde humana e animal e o meio ambiente.
- 6) O OGM não apresenta risco de invasibilidade ou de planta daninha;
- 7) O milho DAS-40278-9 apresenta equivalência substancial com o milho convencional e, por conseguinte, o valor nutritivo é comparável.
- 8) A disponibilidade do milho DAS-40278-9 constituir-se-á numa alternativa importante para atender às necessidades dos produtores de milho no Brasil no controle de plantas daninhas;
- 9) É perfeitamente possível a coexistência no campo entre lavouras de milho GM DAS-40278-9 e lavouras de milho convencional ou crioulo;
- 10) O herbicida 2,4-D está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas latifoliadas, em aplicações pós-emergentes nas culturas do trigo, milho, arroz, cana-de-açúcar e pastagens, e em pré-plantio das culturas de soja e cana-de-