

PARECER DO RELATOR

Liberação Comercial de Organismo Geneticamente Modificado – RN5

Processo: 01200.001135/2015-93

Data de Protocolo: 31/3/15

Próton: 16258/2015

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CQB: 03/96

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Avenida Nações Unidas, nº 12901, 3º, 7º, 8º, 9º e 19º andares, São Paulo (SP)

Presidente da CIBio: Geraldo U. Berger

Extrato Prévio: 4651/2015, publicado em 11/6/15

Assunto: Liberação Comercial do milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante ao glifosato MON 87411

Descrição do OGM: Milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante ao herbicida glifosato MON 87411.

Classificação: Classe de Risco I

Resolução Normativa: RN 5/2008

Fundamentação

A requerente através dos requisitos estabelecidos na Resolução Normativa 05 da CTNBio na forma da lei 11.105 de 24 de março de 2005, solicita a liberação para uso comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos MON 87411 com resistência a insetos e tolerância a glifosato. Para tanto submete o “Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 87411”. Para este relatório foram também levadas em consideração os resultados de experimentos realizados em campo e laboratório, nos Estados Unidos e Argentina. Os experimentos realizados no Brasil abrangeram: a caracterização fenotípica e agrônômica, produção de tecidos para análises de expressão das proteínas exógenas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS e dos níveis de expressão do dsRNA (RNA fita dupla) DvSnf7; composição nutricional do milho (componentes centesimais e outros); avaliação de degradação de biomassa, abundância de microrganismos de solo, de morfologia e viabilidade de pólen, de plantas voluntárias, de vigor e germinação de sementes e de caracterização físico-química do solo.

I – Requerimento de liberação comercial assinado pelo representante legal

Apresentado de acordo com as exigências.

II. Parecer técnico da CIBio

Apresentado de acordo com as exigências.

III– Declaração de veracidade das informações fornecidas pelo responsável legal.

Apresentado de acordo com as exigências.

IV – Resumo executivo com a síntese da proposta

O resumo executivo (nas páginas 23 a 30) do Relatório de Biossegurança do milho MON 87411 apresenta todas as informações apresentadas no relatório.

O milho MON 87411 foi desenvolvido por transformação com *A. tumefaciens* e tem proteção da *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), uma praga de sistema radicular, e tolerância ao glifosato. Em um dos cassetes de expressão foi inserida sequências repetidas *in tandem* homólogas ao gene *Snf7* de *Diabrotica virgifera virgifera* (*DvSnf7*), que leva à formação de dsRNA de 240 pb do gene *DvSnf7*, levando à supressão da expressão do gene por RNAi na praga alvo. Outro cassete contém o gene *cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis* que codifica a proteína *Cry3Bb1*, que confere proteção contra praga de raiz. O terceiro cassete promove a expressão do gene *cp4epsps* de *Agrobacterium* sp, conferindo resistência a glifosato. Portanto, o milho MON 87411 apresenta resistências a larvas de *Diabrotica speciosa* e tolerância a glifosato.

O milho MON 88017 foi o primeiro produto aprovado com resistência a pragas de raiz e a glifosato e contém os genes *cry3Bb1* e *cp4epsps*. A proteína *Cry3Bb1* do milho MON 87411 é idêntica à milho MON 88017 (milho aprovado em 2010 pela CTNBio). O uso de dois genes para resistência a insetos (*cry3Bb1* e *DvSnf7*) aumentaria as possibilidades de manejo de pragas e maior potencial produtivo da lavoura.

De acordo com o relatório da empresa somente uma cópia do T-DNA derivado do plasmídeo PV-ZMIR10871 foi inserida em um único locus no genoma do milho MON 87411, as sequências inseridas são as mesmas do fragmento original no plasmídeo, elementos genéticos adicionais não foram detectados, o inserto é estável. Os níveis de expressão das proteínas e do dsRNA foram avaliados em diferentes localidades e em diferentes partes da planta. Tais níveis seriam adequados para o controle de pragas e tolerância a glifosato. O dsRNA *DvSnf7* é altamente específico para gene alvo de *Diabrotica* e baixo potencial para efeitos em organismos não alvos. Estudos prévios demonstraram também a segurança da proteínas CP4 EPSPS e *Cry* de *Bt*.

V – Informações sobre o OGM (anexo II da RN 5)

Espécie: *Zea mays*

Característica Inserida: resistência a insetos coleópteros e tolerância a glifosato.

Método de introdução da característica: O milho MON 87411 foi desenvolvido por transformação com *A. tumefaciens*.

Uso proposto: uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas ao milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante a glifosato.

O milho MON 87411, objeto deste parecer, foi desenvolvido utilizando a técnica de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Ele é um evento único, que possui proteção contra danos causados por larvas da espécie *Diabrotica speciosa*, uma praga de raiz, e é tolerante à ação do herbicida glifosato, utilizado no controle de plantas daninhas na

cultura do milho. Para sua obtenção foi utilizada a linhagem de milho LH244 que foi transformada geneticamente com um plasmídeo binário (PV-ZMIR10871) para geração do milho MON 87411.

O plasmídeo PV-ZMIR10871 engloba três cassetes gênicos em seu T-DNA para expressão das características desejadas na planta. No processo de transformação genética, embriões imaturos foram retirados, após polinização, de uma espiga de milho convencional. Após o cocultivo dos embriões com *Agrobacterium* carregando o plasmídeo PV-ZMIR10871, os embriões imaturos foram colocados em meio de seleção contendo glifosato e carbenicilina para inibir o crescimento de células vegetais não transformadas e de *Agrobacterium*, respectivamente. Uma vez desenvolvidos, os calos transformados foram colocados em meio de cultura para o desenvolvimento de brotos e posterior enraizamento. As plantas R0 enraizadas com características fenotípicas normais foram selecionadas e transferidas para o solo, para crescimento e avaliações moleculares e de biossegurança.

Um dos cassetes presentes no plasmídeo PV-ZMIR10871 é o cassete de supressão gênica envolvendo um fragmento de DNA que contém sequências repetidas ao mesmo tempo, com homologia a uma região do gene *Snf7* de *Diabrotica virgifera* (DvSnf7), uma praga de raiz de milho. Esse cassete de supressão resulta na formação de um transcrito de RNA dupla fita (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*) codificado por fragmentos de 240 pb do gene DvSnf7 no milho MON 87411. O modo de ação do dsRNA DvSnf7 baseia-se na supressão gênica mediada por RNA de interferência (RNAi), um mecanismo exercido por moléculas de RNA complementares a RNAs mensageiros, o qual inibe a expressão gênica na fase de tradução ou dificulta a transcrição de genes específicos.

Quando o milho MON 87411 é consumido pelas larvas de *D. speciosa*, o dsRNA DvSnf7 é reconhecido pela maquinaria de RNAi das larvas, resultando na redução ou supressão da expressão do gene alvo DvSnf7, e em eventual morte das mesmas. Um outro cassete no plasmídeo PV-ZMIR10871 é o que leva à expressão do gene *cry3Bb1*, derivado de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (subsp. *kumamotoensis*), que codifica a proteína Cry3Bb1, a qual confere proteção contra os danos causados pelas larvas da praga de raiz. O terceiro cassete no plasmídeo PVZMIR10871 é o que promove a expressão do gene *cp4 epsps*, derivado de *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que codifica a proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), a qual confere tolerância ao herbicida glifosato. Em resumo, esses três cassetes presentes no T-DNA do plasmídeo PV-ZMIR10871 conferem as características de resistência a larvas de *D. speciosa* e de tolerância ao glifosato.

Diabrotica speciosa (Coleoptera: Chrysomelidae) é uma praga da cultura de milho com hábitos subterrâneos, cujas larvas alimentam-se das raízes do milho. Os danos causados por *D. speciosa* ocorrem no período entre um a dois meses de desenvolvimento da planta, quando as larvas atacam principalmente as raízes adventícias. Ao se alimentarem das raízes adventícias do milho, essas larvas deformam as plantas, deixando-as mais suscetíveis ao acamamento e fazendo com que possam eventualmente se tornar recurvadas, produzindo o sintoma conhecido como “pescoço de ganso”. O recurvamento das plantas resulta de danos severos no sistema radicular. O milho acamado dificulta e diminui a eficiência da colheita mecânica. O dano causado às raízes de milho pelas larvas de *D. speciosa* reduz a capacidade da planta em absorver água e nutrientes, limitando a capacidade produtiva e tornando-as também mais suscetíveis a infecções por doenças radiculares e ao tombamento, o que leva a perdas no rendimento.

Os adultos de *D. speciosa* se alimentam das folhas do milho, o que pode ser confundido com os danos iniciais da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). Os adultos de *D. speciosa* também se alimentam de estilo-estigmas do milho, o que prejudica a fertilização e a formação dos grãos. No Brasil, os adultos de *D. speciosa* ocorrem em todos os Estados e regiões, e o ataque de larvas de *Diabrotica* tem causado danos ao sistema radicular de plantas de milho. As táticas de manejo de *D. speciosa* são basicamente restritas ao controle químico ou o milho geneticamente modificado.

O primeiro produto geneticamente modificado resistente a praga de raiz desenvolvido pela Monsanto foi o milho MON 88017, que contém os genes *cp4 epsps* e *cry3Bb1*, os quais codificam as proteínas CP4 EPSPS e Cry3Bb1, respectivamente. A sequência de aminoácidos prevista para a proteína Cry3Bb1 presente no milho MON 88017 é idêntica à sequência prevista para a proteína Cry3Bb1 presente no milho MON 87411. O mesmo ocorre para a proteína CP4 EPSPS. A comercialização do milho MON 88017 foi aprovada pela CTNBio em 2010 como evento individual. Em 2011 o produto combinado, milho MON 89034 × MON 88017, foi aprovado.

A combinação de duas vias de controle da praga de raiz *D. speciosa* no milho MON 87411 (a proteína Cry3Bb1 e o dsRNA DvSnf7), poderá fornecer um controle mais efetivo da praga do que produtos com um único modo de ação, como é o caso do milho MON 88017, que expressa somente a proteína Cry3Bb1 para controle dos insetos alvo. A incorporação desses dois transgenes (*cry3Bb1* e DvSnf7) e, conseqüentemente, o duplo modo de ação, oferece vantagens, como maior durabilidade do produto do ponto de vista da resistência dos insetos. O milho MON 87411 também apresenta tolerância ao herbicida glifosato o que facilita o controle de plantas daninhas quando se cultiva este OGM.

A competição por luz, nutriente e umidade entre o milho e as plantas daninhas pode levar a reduções proporcionais em rendimento (Knake et al., 1990). Estudos mostraram que o controle de plantas daninhas é necessário para reduzir as perdas de rendimento da cultura. Algumas espécies de plantas daninhas podem reduzir em até 50% o rendimento da cultura (Bosnic e Swanton, 1997; Fausay et al., 1997). Embora não seja missão da CTNBio analisar o impacto dos herbicidas sobre o meio ambiente ou saúde humana, é importante mencionar as conclusões da Agência Europeia de Segurança Alimentar, aprovada em 30 de outubro de 2015 sobre a avaliação de risco da substância glifosato (EFSA, 2015). A EFSA conclui que o glifosato não representa risco de causar câncer em humanos e as evidências não amparam a classificação apresentada por algumas entidades de potencial risco carcinogênico. O milho MON 87411 foi aprovado para plantio comercial nos Estados Unidos (2014) que solicitou sua desregulamentação por considera-lo de baixo risco. Segundo o site <http://www.isaaa.org/> o milho MON 87411 já teria sido aprovado em 2015 no Canadá, Nova Zelândia e Taiwan.

Proteínas expressas no milho MON 87411

O milho MON 87411 possui os cassetes de expressão dos genes *cry3Bb1* e *cp4 epsps* que, quando transcritos e traduzidos, resultam na expressão das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS, respectivamente. O milho MON 87411 possui também o cassete de supressão que produz o dsRNA DvSnf7 que, por mecanismo de RNA interferência, inibirá a expressão desse gene no inseto alvo.

A **proteína Cry3Bb1** se origina de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), uma bactéria de solo Gram-positiva, que acumula proteínas cristais durante a esporulação. A proteína Cry3Bb1 faz parte da família de proteínas inseticidas 3D-Cry (Crickmore, 2012), que estão subdivididas em diferentes grupos com base em sua alta especificidade para insetos alvo. Como essas proteínas têm um espectro de atividade limitado, elas não causam impacto sobre outras populações de insetos e outros organismos. Por exemplo, as proteínas Cry3 possuem atividade inseticida específica contra insetos coleópteros, enquanto as proteínas Cry1A possuem atividade inseticida específica contra lepidópteros (Höfte e Whiteley, 1989). O modo de ação generalizado para proteínas Cry foi descrito por English e Slatin (1992). Ele inclui a ingestão de cristais por insetos e a solubilização desses cristais no intestino médio dos insetos, seguido de ativação por processo proteolítico das proteínas Cry solúveis por enzimas digestivas no intestino médio. A proteína ativada então se liga a receptores específicos na superfície do epitélio do intestino médio de insetos alvo e se insere na membrana, levando à formação de poros e ruptura generalizada dos gradientes transmembrana e, portanto, da integridade celular (Vachon *et al.*, 2012).

O gene *cp4 epsps* no milho MON 87411 é derivado de gene equivalente de *Agrobacterium* sp. cepa CP4. A sequência codificadora *cp4 epsps* codifica uma **proteína CP4 EPSPS** que consiste de um único polipeptídeo de 455 aminoácidos (Padgett *et al.*, 1996). A proteína CP4 EPSPS é similar e funcionalmente idêntica às enzimas EPSPS endógenas de plantas, mas com afinidade muito reduzida pelo glifosato se comparada à EPSPS endógena de plantas (Padgett *et al.*, 1996). Em plantas convencionais, incluindo plantas daninhas, o glifosato bloqueia a biossíntese da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato, privando as plantas de aminoácidos aromáticos fenilalanina e triptofano, com consequência para todo o metabolismo de terpenóides, derivados da via do ácido shiquímico (Haslam, 1993; Steinrücken e Amrhein, 1980). Em plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, os requerimentos por aminoácidos aromáticos e outros metabólitos essenciais são alcançados pela ação continuada da enzima CP4 EPSPS na presença do glifosato (Padgett *et al.*, 1996). A proteína CP4 EPSPS expressa no milho MON 87411 é idêntica à proteína CP4 EPSPS expressa em outros produtos tolerantes ao glifosato em culturas como soja, milho, canola, algodão, beterraba e alfafa, todas já aprovadas comercialmente em vários países há quase duas décadas.

A supressão de pós transcricional de genes mediada por RNA que ocorre de forma natural em plantas foi previamente documentada e inclui a seleção da coloração do tegumento em sementes de soja (Tuteja *et al.*, 2004) e do caule em milho (Della Vedova *et al.*, 2005). Em ambos os casos, a produção de chalcona sintase é suprimida, levando a uma diminuição significativa da pigmentação. A supressão gênica mediada por RNA também foi utilizada em diversas culturas derivadas da biotecnologia destinadas à alimentação e que já foram liberadas comercialmente pelo USDA ou outras autoridades regulatórias, incluindo mamão, abóbora, batata, feijão comum e ameixa resistentes a vírus, bem como tomate de amadurecimento tardio e soja com composição de óleos alterada (Parrott *et al.*, 2010). Avaliações de segurança foram conduzidas (Parrott *et al.*, 2010; Petrick *et al.*, 2013) e aprovações regulatórias globais foram obtidas para produtos em que há supressão gênica mediada por RNAi.

O silenciamento gênico também pode ser alcançado com o uso de RNAi em insetos suscetíveis que ingerem dsRNAs (Baum *et al.*, 2007a; Terenius *et al.*, 2011; Whyard *et al.*, 2009). Produtos que controlam insetos podem ser desenvolvidos através do silenciamento de genes específicos mediado por RNAi para suprimir genes críticos para a sobrevivência do inseto.

Devido ao fato do silenciamento gênico ser sequência específica, esses produtos têm o potencial de selecionar organismos alvo de um grupo restrito de espécies praga com alto grau de parentesco e diminuir grandemente a probabilidade de efeitos adversos em organismos não alvo, incluindo os benéficos à agricultura. Demonstrou-se que o espectro de atividade do **dsRNA DvSnf7** é pequeno e que a atividade só é evidente em um subgrupo de besouros dentro da subfamília Galerucinae, da família Chrysomelidae, por sua vez pertencente à ordem Coleoptera (Bachman *et al.*, 2013).

A descrição do plasmídeo (elementos e mapas) usado na transformação bem com todos os elementos que o constituem estão apresentadas na V-2 (página 37) e na figura V-1 na página 41 do Relatório de Biossegurança do milho MON 87411. Para a caracterização da inserção do genes no genoma do genótipo receptor foram utilizadas técnicas como sequenciamento de nova geração juntamente com análise de junção do inserto no genoma, PCR e bioinformática. Os resultados demonstram que o milho MON 87411 contém uma cópia do T-DNA com os cassetes de expressão dos genes *cry3Bb1* e *cp4epsps*, além o cassete de expressão de dsRNA do gene *DvSnf7*. A cópia está em um único locus e é herdada de modo mendeliano. Não foram encontrados outros elementos do plasmídeo no genoma do milho MON 87411. Para a confirmação da inserção em cópia única foram sequenciados os genomas completos de cinco gerações de milho MON 87411. Durante o processo de inserção do T-DNA houve deleção de um fragmento de 118 pb, provavelmente associado a mecanismo de reparo de DNA durante o processo de transformação. Ficou comprovado que o inserto no genoma é de 11248 pb e que contém somente sequências do T-DNA, sem outros elementos regulatórios do plasmídeo.

As proteínas *Cry3Bb1* e *CP4-EPSPS* e o dsRNA *DVSnf7* produzidos no milho MON 87411 foram também caracterizadas, comparando-as com as mesmas produzidas por expressão heteróloga em *E. coli*. Essa comparação foi feita por sequenciamento de N-terminal, espectrometria de massa Maldi-Tof, SDS-Page e Western blot com anticorpos específicos. Todos os resultados (páginas 78 a 95 do Relatório) confirmam a identidade das proteínas produzidas em *E. coli* com aquelas produzidas no milho MON 87411, confirmando assim a validade no uso das proteínas produzidas em sistema heterólogo para tais estudos. Para caracterização do dsRNA ele foi produzido em bactéria (a concentração na planta é muito baixa) e análise foi feita por sequenciamento da fita reversa do dsRNA, digestão com RNA e Northern blot. Os resultados demonstram a fidelidade de sequência inserida no genoma do milho MON 87411. As determinações das proteínas e de dsRNA foram conduzidas com diferentes amostras produzidas no Brasil e na Argentina e com diferentes partes da planta.

Para a avaliação de eficiência do milho MON 87411 quanto suas características e para detecção rotineira de sequências dos transgenes recomenda-se ensaios de desafios com as pragas alvo e PCR, respectivamente.

O padrão de segregação dos transgenes no milho MON 87411 é mendeliana na razão de 1:1 na geração BC₂F₁ e 1:2:1 na geração BC₃F₁. Testes qui-quadrado indicam não há diferenças estatísticas significativas nas razões de segregação, indicando existe somente uma cópia em homozigose dos transgenes.

Em todos os ensaios conduzidos com o milho MON 87411 não foram observados efeitos pleiotrópicos ou epistáticos, sendo que as características fenotípicas não sofreram alterações além daquelas introduzidas pela expressão dos transgenes.

A estabilidade do inserto no milho MON 87411 foi avaliada através de análise de junção e sequenciamento de nova geração por cinco gerações. Essa análise comprova a integridade e estabilidade do inserto T-DNA em um único locus de integração no genoma. Por outro lado, não foram observadas existência de interação entre as proteínas produzidas a partir dos transgenes, uma que ambos tem funções completamente distintas, os locais de atividade biológicas dessas proteínas são também distintos, ambas tem longo histórico de uso em plantas GM sem qualquer relato de interações entre elas. Assim também se aplica ao dsRNA alvo para o gene *Snf7*, uma vez que esse gene é específico do inseto alvo.

Para se avaliar as potenciais modificações que a inserção dos transgenes poderiam causar a capacidade reprodutiva, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes no milho MON 87411 foram conduzidos experimentos no Brasil e nos Estados Unidos, onde foram avaliados características fenotípicas (estande inicial, vigor das plantas, morfologia de pólen, altura das espigas, estande final, etc.), interações ambientais (estresses abióticos e bióticos, organismos não alvo, danos a artrópodes). O milho MON 87411 não difere consistentemente do milho controle convencional. As diferenças observadas não representariam potenciais riscos ambientais, potencial aumento de persistência da cultura como planta daninha, ou risco de transferência dessas características a população convencional.

Nenhum efeito pleiotrópico foi observado no milho MON 87411 até o presente momento durante os experimentos de campo realizados em diferentes países. O milho MON 87411 encontra-se atualmente aprovado nos Estados Unidos pelo FDA e na Austrália, Canadá, Japão, Nova Zelândia e Taiwan. Essas informações foram atualizadas até 18 de novembro de 2015.

Diferenças significativas na morfologia, no crescimento ou no desenvolvimento do milho MON 87411 não foram encontradas quando comparado ao milho controle convencional nos experimentos de campo, inclusive no Brasil. Os ensaios conduzidos com o milho MON 87411 nos Estados Unidos foram monitorados para o aparecimento de plantas voluntárias. No Brasil, esse monitoramento pós-colheita também foi realizado em seis Estações Experimentais localizadas em: Cachoeira Dourada, MG (MGCH); Não-Me-Toque, RS (RSNM); Sorriso, MT (MTSO); Rolândia, PR (PRRO); Luiz Eduardo Magalhães, BA (BALM); Santa Cruz das Palmeiras, SP (SPSD). Nestes locais o milho MON 87411 mostrou comportamento semelhante híbridos convencionais de milho, exceto pela habilidade de resistir ao ataque de larvas de coleópteros praga do gênero *Diabrotica* e de ser tolerante ao glifosato.

Nos experimentos realizados no Brasil na safras 2013/2014 o monitoramento pós-colheita foi conduzido por seis ou quatro meses, dependendo das condições de irrigação das áreas. Os estudos da quantificação das proteínas expressas nos OGM mostram que as quantidades dessas proteínas na forragem para alimentação animal e nos grãos para alimentação humana e animal estão abaixo do limite de um por cento definido no artigo 2º. do Decreto No. 4.680 de 24 de abril de 2003. Este decreto regulamenta a Lei No. 8.078 de 11 de setembro de 1990, sobre o direito à informação. Este Artigo exige que os alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham mais de um por cento de material transgênico deverá ser informado através da rotulagem. Nos experimentos conduzidos no Brasil o milho MON 87411 apresentou na forragem 0,0048% e nos grãos 0,00033 % da proteína Cry3Bb1. Para a proteína CP4 EPSPS os valores foram de 0,0012% para a forragem e 0,00018 para grãos. Os níveis de expressão do dsRNA DvSnf7 foram de 8×10^{-3} µg/g para forragem e $0,064 \times 10^{-3}$ µg/g para os grãos.

Na Argentina os resultados obtidos são muito semelhantes ao do Brasil. Embora os níveis de expressão das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS no milho sejam baixos, eles são suficientes para conferir as respectivas características de resistência a larvas de coleópteros praga do gênero *Diabrotica* e tolerância ao glifosato. Experimentos de campo para avaliar as características agrônomicas e fenotípicas, interações ecológicas e abundância de artrópodes do milho MON 87411 em comparação ao milho controle convencional e às referências comerciais foram conduzidos durante a safra 2013/2014 nos seis locais já definidos (MG, BA, MT, SP, PR e RS). As variáveis fenotípicas analisadas foram: Estande inicial (2 linhas), Vigor das plantas (esc. 1-9), 50% plantas com pólen (dias), 50% espigas com estilo-estigma (dias), Stay green [Stay green é uma característica genética da planta de permanecer verde mesmo quando a espiga já se encontra em adiantado estágio de maturação e é muito influenciada pelo meio ambiente] (escala 1-9), Altura da espiga (m), Altura das plantas (m), Espigas caídas (2 linhas), Plantas caídas (2 linhas), Estande final (2 linhas), Massa de 1 litro (kg), Umidade de grãos (U%), Rendimento de grãos (kg) e Massa de 1000 grãos (kg).

As análises estatísticas foram realizadas por região, Norte (BA, MT, MG e SP) e Sul (PR e RS). No geral, o vigor das plantas do milho MON 87411 foi significativamente superior ao milho controle convencional (2,3 vs. 1,7 escala 1-9), enquanto que o número de espigas caídas do milho MON 87411 foi significativamente inferior ao milho controle convencional (12,3 vs. 18,3 espigas/2 linhas). O estande final do milho MON 87411 foi significativamente inferior ao milho controle convencional (38,3 vs. 44,4 plantas/2 linhas), mas não afetou significativamente o rendimento de grãos.

Estudos foram realizados para obter informações sobre possíveis alterações na viabilidade e morfologia de pólen do milho MON 87411 em comparação ao milho controle convencional. O experimento foi conduzido em casa de vegetação e laboratório na Estação Experimental em Santa Cruz das Palmeiras, SP, de julho a outubro de 2014. Os resultados de viabilidade e morfologia de grãos de pólen coletados nas parcelas com o milho MON 87411 foram comparados aos resultados obtidos nas parcelas com o milho controle convencional. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do teste t para a comparação das médias do milho MON 87411 em relação ao milho controle convencional, ao nível de significância de 5%. Os dados indicam que o milho MON 87411 não difere consistentemente do milho controle convencional quanto à viabilidade e à morfologia dos grãos de pólen.

A avaliação de danos ocasionados por artrópodes, mais especificamente lepidópteros, foi realizada nos seis locais em diferentes fases da cultura do milho e em relação aos danos em folhas realizada no intervalo entre V9-V10 não foram encontradas diferenças significativas. A avaliação de dano em espigas foi realizada no intervalo entre R5-R6 e o milho MON 87411 foi significativamente inferior em relação ao milho controle convencional (1,89 vs. 3,26 cm²). A avaliação do dano em colmos foi realizada no estágio de maturação fisiológica no momento de coleta de grãos para avaliação de rendimento e diferenças significativas não foram encontradas.

Para se obter informações sobre possíveis alterações na germinação e no vigor de grãos amostrados de parcelas cultivadas com o milho MON 87411 em comparação ao milho controle convencional, foram coletados grãos em cinco experimentos. As amostras de grãos foram coletadas no estágio vegetativo R6 e enviadas para análise. O experimento foi conduzido de maio a junho de 2014. Os resultados de germinação e vigor dos grãos coletados nas parcelas com o milho MON 87411 foram comparados aos resultados obtidos nas parcelas com o milho

controle convencional. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do teste t para a comparação das médias do milho MON 87411 com as médias do milho controle convencional, ao nível de significância de 5%. Os dados indicam que o milho MON 87411 não difere consistentemente do milho controle convencional quanto à germinação e vigor dos grãos recém colhidos. Dessa forma, conclui-se que as variações na taxa de germinação e vigor são naturais e não influenciadas pela modificação genética e pela presença das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS, e do dsRNA DvSnf7 no milho MON 87411.

Para avaliar o potencial do milho MON 87411 como planta daninha e em particular como planta invasora foram coletados dados nos seis experimentos conduzidos no Brasil. As amostras de grãos foram coletadas no estádio vegetativo R6 e enviadas para a Estação Experimental localizada em Sorriso, MT, onde foram semeadas em vasos contendo solo agrícola e mantidas sob condições controladas de casa de vegetação por 90 dias. Os dados obtidos de plantas emergidas ou germinadas, avaliadas a cada 15 dias, das amostras oriundas do milho MON 87411 foram comparados aos dados do milho controle convencional por local. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do teste t ($p \leq 0,05$) para a comparação das médias do milho MON 87411 em relação às médias do milho controle convencional. Os resultados demonstraram que o percentual de plantas emergidas ou germinadas do milho MON 87411 não difere do milho controle convencional. Dessa forma, conclui-se que as variações no percentual de plantas emergidas ou germinadas são naturais e não influenciadas pela modificação genética e pela presença das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS e do dsRNA DvSnf7 no milho MON 87411.

Os experimentos de campo foram instalados em seis regiões no Brasil no delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições em cada local. Os tratamentos testados foram o milho MON 874211 e seu controle convencional e 7 híbridos designados como referências comerciais. Nenhuma referência é feita sobre as análises estatísticas realizadas. Por exemplo, se as suposições da análise de variância ou do teste t foram avaliadas. No caso da análise de variância e do teste t não pareado, desvios das suposições podem ocasionar o erro tipo II, ou seja, aceita-se a hipótese nula de que não há diferença entre o milho convencional e o milho geneticamente modificado, mas esta hipótese pode ser falsa.

Sobre o teste t, não é apresentado o tipo de teste, se pareado ou não pareado e se as suposições estão satisfeitas. Ainda, os testes t e F são utilizados indistintamente sem apresentar uma justificativa. Por exemplo, na Tabela V-34 é utilizado o teste F (ANOVA) e nas Tabelas V-29 e V-30 o teste t, para o mesmo experimento, com mudanças nas variáveis. Para comparação entre os milhos convencional e MON 87411 dentro de cada local, o número de repetições (4) é muito baixo, pois vai fornecer um número de graus de liberdade para o resíduo inferior a 10, como tecnicamente recomendado. Baixo número de graus de liberdade pode também ocasionar o erro tipo II já mencionado anteriormente (Ver Tabela V-36, por exemplo). Ainda, experimento realizado nos Estados Unidos para comparar a abundância de Artrópodes em nove locais e entre os dois milhos (convencional e MON 87411) não mostra os resultados dos testes estatísticos realizados.

VI – Avaliação de risco à saúde humana e animal (Anexo III da RN 5)

No Brasil, o milho é a segunda cultura produtora de grãos mais plantada, atrás apenas da soja. A produção total no Brasil na safra 2014/2015 foi de pouco mais de 84 milhões de toneladas (CONAB, 2015b). A expectativa para a safra de 2015/2016 é de queda na produção de pouco mais de 1% por conta do aumento da área plantada com soja. Apesar de ser uma das principais matérias-primas de vários pratos culinários, a maior parte da sua produção é utilizada na alimentação animal, tendo importância indireta na nutrição humana pelo consumo de diversos tipos de carne (bovina, suína, aves e peixes). A produção de ração consome a maior parte do milho, seguido do consumo para fins industriais e consumo na alimentação humana, conforme dados publicados em 2015 pela Abimilho (Céleres/SECEX). Cerca de 31 % do milho produzido no Brasil é exportado. O consumo animal chega a 53%, o consumo industrial (indústrias de papel e papelão, fluidos hidráulicos, adesivos, plásticos, etc.) é de 9%, o consumo humano de 2% e outros usos de 5% todo total produzido.

Efeitos adversos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão do milho MON 87411 e seus derivados não são esperados com base na avaliação da segurança alimentar tanto da planta, quanto das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS, e da sequência repetida dsRNA DvSnf7 nele expressas. A seguir são apresentados os principais resultados que permitem estabelecer conclusões sobre a segurança alimentar do milho MON87411, das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS, e da sequência repetida dsRNA DvSnf7.

O organismo doador do gene *cry3Bb1*, *Bacillus thuringiensis*, tem sido comercialmente utilizado há mais de 50 anos para produzir formulações derivadas das bactérias com atividades inseticidas. A baixa toxicidade dos produtos baseados em *B. thuringiensis* para mamíferos tem sido demonstrada em numerosos estudos de segurança. Além disso, reações alérgicas a proteínas Cry não foram confirmadas em aplicações de produtos microbianos derivados dessa bactéria durante cinco décadas de uso.

Todos os tipos de alimento derivados do milho MON 87411 que podem ser usados foram considerados na estimativa do potencial de exposição às proteínas CP4 EPSPS e Cry3Bb1. As estimativas de exposição aguda foram conduzidas usando o *Dietary Exposure Evaluation Model - Food Commodity Intake Database* (DEEM-FCID versão 3.16, 03-08-d2.03, <http://www.epa.gov/pesticides/science/deem/>). O DEEMFCID, um sistema de análise de exposição baseado em *software* para realizar avaliações de exposição dietária crônica desenvolvido pela U.S. EPA e utilizou os dados de consumo da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) cujo levantamento foi conduzido nos Estados Unidos em 2003-2008.

As exposições humanas estimadas à Cry3Bb1 e à CP4 EPSPS do milho MON 87411 nos Estados Unidos foram consideradas usando o pior cenário razoável da estimativa do consumo estimado agudo do 95º. percentil estimado na base “*eater-only*”. O DEEM-FCID separa o milho em seis frações: farinha, ração, cereal, amido, óleo e melado (*syrup*). Entretanto, óleo foi excluído da análise, pois essa fração purificada (óleo refinado) é desprovida de proteínas e não se espera que contenha quantidades significativas das proteínas Cry3Bb1 ou CP4 EPSPS (Martín-Hernández *et al.*, 2008). Por essa mesma razão, melado (*syrup*) foi também excluído dessa análise.

As MOEs (Margin of Exposure) para ingestão dietária aguda das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS foram estimadas como sendo $2,7 \times 10^5$ e $1,6 \times 10^5$ mg/kg, respectivamente, para a população americana em geral. Para crianças pós-desmame, a subpopulação mais altamente

exposta, as MOEs para ingestão dietária aguda das proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS foram estimadas como sendo $1,1 \times 10^5$ e $6,9 \times 10^4$, respectivamente. Esses valores muito altos indicam que não existem riscos significativos à saúde humana derivados da exposição dietária às proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS derivadas do milho MON 87411.

Existem vários processos usados para o processamento de milho usado na alimentação humana, incluindo tratamentos com altas temperaturas, hidrólise, encharcamento com água levemente ácida e secagem. Alterações na temperatura, pH e disrupções físicas associadas ao processamento de alimentos e cozimento/preparação geralmente levam à perda da estrutura e da funcionalidade da proteína (Hammond e Jez, 2011). Como outras proteínas, as proteínas Cry3Bb1 e CP4 EPSPS do milho MON 87411 são lábeis a altas temperaturas, como evidenciado pela perda de suas atividades funcionais (Hernan *et al.*, 2011a; Hernan *et al.*, 2011b), e espera-se serem similarmente suscetíveis à desnaturação quando expostas a pH extremos e aos ambientes digestivos encontrados durante o processamento e o cozimento dos alimentos contendo o milho MON 87411.

Para a avaliação de segurança do dsRNA DvSnf7 considerou-se o peso da evidencia do uso seguro do RNA, exposição muito baixa ao dsRNA DvSnf7 específico e a falta de toxicidade oral de ácidos nucleicos. Exposições desprezíveis e falta de toxicidade oral de RNA em organismos superiores indicam que não haveria riscos significativos para a saúde humana e animal associados ao consumo do dsRNA DvSnf7 presente em produtos alimentares derivados do milho MON 87411.

Humanos consomem regularmente plantas que contêm pequenos RNAs. Pesquisas demonstram que muitos RNAs de plantas compartilham sequências com genes humanos (Ivashuta *et al.*, 2009). Outros estudos subsequentes a este trabalho demonstraram que não só pequenos RNAs, mas também longos dsRNAs em plantas compartilham identidade de sequência com transcritos humanos (Jensen *et al.*, 2013). Ainda, humanos regularmente consomem alimentos derivados de animais que provavelmente contêm mais miRNAs (micro RNA) de animais que possuem 100% de identidade a genes humanos do que miRNAs de plantas. Apesar dessa ingestão rotineira de pequenos RNAs de plantas e animais, impactos à saúde humana não foram reportados. Um relatório recente (Witwer *et al.*, 2013) mostra a condução de um estudo de alimentação em primatas não humanos, com uma fonte alimentar rica em miRNA e, com base nos resultados do grupo, concluiu-se que “há pouca evidência da presença desses miRNAs de planta no sangue de primatas não humanos antes ou em seguida à ingestão dietária de uma ‘substância’ de planta rica em miRNA”.

VII - Avaliação de risco ao meio ambiente (Anexo IV da RN 5).

Para as proteínas Cry testadas em ensaios de laboratório até o momento, efeitos adversos significativos foram observados em poucas espécies de organismos não alvo que têm relação próxima com as espécies alvo (Mendelsohn *et al.*, 2003; Romeis *et al.*, 2006b). Entretanto, estudos de campo com culturas resistentes a insetos que produzem vários tipos de proteínas Cry demonstraram que elas não causam efeitos adversos sobre a biodiversidade, as populações de inimigos naturais testadas e outros insetos não alvo ecologicamente importantes (Bhatti *et al.*, 2005a; Bhatti *et al.*, 2005b; Bitzer *et al.*, 2005; Daly e Buntin, 2005; Dively, 2005; Head *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2005; Lozzia *et al.*, 1998; Naranjo *et al.*, 2005; Naranjo, 2005a; Naranjo,

2005b; Orr e Landis, 1997; Pilcher *et al.*, 1997; Pilcher *et al.*, 2005; Torres e Ruberson, 2005; Whitehouse *et al.*, 2005; Wolfenbarger *et al.*, 2008).

O milho MON 87411 expressa também um transcrito primário de 968 nucleotídeos (nt) denominado dsRNA DvSnf7. Estudos foram realizados para a avaliação quantitativa de risco ecológico utilizando um dsRNA DvSnf7 de 968 nt sintetizado *in vitro* (conhecido como dsRNA DvSnf7_968), o mesmo expresso no milho MON 87411. Foi conduzida uma avaliação da toxicidade potencial para organismos não alvo selecionados a níveis de exposição no campo. A avaliação de perigo incluiu testes de toxicidade contra um decompositor do solo (minhoca [*Eisenia andrei*]) e cinco espécies de insetos benéficos (abelha [*Apis mellifera*], vespa parasitoide [*Pediobius foveolatus*], joaninha [*Coleomegilla maculata*], besouro carábido [*Poecilus chalcites*] e percevejo [*Orius insidiosus*]). Todos os estudos foram conduzidos usando o dsRNA DvSnf7_968 produzido *in vitro* como substância teste. Com a exceção do estudo com minhoca, todos os demais estudos que utilizaram a substância teste produzida *in vitro* incluíram uma análise de dieta usando um inseto sensível (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) para confirmar que o dsRNA DvSnf7_968 presente na substância teste era biologicamente ativo e tinha o nível esperado de atividade biológica.

Adicionalmente, quando apropriado e com base na matriz da dieta, a homogeneidade do material teste e a estabilidade da substância teste dsRNA DvSnf7_968 foram também confirmadas durante o período de armazenamento. Uma confirmação de dose não foi realizada para o estudo com minhoca devido à rápida degradação do RNA na matriz do solo. As concentrações de efeito não observado (NOECs), determinadas para cada um dos testes utilizados na avaliação do risco para organismos não alvo no caso do milho MON 87411, são superiores a 30 vezes as concentrações ambientais máximas esperadas (MEECs). As observações da abundância de artrópodes não alvo em área plantada experimentalmente com o milho MON 87411 demonstram que este não difere consistentemente do milho controle convencional e as diferenças significativas encontradas foram pontuais e não representam características que constituem potenciais riscos ambientais, potencial aumento da persistência da cultura como planta daninha ou, ainda, risco de transferência dessa característica para a população convencional ou espécies sexualmente compatíveis. Baseado nessas informações, conclui-se que o milho MON 87411 é tão seguro quanto o milho controle convencional para organismos não alvo.

Os resultados da análise das amostras das áreas de Dourados (MS) e Campo Verde (MT) quanto à frequência do fluxo do gene *cry1Ab* do milho MON 810 para o milho convencional, em função das distâncias entre as plantas, mostram que o fluxo gênico foi decrescente em função da distância da fonte de pólen. A ocorrência de grãos de milho expressando a proteína Cry1Ab foi maior na área de Dourados, atingindo 3,03% na distância de 10 metros e 2,00% a 20 metros. Nas distâncias de 50 e 100 metros não foram constatados grãos de milho que expressassem a proteína Cry1Ab. Na área de Campo Verde, constatou-se 0,25% de grãos expressando Cry1Ab na distância de 10 metros e nenhum grão expressando a proteína nas demais distâncias. Os resultados obtidos na safra 2008/2009 estão coerentes com a literatura, pois evidenciam significativa redução na frequência do fluxo gênico entre plantas de milho em distâncias acima de 20 metros da fonte de pólen, o que resulta em baixa frequência de disseminação do gene *cry1Ab*.

A CTNBio aprovou em 16/08/2007 a Resolução Normativa (RN) no. 04 (publicada no D.O.U. Seção 1, página 19, 23/08/2007), a qual “dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado, visando à coexistência entre os sistemas de produção”. Essa RN estabelece “as distâncias mínimas de isolamento a serem observadas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e cultivos de milho não geneticamente modificado, para permitir a coexistência entre os diferentes sistemas de produção no campo”.

A RN 04 dispõe ainda que “para permitir a coexistência, a distância entre uma lavoura comercial de milho geneticamente modificado e outra de milho não geneticamente modificado, localizada em área vizinha, deve ser igual ou superior a 100 (cem) metros ou, alternativamente, 20 (vinte) metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, 10 (dez) fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho geneticamente modificado”. Ou seja, o isolamento aprovado pela RN 04 entre os plantios de milho geneticamente modificado e o milho convencional é suficiente e conservador no sentido de atingir o limiar estabelecido no país, tomando-se como base todo o conhecimento gerado sobre coexistência e referido nessa questão.

VIII – Plano de monitoramento pós liberação comercial (RN 9).

Com relação ao plano de monitoramento pós-liberação comercial a CTNBio determina que sejam seguidas as instruções e executadas as ações técnicas de monitoramento constante na Resolução Normativa 09 da CTNBio de 02 de dezembro de 2011.

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”.

PARECER:

Considerando que os dados e as informações apresentados nesta solicitação atendem os itens presentes na Resolução Normativa Nº 05, de 12/03/2008, e demonstram que o milho MON87411 não possui maior potencial para se tornar uma planta daninha e que seu cultivo não apresenta qualquer impacto ambiental adverso quando comparado com o cultivo de milho convencional, é meu parecer que esta solicitação seja deferida.

Data: 31/08/2016

Hilton Thadeu Zarate do Couto

Marcos Antonio Machado

Membros da CTNBio

BIBLIOGRAFIA

- Abimilho. 2015. www.abimilho.com.br.
- Bachman, P.M., Bolognesi, R., Moar, W.J., Mueller, G.M., Paradise, M.S., Ramaseshadri, P., Tan, J., Uffman, J.P., Warren, J., Wiggins, B.E. e Levine, S.L. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a doublestrandedRNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Transgenic Research 22: 1207-1222.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. e Roberts, J. 2007a. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nature Biotechnology 25: 1322-1326.
- Bhatti, M.A., Duan, J., Head, G.P., Jiang, C., McKee, M.J., Nickson, T.E., Pilcher, C.L. e Pilcher, C.D. 2005a. Field evaluation of the impact of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-protected Bt corn on foliage-dwelling arthropods. Environmental Entomology 34: 1336-1345.
- Bhatti, M.A., Duan, J., Head, G.P., Jiang, C., McKee, M.J., Nickson, T.E., Pilcher, C.L. e Pilcher, C.D. 2005b. Field evaluation of the impact of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-protected Bt corn on ground-dwelling invertebrates. Environmental Entomology 34: 1325-1335.
- Bosnic, A.C. e Swanton, C.J. 1997. Influence of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) time of emergence and density on corn (*Zea mays*). Weed Science 45: 276-282.
- CONAB. 2015a. Perspectivas para a Agropecuária. Vol. 3 Safra 2015/2016 – Produtos de Verão. p. 1-130, set 2015. Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília, DF, Brasil.

- CONAB. 2015b. Indicadores da Agropecuária. Brasília, Ano XXIV, no. 10, out. 2015, p. 01-104.
- Crickmore, N. 2012. List of *Bacillus thuringiensis* holotype toxins. University of Sussex, Sussex, United Kingdom.
- Daly, T. e Buntin, G.D. 2005. Effect of *Bacillus thuringiensis* Transgenic Corn for Lepidopteran Control on Nontarget Arthropods. *Environ. Entomol.* 34: 1292-1301.
- Della Vedova, C.B., Lorbiecke, R., Kirsch, H., Schulte, M.B., Scheets, K., Borchert, L.M., Scheffler, B.E., Wienand, U., Cone, K.C. e Birchler, J.A. 2005. The dominant inhibitory chalcone synthase allele *C2-Idf (Inhibitor diffuse)* from *Zea mays* (L.) acts via an endogenous RNA silencing mechanism. *Genetics* 170: 1989-2002. Parrott, W., Chassy, B., Ligon, J., Meyer, L., Petrick, J., Zhou, J., Herman, R., Delaney, B. e Levine, M. 2010. Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1773-1790.
- Dively, G.P. 2005. Impact of transgenic VIP3A × Cry1Ab Lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. *Environmental Entomology* 34: 1267-1291.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 015;13(11):4302, 107 pp.
- English, L. e Slatin, S.L. 1992. Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: A comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22: 1-7.
- Fausay, J.C., Kells, J.J., Swinton, S.M. e Renner, K.A. 1997. Giant foxtail interference in non-irrigated corn. *Weed Sci.* 45:256-260.
- Hammond, B.G. e Jez, J.M. 2011. Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops. *Food and Chemical Toxicology* 49: 711-721.
- Haslam, E. 1993. Shikimic acid: metabolism and metabolites. University of Sheffield, UK.
- Hernan, R., Chen, B., Bell, E. e Finnessy, J. 2011a. Amended Report for MSL0022432: Effect of Temperature Treatment on the Functional Activity of CP4 EPSPS. St. Louis, Missouri.
- Head, G., Moar, W., Eubanks, M., Freeman, B., Ruberson, J., Hagerty, A. e Turnipseed, S. 2005. A multiyear, large-scale comparison of arthropod populations on commercially managed Bt and non-Bt cotton fields. *Environmental Entomology* 34: 1257-1266.
- Hernan, R., Heeren, R., Mueller, G., Uffman, J.P. e Finnessy, J. 2011b. The Effect of Heat Treatment on Cry3Bb1 Functional Activity. St. Louis, Missouri.
- Höfte, H. e Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53: 242-255.
- Ivashuta, S.I., Petrick, J.S., Heisel, S.E., Zhang, Y., Guo, L., Reynolds, T.L., Rice, J.F., Allen, E. e Roberts, J.K. 2009. Endogenous small RNAs in grain: Semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. *Food and Chemical Toxicology* 47: 353-360.
- Jensen, P.D., Zhang, Y., Wiggins, B.E., Petrick, J.S., Zhu, J., Kerstetter, R.A., Heck, G.R. e Ivashuta, S.I. 2013. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA

- transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food* 4: 90-97.
- Knake, E.L., Miller, J.F., Strand, O.E. e Doll, J.D. 1990. Annual grass weeds in corn. National Corn Handbook. Michigan State University, East Lansing, Michigan.
- Lopez, M.D., Prasifka, J.R., Bruck, D.J. e Lewis, L.C. 2005. Utility of ground beetle species in field tests of potential nontarget effects of Bt crops. *Environmental Entomology* 34: 1317-1324.
- Lozzia, G., Furlanis, C., Manachini, B. e Rigamonti, L. 1998. Effects of Bt corn on *Rhopalosiphum padi* L. (Rhynchota Aphididae) and on its predator *Chrysoperla carnea* Stephen (Neuroptera Chrysopidae). *Boll. Zool. Agraria Bachicol.* 30: 153-164.
- Martín-Hernández, C., Bénet, S. e Obert, L. 2008. Determination of proteins in refined and nonrefined oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 4348-4351.
- Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z. e Matthews, K. 2003. Are Bt crops safe? *Nature Biotechnology* 21: 1003-1009.
- Naranjo, S., Head, G. e Dively, G. 2005. Special section introduction: field studies assessing arthropod non-target effects in Bt transgenic crops. *Environmental Entomology* 34: 1178-1180.
- Naranjo, S.E. 2005a. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environmental Entomology* 34: 1193-1210.
- Naranjo, S.E. 2005b. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the function of the natural enemy community. *Environmental Entomology* 34: 1211-1223.
- Orr, D.R. e Landis, D.A. 1997. Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *J. Econ. Entomol.* 90: 905-909.
- Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M. e Fraley, R.T. 1996. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. In: Duke, S. O., editor *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. p. 53-84.
- Petrick, J.S., Brower-Toland, B., Jackson, A.L. e Kier, L.D. 2013. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: A scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66: 167-176.
- Pilcher, C.D., Obrycki, J.J., Rice, M.E. e Lewis, L.C. 1997. Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environmental Entomology* 26: 446-454.
- Pilcher, C.D., Rice, M.E. e Obrycki, J.J. 2005. Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five nontarget arthropods. *Environmental Entomology* 34: 1302-1316.
- Romeis, J., Meissle, M. e Bigler, F. 2006b. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.

- Steinrücken, H.C. e Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C.I., Aymeric, J., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalier, F., Collinge, D.P., Crava, C.M., de Maagd, R.A., Duvic, B., Erlandson, M., Faye, I., Felföldi, G., Fujiwara, H., Futahashi, R., Gandhe, A.S., Gatehouse, H.S., Gatehouse, L.N., Giebultowicz, J.M., Gómez, I., Grimmerlikhuijzen, C.J.P., Groot, A.T., Hauser, F., Heckel, D.G., Hegedus, D.D., Hrycaj, S., Huang, L., Hull, J.J., Iatrou, K., Iga, M., Kanost, M.R., Kotwica, J., Li, C., Li, J., Liu, J., Lundmark, M., Matsumoto, S., Meyering-Vos, M., Millichap, P.J., Monteiro, A., Mrinal, N., Niimi, T., Nowara, D., Ohnishi, A., Oostra, V., Ozaki, K., Papakonstantinou, M., Popadic, A., Rajam, M.V., Saenko, S., Simpson, R.M., Soberón, M., Strand, M.R., Tomita, S., Toprak, U., Wang, P., Wee, C.W., Whyard, S., Zhang, W., Nagaraju, J., French-Constant, R.H., Herrero, S., Gordon, K., Swevers, L. e Smagghe, G. 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology* 57: 231-245.
- Torres, J.B. e Ruberson, J.R. 2005. Canopy- and ground-dwelling predatory arthropods in commercial Bt and non-Bt cotton fields: patterns and mechanisms. *Environ. Entomol.* 34: 1242-1256.
- Tuteja, J.H., Clough, S.J., Chan, W.-C. e Vodkin, L.O. 2004. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *The Plant Cell* 16: 819-835.
- Vachon, V., Laprade, R. e Schwartz, J.-L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 1-12.
- Whitehouse, M.E.A., Wilson, L.J. e Fitt, G.P. 2005. A comparison of arthropod communities in transgenic Bt and conventional cotton in Australia. *Environ. Entomol.* 34: 1224-1241.
- Whyard, S., Singh, A.D. e Wong, S. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 824-832. doi:DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.09.007.
- Witwer, K.W., McAlexander, M.C., Quenn, S.E. e Adams, R.J. 2013. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: Limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA Biology* 10: 1080-1086.
- Wolfenbarger, L.L., Naranjo, S.E., Lundgren, J.G., Bitzer, R.J. e Watrud, L.S. 2008. Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *PLoS ONE* 3: e2118.

Assessoria: Norma Paes