

**Parecer sobre Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado.**

**Processo:** 01200.002109/2000-04  
**Data de Submissão:** 30 de Junho de 2000.  
**Empresa Proponente:** SYNGENTA SEEDS LTDA (processo submetido à época pela Novartis Seeds Ltda).  
**Característica Introduzida:** Resistência à insetos [gene cryIA(b)] e ao Herbicida Glufosinato de Amônia [gene pat]  
**Nome do Evento:** Bt11  
**Nome Comercial do Evento:** Milho Bt11.

**PARECER APRESENTADO EM 18 DE JULHO, 2007.**

A empresa SYNGENTA SEEDS LTDA solicita a CTNBio parecer técnico conclusivo sobre a liberação comercial de Milho Geneticamente Modificado (MGM) com características que conferem resistência, na mesma planta, à insetos e ao herbicida glufosinato de amônia. Os genes introduzidos codificam para uma forma truncada da proteína inseticida Bt, obtida da cepa HD-1 da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis var. kurstaki (BtK)*, nominada de Btk, e para uma enzima (fosfotricina-N-acetil transferase, PAT) que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônia (L-Fosfotricina, PPT - *Phosphinothricin*), também obtida de uma bactéria de solo, *Streptomyces viridochromogenes*.

O gene Btk é uma versão sintética e modificada do gene de cadeia completa cryIA(b). As modificações do gene cryIA(b) incluíram truncar e mudar seqüências de DNA, destinadas a realçar a expressão em plantas. As modificações não resultaram em nenhuma mudança de seqüência de aminoácidos na proteína codificada pelo gene cryIA(b) segundo apresenta a proponente (Vol.1, seção C, figura 2). O gene introduzido que confere resistência ao herbicida PPT é uma versão sintética do gene *pat* que codifica a enzima PAT obtida da bactéria *S.viridochromogenes* pertencente à família *Actinomycetaceae* (Vol.1, seção C, figura 3).

A delta-endotoxina inseticida Btk truncada expressa na planta de milho do evento Bt11 é clivada proteoliticamente no intestino alcalino dos insetos lepidópteros, resultando numa forma inseticida ativa. A proteína inseticida ativa interage com uma molécula receptora presente somente nas células do epitélio do intestino médio dos insetos suscetíveis, gerando poros nas membranas das células. O processo causa



distúrbio no equilíbrio celular promovendo a diálise das células do intestino dos insetos levando-os a morte (Entwistle et al. 1993). Estudos recentes, entretanto, identificaram que o que pode estar ocorrendo na verdade para causar a morte dos insetos é que a presença de poros no epitélio intestinal dos insetos promove a passagem de bactérias presentes no intestino médio para a hemolinfa levando o inseto a morte por infecção generalizada (Broderick et al., 2006).

O gene *pat* confere resistência através da acetilação (*introdução de grupo acetil – CH<sub>3</sub>CO em molécula orgânica contendo grupos hidroxila – OH ou amônia – NH<sub>2</sub>*) do PPT, utilizando como co-fator acetil-coenzima A, fazendo com que o PPT perca a ação inibidora. O Glufosinato de Amônia (PPT) é um princípio ativo herbicida que age como inibidor competitivo da enzima glutamina sintetase, promovendo acúmulo de amônio e a morte de células (Dekeyser et al., 1989; Wilmink & Dons, 1993; Lilge et al., 2003).

Não fica claro nas informações apresentadas no processo qual foi o método de transformação utilizado para a introdução das construções gênicas no evento comercial Bt11. É dito que: “a transformação inicial da linhagem de milho parental foi conseguida pela inserção de parte do plasmídeo pZO1502, contendo a fusão do gene *Btk* e a fusão do gene *Pat*, no genoma do milho”. A descrição do plasmídeo utilizado na transformação é apresentada no processo (Vol.1, seção C, figura 1). Para uma melhor análise do processo a informação de qual método de transformação utilizado é chave, tendo-se em vista que processos como biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens*, que estão entre os mais utilizados, apresentam características de inserção bem distintas, o que pode influenciar aspectos relacionados à biossegurança do evento (Zhao et al., 2002; Fu et al., 2000). Uma análise mais detalhada do plasmídeo pZO1502 e seus elementos gênicos demonstra a inexistência de seqüências referentes a Borda Esquerda e Borda Direita que flanqueiam regiões de T-DNA presentes em sistemas binários de transformação por *A.tumefaciens* (Gelvin, 2003; Paz et al., 2004). Isso nos leva a conclusão de que este sistema não foi utilizado. Fica a dúvida então de qual sistema de transformação foi utilizado.

No item 5.2 (Vol.1, Seção C) do processo é afirmado que o plasmídeo pZO1502 foi tratado com endonucleases visando a retirada do gene *ampR*, que confere resistência ao antibiótico ampicilina, e de que “esta mistura de fragmentos de DNA foi então usada



para transformar o tecido de milho". A mistura a que se refere a empresa proponente, na frase grifada acima, aparentemente diz respeito aos seguintes fragmentos utilizados na transformação, presentes numa fita única de DNA (~ 6.120 pb) resultante da digestão do plasmídeo pZO1502 para exclusão do gene *ampR*:

Fragmentos utilizados na transformação do milho evento Bt11:

- 1) Fusão do gene *pat*: promotor 35S + intron IVS2 + região codante da proteína PAT + seqüência terminadora, nos 3';
- 2) Fusão do gene *Btk*: promotor 35S + intron IVS6 + região codante da proteína Btk HD-1, (*cryIA(b)*) + seqüência terminadora, nos 3';
- 3) Seqüência de DNA de 1.400 pb, incluindo uma origem de replicação (*ori*) de DNA plasmidial em bactérias;
- 4) Seqüências de DNA sintético, totalizando cerca de 120 pb e contendo sítios de restrição utilizado na montagem do vetor.

O processo de transformação utilizado, qualquer que tenha sido ocasionou a inserção de uma única cópia do fragmento de DNA contendo as construções descritas nos itens 1) e 2) acima. Essa informação foi comprovada por uso de *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ou seja, uso de sondas marcadas específicas para os elementos em análise e combinações de corte do genoma do evento Bt11 por enzimas de restrição, que estão apresentados no Apêndice 4, Seção C do volume 1 do processo. Os mesmos procedimentos foram utilizados para a comprovação da não integração do gene *ampR* ao genoma do evento Bt11 (Vol.1, Seção C, Apêndice 1).

Já a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para confirmar que a região de replicação plasmidial do vetor pZO1502 também esta integrada no genoma do evento Bt11 (item 5.2.1.3, vol.1, Seção C).

O uso de genética clássica demonstra que o inserto contendo os genes *Btk* e *pat* no evento Bt11 é herdado como um único locus dominante simples, sendo que autofecundações de indivíduos heterozigotos não produziram indivíduos recombinantes confirmando a estreita ligação entre os dois genes na construção utilizada na transformação, assim como também demonstra a estabilidade do evento Bt11 (Vol.1, Seção C, Apêndice 6).

Apesar da caracterização molecular por *RFLPs* demonstrar a existência de um único locus com as seqüências responsáveis pela expressão dos genes *Btk* e *pat* no evento Bt11, a localização exata, do sítio do inserto no genoma do evento Bt11 pela



mesma técnica, não é tão precisa. No Apêndice 7 (Vol.1, Seção C) a empresa proponente afirma através de resultados de RFLP que o sítio de inserção fica no cromossomo 8 do milho, próximo à posição 117 e num intervalo de 15 cM compreendido pelos dois marcadores Z1B3 e UMC150a (Lu e Bernardo, 2003). Para uma liberação comercial, acredito esta caracterização não ser suficiente para uma identificação eficiente e rápida do evento Bt11 como um evento único de transformação. A importância do fornecimento exato do local do inserto no genoma transformado, caracterizando principalmente as seqüências gênicas que flanqueiam o local de inserto podem ser evidenciados pelos seguintes acontecimentos:

Em abril de 2005, a Comunidade Européia (CE) consultou o governo americano e a empresa proponente através do documento IP/05/382 - *Commission seeks clarification on Bt10 from US authorities and Syngenta* ([http://gmo-crl.jrc.it/doc/BT10\\_EUROPA-PressRelease-clarification.pdf](http://gmo-crl.jrc.it/doc/BT10_EUROPA-PressRelease-clarification.pdf)). Em importações de milhos feitas pela CE foram detectadas misturas de milho do evento Bt11 com uma linhagem “irmã”, Bt10, transformada com as mesmas construções utilizadas na transformação do evento Bt11. Sendo o evento Bt10, entretanto, um evento não autorizado para comercialização. Situação semelhante ocorreu nos EUA com o Arroz Liberty Link, evento LL62, onde traços da linhagem irmã, LL601, não autorizada para uso comercial, foi detectada no mercado americano, levando a CE, através do documento - *Commission Decision 2006/578/EC* (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006>), a estipular o uso de metodologias de detecção que permitam separar os eventos entre si.

Portanto, numa liberação comercial, para que possa ser possível a separação entre eventos produzidos com as mesmas construções gênicas é necessário que a empresa proponente apresente o local exato do inserto, com as seqüências do genoma do milho que franqueiam o ponto exato da inserção dos cassetes de expressão. Assim, com o uso de técnicas convencionais de PCR será possível separar dois eventos diferentes, ou com o uso de PCR em Tempo Real, será possível, inclusive, quantificar o percentual exato de cada evento em uma amostra. Estas informações são importantes também para implementação do Decreto Federal nº 4680, de 24 de abril de 2003, que regulamenta a rotulagem de alimentos no Brasil.

Assim, tendo em vista o comentado acima, a empresa proponente deverá apresentar a CTNBio informações e dados técnicos que permitam identificar a região



exata do genoma do evento Bt11 onde os elementos gênicos que codificam para o gene *Btk* e *pat* foram inseridos, apresentando as seqüências que flanqueiam este local. A empresa também deve informar seqüências de primers de PCR que produzam amplicons que contenham ambas as regiões, ou seja, parte da seqüência do inserto e parte da seqüência genômica do milho que flanqueie o inserto.

A localização do inserto no genoma de uma planta transformada pode influenciar diretamente os níveis de expressão de uma ou mais características (Loc et al., 2002; Latham et al., 2006). Entretanto, na análise de risco, a caracterização molecular deve ser considerada levando-se também em conta estudos relacionados à caracterização composicional, agronômica e fisiológica do evento em estudo. A longa experiência com métodos tradicionais de melhoramento de plantas, a experiência de mais de três décadas em pesquisa e mais de uma década em comercialização de variedades transgênicas no mundo, além do avanço no conhecimento sobre a estrutura e a dinâmica dos genomas, indicando se um determinado gene ou característica é seguro, sinalizam que o processo de engenharia genética por si só, apresenta pouco potencial para o surgimento de conseqüências inesperadas que não seriam identificadas ou eliminadas durante o processo de desenvolvimento de variedades comerciais GM (Bradford et al, 2005). As autorizações em todos os países que comercializam Plantas Geneticamente Modificadas (PGM), são por evento de transformação (Agbios, 2007), mas sempre a caracterização fenotípica conforme comentado acima deve ser levada em conta na análise de risco considerada sendo a caracterização molecular apenas mais um fator levado em consideração na análise.

A caracterização da expressão do gene *Btk* no evento Bt11, apresentada no processo, foi determinada por ensaios de alimentação de insetos e ensaios imunológicos (ELISA) feitos em duas localidades nos EUA (Stanton, MN; Joseph, IL). Os dados mostrados no Apêndice 8 do processo (Vol.1, Seção C) indicam os níveis da proteína *Btk* nas folhas, palhas, colmos e grãos de quatro variedades de milho protegido contra insetos. Os níveis mais altos foram encontrados nas folhas, variando de 27 a 33 µg de proteína *Btk/g* de peso fresco. Em outros tecidos os níveis observados são significativamente mais baixos de proteína *Btk*, com a palha variando de 3.9 a 5.6 µg/g, o colmo de 2.2 a 3.0 µg/g e grãos de 4.2 a 5.0 µg/g.



A expressão da enzima fosfotricina acetil transferase (PAT) foi analisada por ensaio imunológico quanto ao seu teor da proteína PAT (Vol.1, Apêndice 9). Este estudo demonstrou que os níveis da proteína PAT encontrados em amostras de folhas, estilo-estigma feminino, e pendão masculino no milho Bt11 vão da ordem de 44 ng, 3.4 ng, e 26 ng de proteína PAT /g de tecido, respectivamente. O ensaio imunológico não foi capaz de detectar a proteína PAT no colmo, raízes, pólen ou grãos do evento Bt11, dentro dos limites de detecção para o tecido em particular analisado. Os limites de detecção são os seguintes: colmo, 5.5 ng, raízes 5.2 ng, pólen 183 ng e grãos, 80 ng de proteína PAT/g de tecido.

Não foram apresentados no processo resultados obtidos no Brasil em relação aos níveis de expressão das proteínas *Btk* ou *pat*. Entretanto, o evento Bt11 tem sido testado a campo desde 1992 no EUA e plantado comercialmente em condições de campo nos EUA (1996), Canadá (1996), Japão (1996), África do Sul (2003), Filipinas (2005), Argentina (2001) e Uruguai (2004), onde a comparação entre o evento Bt11 e plantas de milhos híbridos não modificados geneticamente não identificou alterações nas características agronômicas e composicionais que estejam fora da faixa normal de variabilidade de híbridos de milho GM ou não GM produzidos no mundo (Agbios, 2007).

Em estudos de equivalência substancial, baseados em critérios moleculares e protéicos, observa-se que o único fragmento não digerido resistente à tripsina da proteína derivada do gene *Btk* expresso nas linhagens de milho Bt11 é equivalente ao fragmento resistente à tripsina da proteína de cadeia completa Cry1A(b) produzida por *E. coli* (US EPA, 1994b, MRID #43397202, MRID # 43439201).

Os estudos feitos no Brasil, e apresentados no processo, foram em relação aos efeitos do milho Bt11 no controle de insetos alvo e não-alvo feitos em Borborema, SP e Uberlândia, MG (Vol. 1, Seção F).

A introdução do cassete de expressão contendo os genes *Btk* e *pat*, assim como, os outros elementos gênicos descritos, aparentemente, não alteraram a equivalência substancial do milho Bt11, pois em relação às respostas fenotípicas e agronômicas os resultados em todos países produtores se assemelham (Brookes, G.; Barfoot, 2005, 2006; Agbios, 2007), incluindo países vizinhos ao Brasil como a Argentina e o Uruguai.



Os dados de análise de composição apresentados no Processo englobam análises de perfis de teor de proteínas, teor de óleo, teor de amido, e teor de fibras de quatro pares de iso-híbridos em cinco localidades nos EUA em 1995. Não foram apresentados dados referentes a ácidos graxos, amino ácidos, nutrientes, fitatos, vitaminas e carboidratos comparando o evento Bt11 com plantas de milho não modificadas geneticamente. Conforme registrado na secretaria executiva da CTNBio, a proponente obteve autorização para mais de 31 pedidos de liberação planejada no meio ambiente no Brasil com o evento Bt11. Entretanto, no corpo do processo nenhuma informação referente a estes estudos foram apresentados, mesmo a empresa tendo sido consultada se gostaria de atualizar as informações após o período em que esteve em litígio judicial a competência da CTNBio em analisar processos de liberação comercial de PGM. Cabe ressaltar, contudo, que durante o período algumas liberações foram impedidas devido o conflito entre a antiga lei de biossegurança e a lei ambiental, onde órgãos como o IBAMA exigiram RET e LOAP para liberações de pesquisa inviabilizando esses trabalhos. Assim, se existirem, a empresa deve incluir no processo informações referentes aos resultados obtidos na liberações planejadas de pesquisa caso tenham ocorrido no Brasil.

As plantas de milho são plantas de fecundação cruzada e polinizadas com ajuda do vento, insetos, gravidade, etc. A introdução dos elementos gênicos caracterizados no evento Bt11 não alterou as características reprodutivas da planta. Portanto, as mesmas chances de fecundação cruzada que ocorre entre híbridos e linhagens de milho não geneticamente modificadas, ocorrerá entre plantas do evento Bt11 e outras plantas de milho. No Brasil não existem espécies aparentadas do milho em dispersão natural, entretanto, existem populações crioulas de milho que podem cruzar com milhos geneticamente modificados caso seja plantadas em proximidade. Mesmo que isso ocorra, as características introduzidas no evento Bt11 não trariam conseqüências potencialmente danosas a saúde humana, animal ou ao ambiente, tendo em vista o discutido acima, e o histórico de uso seguro em outros países a mais de 10 anos (Brookes, G.; Barfoot , 2005, 2006). Também é importante lembrar que a maioria das raças indígenas, populações crioulas, cultivares antigas e recentes, assim como raças exóticas de milho são preservadas no Brasil na EMBRAPA/CENARGEN, assim como, em vários institutos de preservação de germoplasma no mundo. Caso seja liberado



comercialmente o Milho Bt11 descrito acima e caso plantios comerciais venham a ocorrer na proximidade de áreas de ocorrência de plantios de milho crioulo, raças indígenas ou milho orgânico, o estabelecimento de regras de co-existência permitirá aos produtores em uma situação ou na outra, ou seja, plantando milho geneticamente modificado ou não, que adotem medidas de isolamento espacial OU temporal recomendadas.

Tendo em vista não ser a especialidade deste parecerista, aspectos relacionados a toxicidade, alergenicidade e segurança alimentar do evento Bt11, não foram discutidas neste parecer em detalhe, pois foram discutidas por especialistas em saúde humana e animal, membros da CTNBio, em seus pareceres.

Mesmo assim podemos dizer que a segurança das toxiproteínas de *B. thuringiensis* tem sido comprovada desde a década de 60 com o uso de inseticidas microbianos baseados em Bt (Siegel e Shaddock, 1989; Shimada et al, 2003, 2006). O gene, *CryIA(b)*, foi isolado da cepa HD-1, cuja versão natural vem sendo usada como ingrediente ativo nos inseticidas baseados em Bt amplamente usados como Dipel™ e Javelin™. Essas formulações microbianas têm sido usadas numa grande variedade de culturas, incluindo produtos que são consumidos frescos, como alface e tomate. Apesar do uso amplo em todo planeta como inseticida desde a década de 60, não existem relatos de reações alérgicas à própria proteína Bt através de exposição oral, dermal ou inalação ao produto microbiano (US EPA, 1998). Algumas alegações são feitas sobre produtos de *Bacillus thuringiensis* como causadores de reações alérgicas. Contudo, essas deduções, nunca foram tidas como devidas ao *Bacillus thuringiensis* em si, ou a qualquer das proteínas Cry (US EPA, 1998).

Segundo apresentado pela requerente, a proteína Cry é muito lábil à digestão pelo sistema digestivo dos mamíferos, o que praticamente impede sua absorção pela mucosa intestinal. Experimentos de digestão simulada demonstraram que a meia vida da proteína CryIA(b) é de menos de 30 segundos no sistema gástrico (US EPA, 1994a, MRID# 43439201). No sistema intestinal, a proteína de cadeia completa CryIA(b) foi rapidamente convertida no fragmento central resistente à tripsina, o qual obviamente não é degradado. Segundo a requerente ainda, para colocar a rápida degradação da proteína CryIA(b) no sistema gástrico simulado em perspectiva, estima-se que os alimentos sólidos sejam digeridos em 50% no estômago humano em aproximadamente em duas horas, enquanto que os líquidos são digeridos pela metade em aproximadamente 25 minutos (Sleisenger e



Fordtran, 1989). Portanto, qualquer proteína *CryIA(b)* consumida será rapidamente degradada no sistema gástrico de seres humanos. Segundo Keek e Mitsky (1994a), as proteínas Cry não são homólogas com alergênicos conhecidos.

Já a segurança da proteína PAT foi extensamente discutida pela CTNBio durante a análise para liberação comercial do milho Liberty Link, evento T25, onde conclui-se que ela não têm potencial tóxico ou alergênico conhecido. A proteína PAT mostra-se de rápida digestão por enzimas (proteases) do sistema digestivo de animais, eliminando muito o potencial dessa proteína ser alergênica quando consumida.

As proteínas Cry e PAT tem alto peso molecular, 65 kD e 30 kD, respectivamente. Assim, não volatilizam nem são absorvidas de forma dermal. O que é possível concluir que a proteína dificilmente apresentará características alergênicas ou tóxicas ao homem.

Considerando as descrições, comentários e solicitações feitas nesse parecer, encaminhado para DILIGÊNCIA a solicitação de liberação comercial do Milho Bt11, da empresa SYNGENTA SEEDS LTDA. A liberação comercial do mesmo evento já ocorreu em vários países produtores de grãos, e no Brasil em Liberações Planejadas de Pesquisa sem que se tenha identificado danos graves à saúde humana, animal ou ao ambiente. Entretanto, para que seja possível diferenciar o evento Bt11 de eventos irmãos, não autorizados em outros países, como o evento Bt10, as informações solicitadas devem ser encaminhadas. Informações referentes aos resultados obtidos nas liberações de pesquisa também serão importantes para a conclusão desse parecer.

Alexandre Lima Nepomuceno  
18 de Julho, 2007

**PARECER APRESENTADO EM 15 DE AGOSTO, 2007.**

Informações encaminhadas pela empresa proponente em resposta ao pedido de diligência feito em 18 de julho de 2007, mostram dados de análises recentes de *Southern blots* (Syngenta Seeds Biotechnology Report No. SSB-104-06, 2006) que confirmam a presença de cópias únicas do gene *cryIAb*, do gene *pat* e a origem da duplicação ColE1 (derivadas do plasmídeo de transformação pZO1502) presentes no milho derivado do Evento de transformação Evento Bt11, conforme descrito anteriormente. As novas informações também confirmam que a inserção do Evento



Bt11 não contém quaisquer seqüências não desejadas oriundas do plasmídeo de transformação pZO1502. As informações apresentadas adicionam e confirmam a caracterização anterior do Evento Bt11. O novo sequenciamento de toda a inserção presente no Evento Bt11 apresentada no documento Syngenta Seeds Biotechnology Report No. SSB-110-04 (2004), confirmou a integridade geral da inserção, com a manutenção das seqüências na ordem correta dos elementos funcionais. Apesar de não terem sido identificadas quaisquer alterações de nucleotídeos em nenhuma das seqüências codantes ou promotoras dentro da inserção do Bt11, dos 7068 nucleotídeos seqüenciados, foram observadas oito alterações de nucleotídeo em relação ao sequenciamento anterior, o que pode ser explicado pelo uso de técnicas mais precisas e recentes. Quatro alterações estavam localizadas nas seqüências contidas dentro da inserção do Bt11, duas estavam localizadas no DNA genômico flanqueando a inserção e uma alteração na mesma posição em ambas as cópias do terminador NOS presente na inserção (2). As alterações não mudam as proteínas inseridas uma vez que não alteraram as seqüências codantes introduzidas. Análises de *Southern Blot* (Vol.1, Seção C, Apêndice 6) discutidas anteriormente neste parecer demonstraram que a inserção é estável por várias gerações.

No documento encaminhado pela empresa proponente intitulado "Protocolo do Ensaio PCR para a Detecção do Evento Bt11 de Milho Transgênico, Versão 3, Protocolo ID: SP0144 de 28/06/2007" é apresentado um par de *primers* (*Forward* (FE02407):CATGGCTATTTTCAAGGTCGCTC e *Reverse* (FE02408):CCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC) que são apresentados como capazes de identificar o evento como único entre outros eventos contendo a mesma construção gênica. Assume-se que os *primers* que amplificam o fragmento de 144 pb cubra parte da seqüência que flanqueia o local de inserto, e parte da seqüência dos cassetes de expressão introduzidos. Nos resultados da aplicação do Protocolo ID SP0144 apresentados pela empresa as testemunhas eram plantas não-modificadas geneticamente, não havia testemunhas com linhagens "irmãs" do evento Bt11. Entretanto, conforme exposto acima se assume que os *primers* escolhidos possam separar linhagens "irmãs", tendo em vista as observações feitas nas páginas 4 e 5 desse parecer.



A proponente também apresentou novas informações através do documento “Avaliação Agronômica e de Eficácia de Versões Bt11 de Híbridos de Milho Tropicais” que mostra resultados de experimentos autorizados pela CTNBio onde liberações planejadas no meio ambiente são feitas em condições de cultivo de milho no Brasil. Parâmetros agronômicos e a eficácia no controle de lepidópteros-praga de híbridos de milho Bt11 foram observadas em comparação com linhagens isogênicas em ensaios conduzidos em 5 locais, Uberlândia-MG, Ituiutaba-MG, Iraí de Minas-MG, Campo Mourão-PR e Pinhalzinho-SC, na safra agrícola 2005/06. Estatura de plantas, altura de inserção da espigas, data de florescimento masculino e feminino, nota para doenças, porcentagem de plantas eretas, tipo de grão, cor de grão, conteúdo de umidade, rendimento e grãos ardidos, foram os parâmetros estudados nas avaliações agronômicas. Para estudo de eficácia do evento Bt11 no controle de lepidópteros-praga foram avaliados: dano da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*); da broca-do-colmo-do-milho (*Diatraea saccharalis*) e da lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*). Os híbridos Bt11 foram eficientes para controle dos lepidópteros-praga avaliados, bem como superiores para os parâmetros agronômicos rendimento de grãos e grãos ardidos. Segundo as informações apresentadas o diferencial favorável de desempenho esteve principalmente relacionado à eficiente proteção contra o ataque das pragas estudadas. Para os demais parâmetros agronômicos avaliados, os híbridos Bt11 apresentaram desempenho estatisticamente igual aos respectivos híbridos isogênicos não GM. Estes resultados confirmam a equivalência de desempenho agronômico entre os híbridos Bt11 e os isogênicos não GM em condições de cultivo da cultura no Brasil. Alguns dos resultados apresentados no documento descrito acima foram apresentados e publicados em anais de eventos científicos (Fernandes et al., 2001; Teixeira et al., 2001; Faria et al., 2002; Fernandes et al., 2006; Saldanha et al., 2006). No artigo intitulado “Avaliação do efeito de milho Bt sobre artrópodos não alvo no Brasil” também foram apresentados resultados da avaliação do milho Bt11 sobre insetos não-alvo em dois locais (Uberlândia, MG e Borborema, SP) na safra 1999/2000. Segundo os resultados não se observaram diferenças entre as populações de tesourinha (Dermaptera: Forficulidae), joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae), percevejo-pirata (Coleoptera: Anthicidae), carabídeos (Carabidae), cicindelídeos (Cicindelidae) e aranhas (Araneae). Sobre o parasitismo de ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie) por *Trichogramma* sp. (Hymenoptera:



Trichogrammatidae), também não foram observadas diferenças significativas quando comparadas plantas Bt11 com sua linhagens isogênicas não modificadas geneticamente (Fernandes et al., 2007). Os resultados reforçam observações feitas em outros países e culturas onde estudos de campo demonstraram que a abundância e a atividade de insetos não-alvo (predadores e parasitoides) foram similares quando comparadas plantas GM com *Bt* e plantas não GM. Em contraste, lavouras cujo controle é feito por métodos químicos, normalmente são observados efeitos negativos no controle biológico de insetos praga. Ou seja, o uso de plantas *Bt*, e a conseqüente redução nas aplicações de inseticidas tende a favorecer a presença de insetos que são predadores e parasitoides de insetos praga (Romeis et al, 2006).

Uma informação relevante apresentada pela empresa nos novos documentos encaminhados é a confirmação de que plantas de milho expressando proteínas Bt, apresentam menor ataque por fungos produtores de micotoxinas (aflatoxinas, zearalenona, fumonisina e deoxynivalenol) quando comparados com suas linhagens isogênicas não transgênicas tratados com inseticida (Santúrio et. al., 2001). O que pode implicar numa maior segurança alimentar de alimentos produzidos com milhos Bt em relação a presença de micotoxinas.

No estudo intitulado “Análises de Composição de Grãos e de Forragem do Milho Bt11” encaminhado pela proponente em atendimento a diligência são apresentados resultados de análises composicionais de um híbrido Bt11 em comparação com o respectivo híbrido isogênico e cultivares comerciais não modificadas geneticamente. Os experimentos foram realizados em 2 locais, Uberlândia-MG e Sta. Tereza do Oeste-PR, na safra agrícola 2005/06, utilizando as liberações planejadas autorizadas pela CTNBio. Os componentes avaliados foram: carboidratos, calorias, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), perfil de minerais, perfil de ácidos graxos e perfil de aminoácidos. No total, entre grãos e forragem, foram avaliados 49 parâmetros que, com exceção de um, apresentaram perfil similar e dentro da amplitude utilizada como referência pela *International Life Sciences Institute Crop Composition* (ILSI, 2004) no estudo. O parâmetro percentagem de gordura total por peso seco de grãos de milho Bt11 foi superior quando comparado com os demais tratamentos. Entretanto, os níveis de ácidos graxos individualmente apresentaram-se dentro da amplitude publicada pelo ILSI 2004. Os resultados obtidos indicam que



nenhuma mudança biológica significativas, não intencional, ocorreu na composição ou no valor nutritivo do grão e da forragem do milho Bt11 devido a expressão do transgene *cry1A(B)* e *pat*. Sugerindo, portanto, que o milho Bt11 é substancialmente equivalente em composição nutritiva ao respectivo híbrido isogênico não-GM e híbridos comerciais de milho, nas condições climáticas brasileiras onde os estudos foram conduzidos. Todos os novos documentos encaminhados pela proponente e citados nas páginas 10, 11 e 12 desse parecer devem passar a fazer parte do pedido de liberação no milho Bt 11.

### Comentários Finais

O presente parecer apresenta e discute aspectos relacionados à solicitação de liberação comercial do milho Bt11, tendo em vista o pedido de vistas do processo feito por este parecerista no dia 20 de Junho de 2007. Na reunião plenária da CTNBio de 18 de Julho, conforme exposto anteriormente, o parecerista concluiu pela DILIGÊNCIA do processo. Em 16 de agosto, mediante análise dos documentos encaminhados pela proponente em resposta ao pedido de Diligência do processo, nosso parecer é pelo DEFERIMENTO da solicitação uma vez que as respostas e informações fornecidas atendem aos questionamentos feitos. Cabe ressaltar, entretanto, que as informações apresentadas que permitem a identificação do evento Bt11 como um evento único de transformação, não devem ser consideradas sigilosas após a liberação comercial, caso esta ocorra. Em caso de liberação comercial sugerimos que após a liberação seja proposto pela proponente um plano de monitoramento pós-comercialização baseado na análise de risco feita no parecer final da liberação comercial, visando confirmar ou não a análise de risco feita pela CTNBio.

Como comentário final enfatizo que com a adoção de PGM com resistência a insetos, a redução de inseticidas tem sido considerável nos países que já adotaram a tecnologia a mais de dez anos. Por exemplo, nos EUA produtores obtiveram reduções de mais de 800 toneladas de ingrediente ativo inseticida somente em 2001 (Carpenter et al., 2002; Edge et al., 2001; Gianessi et al. 2002). Na China, as aplicações de inseticidas foram reduzidas em média 67%, sendo que a redução em volumes de ingrediente ativo inseticida foi reduzida em 80% (Huang et al., 2002). Na África do Sul as reduções ficaram em torno de 66% (Ismael et al., 2002). No Brasil o consumo de inseticidas para controle de insetos na cultura de milho gira em torno de US\$ 60 milhões/ano, sendo que



40% desse valor, aproximadamente, é utilizado no controle de lagarta de cartucho, uma das principais pragas a ser controlada com o milho Bt11 (Omoto et al, 2000). Existem hoje, mais de 142 agrotóxicos registrados para o milho, 107 somente para controle de lepidópteros. O uso de tecnologias como o algodão e o milho Bt resistentes a insetos pode impactar positivamente a preservação de populações de organismos não-alvo e insetos benéficos facilitando o manejo integrado de pragas da lavoura (Xia et al., 1999; Head et al., 2001; Benedict e Altman, 2001). O uso da tecnologia *Bt* no Brasil poderá contribuir na redução do uso desses inseticidas e conseqüentemente, reduzir os impactos do uso desses agrotóxicos no meio-ambiente, na saúde humana e animal. Adicionalmente, a adoção de tecnologias que reduzam pulverizações de produtos químicos nas lavouras pode favorecer a obtenção de benefícios secundários como a redução de uso de matéria-prima na produção de agrotóxicos, na conservação de combustíveis utilizados para produzir, distribuir e aplicar tais agrotóxicos, e pela eliminação da necessidade de uso e descarte de embalagens de agrotóxicos (Leonard e Smith, 2001).

Alexandre Lima Nepomuceno  
16 de Agosto, 2007



## Referências:

- AGBIOS. *Agbios Database product Description*. [www.agbios.com](http://www.agbios.com). 2007.
- Benedict, J., & Altman, D. 2001. Commercialization of transgenic cotton expressing insecticidal crystal protein. In J. Jenkins & S. Saha (Eds.), *Genetic improvement of cotton: Emerging technologies* (pp. 137-201). Enfield, NH: Science Publishers Inc.
- Bradford, K. J.; Deynze, A.V.; Gutterson, N.; Parrott, W.; Strauss, S.H. Regulating transgenic crops sensibly: lessons from plant breeding, biotechnology and genomics. *Nature Biotechnology*, 23(4): 439-444, 2005.
- Broderick, N.A.; Raffa, K.F.; Handelsman, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc.Natl.Acad.Sci*, 103:15196-15199.
- Brookes, G.; Barfoot, P. 2005. *GM Crops: The Global Economic and Environmental Impact - The First Nine Years 1996 - 2004*. *AgBioForum* 8 (2&3): 187-196 (2005) (PDF 242 kb). September 2005: [www.pgeconomics.co.uk/](http://www.pgeconomics.co.uk/)
- Brookes, G.; Barfoot, P. 2006. *GM Crops: The Global Economic and Environmental Impact - The First Ten Years 1996 - 2005*. PG Economics Ltd, UK, Dorchester, UK, October 2006: [www.pgeconomics.co.uk/](http://www.pgeconomics.co.uk/)
- Carpenter, J., Felsot, A., Goode, T., Hammig, M., Onstad, D., & Sankula, S. 2002. Comparative environmental impacts of biotechnology-derived and traditional soybean, corn, and cotton crops (CAST: I-189). Ames, IA: Council for Agricultural Science and Technology.
- Dekeiser, D.; Claes, B.; Marichal, M.; Montagu, M.B.; Caplan, A. Evaluation of selectable markers for rice transformation. *Plant Physiology*, Bethesda, v.90, p.217-223, 1989.
- Edge, J.M., Benedict, J.H., Carroll, J.P., & Reding, H.K. 2001. Bollgard cotton: An assessment of global economic, environmental, and social benefits. *Journal of Cotton Science*, 5(2), 121-136. Available on the World Wide Web: [http://journal.cotton.org/2001/issue02/Art\\_08.pdf](http://journal.cotton.org/2001/issue02/Art_08.pdf).
- Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. 1993. *Bacillus thuringiensis and Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, ed. J. Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
- Faria, M.; Schmidt, F.; Carvalho, V.F.; Saldanha, L.; Moro, G.L. Avaliação do efeito dos híbridos transgênicos Bt-II sobre pragas e inimigos naturais do milho, em Uberlândia - MG. 2002. In: *Congresso Brasileiro de Entomologia, 19, Manaus (AM), Brasil*. Pág. 162. Resumos.
- Fernandes, O.A.; Martinelli, S.; Faria, M.; Carvalho, V.F.; Machado, J.A.; Moro, G. L. Moro. 2001. Eficiência do evento de transformação genética de milho Bt11 da Syngenta Seeds no controle de lepidópteros-praga e efeito sobre inimigos naturais, em Borborema, SP. In: *II Congresso Brasileiro de Biossegurança e II Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos, Salvador (BA), Brasil*, Pág. 207-208.
- Fernandes, O. A.; Oliveira, T. T.; Vilarinho, E. C. ; Saldanha, L. A. ; Gomes, M. S.; Duarte, J. M. 2006. Avaliação da eficácia dos híbridos de milho Bt11 e ICP6 na controle da broca-docolmo, *Diatrea Saccharalis* (Lepidoptera:Crambidae). *Congresso Brasileiro de Entomologia (CBE): XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 1, ISBN: Português, Meio digital*
- Fernandes, O.A.; Faria, M.; Martinelli, S.; Schmidt, F.; Carvalho, V.F.; Moro, G. 2007. Short-Term Assessment Of Bt Maize On Non-Target Arthropods In Brazil. *Sci. Agric.* 64(3):249-255.



- Fu X.D., Duc L.T., Fontana S., Bong B.B., Tinjuangjun P., Sudhakar D., Twyman R.M., Christou P., Kohli A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generates low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Res.* 9:11-19.
- Gelvin, S. B. *Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the genejockeying tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews.* p. 16-37, mar. 2003.
- Gianessi, L., Silvers, C., Sankula, S., & Carpenter, J. 2002. Plant biotechnology: Current and potential impact for improving pest management In U.S. agriculture: An analysis of 40 case studies (executive summary). Washington, DC: National Center for Food and Agricultural Policy. Available on the World Wide Web: <http://www.ncfap.org/40CaseStudies/NCFAB%20Exec%20Sum.pdf>.
- Head, G., Freeman, B., Mina, B., Moar, W., Ruberso, J., & Turnipseed, S. 2001. Natural enemy abundance in commercial Bollgard® and conventional cotton fields. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference 2*, 796-798. Memphis, TN: National Cotton Council.
- Huang, J., Rozelle, S., Pray, C., & Wang, Q. 2002. Plant biotechnology in China. *Science*, 295(5555), 674-676.
- Ismael, Y., Bennett, R., & Morse, S. 2002a. Bt cotton, pesticides, labour and health: A case study of smallholder farmers in the Makhatini Flats, Republic of South Africa. Paper presented at the 6th International ICABR Conference, Ravello, Italy.
- Leonard, R., & Smith, R. 2001. IPM and environmental impacts of Bt cotton: A new era of crop protection and consumer benefits. ISN No. 00401074.
- Lu, H.; Bernardo, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. *Theoretical and Applied Genetics*, 103:(4)613-617, 2003.
- James, C. 2002. Global review of commercialized transgenic crops: 2001 (ISAAA Brief No. 26-2001). Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Available on the World Wide Web: [http://www.isaaa.org/Publications/briefs/briefs\\_26.htm](http://www.isaaa.org/Publications/briefs/briefs_26.htm).
- Keek, P.J. e Mitsky, T.A. 1994. Comparative alignment of insecticidally-active B.t.k. HD-73 protein (B.t.k. protein) to known allergenic and toxic proteins using the FASTa algorithm, Monsanto Technical Report MSL- 13643, St. Louis
- Latham, J.R.; Wilson, A.K.; Steinbrecher, R.A. The mutational consequences of plant transformation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (2006):1-7.
- Lewin, B., 2004. *Genes VIII*. Oxford University Press, New York.
- Lilge, C.G.; Tillmann, M.Á.A. Tillmann; Villela, F.A.; Dode, L.B. Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glufosinato de amônio Rev. bras. sementes vol.25 no.1, 2003.
- Loc, N.T.; Tinjuangjun, P.; Gatehouse, A.M.R.; Christou, P.; Gatehouse, J.A. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding* 9: 231-244, 2002.
- ILSI. 2004. International Life Sciences Institute Crop Composition Database Version 2.0. <http://www.cropcomposition.org>.
- Paz, M. M.; Shou, H.; Guo, Z.; Zhang, Z.; Banerjee, A. K.; Wang, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica*. v.136, p.167-179, 2004.



- Pauli, S.; Rothnie, H.M.; Chen, G.; He, X.; Hohn, T. The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. *Journal of Virology*, 78(22):12120-12128, 2004.
- Saldanha, L. A.; Gomes, M. S.; Duarte, J. M., Argenta, G., Rambo, L. Eficácia de híbridos de milho Bt11 no controle de lepidópteros-praga em condições de campo sob infestação natural 2006. Congresso Nacional de milho e sorgo: XXVI Congresso Nacional de Milho e sorgo, 1, ISBN: Português, Meio digital, 2006.
- Shimada, N.; Kim, Y.S.; Miyamoto, K.; Yoshioka, M.; Murata, H. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. *J Vet Med Sci*. 65: 187-91, 2003
- Shimada, N.; Miyamoto, K.; Kanda, K.; Murata, H. *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1ab toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial cells: An in vitro study. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 42: 45-49, 2006
- Siegel, J.P.; Shadduck, J.A. Safety of microbial insecticides to vertebrates humans. In: *Safety of Microbial Insecticides*, pp. 102-113. CRC Press, Inc., Florida, USA, 1989.
- Sleisenger, M.H. e Fordtran, M.D. 1989. "Gastrointestinal Disease, Volume 1", In *Pathophysiology Diagnosis Management*, 4th, ed, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Smith, R.H. (1997). An extension entomologist's 1996 observations of Bollgard (Bt) technology. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conference 2*, 856-858. Memphis, TN: National Cotton Council.
- Santurio, J. M.; Carvalho, V. F.; Machado, J. A.; Moro, G. L.; Bernardes Silva, L. M.; Boeck, A.A.P.; Copetti, M. V. Avaliação da microbiota fúngica e produção de micotoxinas em grãos de híbrido de milho não modificado geneticamente e seu isogênico transgênico Bt11 da Syngenta Seeds. In: *II Congresso Brasileiro de Biossegurança e II Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos*, Salvador (BA), Brasil, Pág. 205-206, 2001.
- Reddy, M. S. S., Dinkins, R. D.; Collins, G. B. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Rep*. v. 21, p.676-683. 2003.
- Romeis, J.; Meissle, M.; Bigler, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, 24(1):63-71.
- US EPA, 1994a, MRID # 43439201, Assessment of the In Vitro Digestive Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Protein, Laboratory Project ID# 93-01-39-04, Monsanto Company, March 23, 1994.
- US EPA, 1994b, MRID # 43397202. Equivalence of plant and Microbially Produced *Bacillus thuringiensis* *kurstaki* HD-1 Protein, Northrup King Co., 22 August 1994.
- US EPA, Dec., 1998. Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. NTIS PB 89-164-198.
- Teixeira, C.A.D.; Fanton, C. J.; Carvalho, V. F.; Machado, J. A.; Moro, G. L. Bernardes Silva, L. M. Bernardes Silva; Buiatti, A. L. Avaliação do efeito do híbrido de milho transgênico Bt11 da Syngenta Seeds associado ao tratamento químico de sementes sobre insetos-praga e inimigos naturais, em Uberlândia - MG. In: *II Congresso Brasileiro de Biossegurança e II Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos*, Salvador (BA), Brasil, Pág. 209-210, 2001.
- Zhao Y., Yu Y.C., Qian Q., Yan M.X., Huang D.N. 2003. Cotransformation of rice by bar and cecropin B gene expression cassettes lacking vector backbone sequences. *Yi Chuan Xue Bao*. 30(2):135-41.
- Xia, J.Y., Cui, J.J., Ma, L.H., Dong, S.X., & Cui, X.F. 1999. The role of transgenic Bt cotton in integrated insect pest management. *Acta Gossypii Sin*, 11, 57-64.



*Wilmink, A.; Dons, J.J.M. Selective agents and marker genes for use in transformation systems of monocotyledonous plants. Plant Molecular Biology, Reporter, Wageningen, v.11, n.2, p.165-185, 1993.*