

Parecer do Processo de Liberação Comercial da Syngenta Seeds Ltda referente ao Milho MIR 162 Resistente a Lepdópteros, Processo 01200.007493/2007-08.

Parecerista: Dr Paulo Kageyama. ESALQ/USP. Representante do MMA na CTNBio

Empresa: Syngenta Seeds Ltda. São Paulo.SP

I. INTRODUÇÃO

A empresa Syngenta Seeds Ltda apresenta uma petição para liberação comercial do OGM Milho MIR 162 e seus derivados, que apresenta resistência a vários lepdópteros considerados pragas da cultura do milho no Brasil, como a lagarta do cartucho, lagarta da espiga e a broca do colmo do milho.

A Syngenta desenvolveu por meio da biologia molecular o milho transformado contendo o evento MIR 162, contendo o gene *vip3Aa20* que codifica a proteína *Vip3Aa20* e o gene *manA* que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI). A proteína *Vip3Aa20* é uma variante da proteína inseticida nativa *Vip3Aa1* de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88. O gene *man* foi obtido a partir da *Escherichia coli* cepa K-12 e a expressão da proteína PMI foi utilizada como marcador de seleção ao longo do processo de desenvolvimento do milho MIR 162.

O milho MIR 162 foi produzido por transformação de embriões imaturos de milho, via *Agrobacterium tumefaciens*, e com a utilização do plasmídeo pNOV1300 como vetor para transformação. A região entre as bordas esquerda e direita do plasmídeo incluía os cassetes de expressão dos genes *vip1Aa20* e *manA*. O cassete de expressão de *vip3Aa1* continha a região codificadora de *vip3Aa19*, regulada pelo promotor polyubiquitin (*ZmUbiInt*) do milho e seqüências de poliadenilação 35S do vírus do mosaico da couve flor.

Por meio de análises de Southern Blot e seqüenciamentos de nucleotídeos foi demonstrado que o milho MIR 162 contem uma única cópia intacta do inserto Fo T-DNA no cromossomo 5 do genoma nuclear do milho. Demonstraram também que este único inserto de T-DNA contem: a) cópias únicas dos genes *vip3Aa20* e *manA*; b) duas

cópias do promotor ZmUBiInt; c) uma cópia do terminador NOS; e d) nenhuma sequência residual do plasmídeo de transformação pNOV1300.

Com base no seu modo de ação, propriedades físico-químicas e resultados de estudos de biossegurança, foi demonstrado que as proteínas presentes no milho MIR 162 – Vip3Aa20 e PMI, não representam risco a espécies de mamíferos ou efeitos adversos em uma ampla gama de espécies não-alvo pertencentes ao ecossistema de lavouras de milho. A empresa coloca que vários estudos conduzidos com o milho MIR 162 em laboratórios e Casas de Vegetação e em Liberações Planejadas no meio ambiente, incluindo no Brasil, confirmam que não há modificações adicionais em sua morfologia, fenologia e outros parâmetros composicionais ou agronômicos, além da esperada expressão das proteínas Vip3Aa20 e PMI.

O Milho MIR 162 foi desenvolvido para proporcionar aos agricultores uma alternativa prática e eficaz para o controle de danos causados por lepdópteros-praga em todas as fases de desenvolvimento desta cultura, representando um método específico e direto de controle que é ambientalmente sustentável e apresenta benefícios ao ambiente, ao consumidor, e ao sistema de produção da cultura.

Tendo em vista o modo de ação diferenciado da proteína Vip3Aa20, o milho MIR 162 apresenta-se com uma nova opção e alternativa a outros tipos de milhos geneticamente modificados expressando proteína Cry derivadas de *Bacillus thuringiensis*, para redução de pressão de seleção para resistência entre os insetos lepdópteros.

2.1.3. Características da Cultura

O milho é uma cultura de ciclo vegetativo anual, com período de duração bastante variado, abrangendo desde culturas extremamente precoces, cuja polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência, até mesmo aquelas cujo ciclo pode alcançar 300 dias. Em condições edafoclimáticas brasileiras a cultura do milho apresenta ciclo variável entre 110 a 180 dias (Fancelli et al, 2000).

Para o milho as maiores exigências em umidade se concentram nas fases de emergência, florescimento e formação de grãos (Duarte, 2000).

Todavia no período compreendido entre 15 dias antes e 15 dias depois após o aparecimento da inflorescência masculina, o estresse hídrico é crítico. A falta de água no florescimento pode causar a desidratação do grão de pólen, prejudicando o desenvolvimento e penetração do tubo polínico, além de alterar o sincronismo entre a inflorescência masculina e feminina (Fancelli, 1990; Magalhães et al. (1993).

2.3. A proteína nativa Vip3Aa 1 originada de *Bacillus thuringiensis*, cepa AB88 contem 789 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 89 KDa. A variante Vip3Aa20 produzida pelo milho MIR 162 apresenta também 789 aminoácidos, porém difere em dois aminoácidos (posições 129 e 284). Uma variante desta proteína (Vip3Aa19) está presente no algodão COT102 da Syngenta, aprovado nos EUA e na Austrália. A variante Vip3Aa19 difere da proteína nativa em um aminoácido na posição 284, e da Vip3Aa20 em um aminoácido na posição 129.

II. FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA DA DECISÃO DO RELATOR

3.3. Avaliação Agronômica e de eficácia do milho MIR162

3.3.3. Eficácia do milho MIR 162 contra lepdópteros-praga

Na tabela 13 são apresentados resultados médios de comparação do milho MIR 162 e respectivos híbridos isogênicos não GM (com e sem aplicação de inseticidas) para vários parâmetros: danos causados pelas lagartas, em Experimento da Syngenta instalado em Uberlândia-MG em 2007. O experimento referente a *Diatraea saccharalis* mostram CV experimental de 54,2% e 51,4%, o que mostra controle experimental muito precário, segundo Pimentel Gomes.

Na tabela 14 são apresentados resultados médios da porcentagem de plantas cortadas por *Spodoptera frugiperda* avaliados em diferentes dias após infestação, em Experimento da empresa instalado em Holambra-SP. Neste experimento em questão não são apresentados os CV experimentais de nenhum dos resultados de comparação entre os tratamentos da tabela. No Anexo também não constam os CVs experimentais, o que caracteriza pouca possibilidade de aferição do rigor estatístico. Isso torna impossível a avaliação de sua eficácia.

Nenhum dos resultados referentes aos dois experimentos foi publicado e avaliado por pares não da empresa, o que não possibilita apontar inteira confiabilidade. Aliás, sem a sua publicação em revista com avaliação pelos pares, e com falhas gritantes quanto aos CVs experimentais extremamente altos (acima de 50%), assim como à falta de dados de CVs experimentais, reforça o colocado que fica difícil avaliar os resultados dos experimentos da empresa referentes ao processo.

3.4.2.4. Estudo de toxidez aguda das proteínas expressas no milho MIR 162 em camundongos

A proteína Vip3Aa20 foi ministrada a grupos de machos e fêmeas de camundongos, via oral. O óleo de milho foi escolhido como veículo e como substância controle, uma vez que permitiu o alcance de uma concentração mais alta da substância teste na suspensão viscosa, aceitável para a dosagem. A dosagem escolhida foi de 1 250 mg por ser a mais alta possível.

Não são apresentados resultados em tabelas, somente uma descrição dos resultados e uma conclusão sucinta: “que a administração da dosagem proposta não produziu efeitos adversos que poderiam ser considerados como relacionados à Vip3Aa20. Não houve efeitos sobre a condição clínica, o peso corporal, consumo de alimentos, patologia clínica, peso dos órgãos, patologia macroscópica e microscópica. Que possam ser considerados com Vip3Aa20. Detalhes no Anexo 9.”

Ao irmos ao anexo 9, vemos a saída dos dados brutos, sem uma organização dos mesmo em tabelas não entendíveis para análise, além do que, se notam muitos dados no mínimo estranhos, PIS não são explicados no texto. No início, em 3.4.4 Casualização e identificação dos animais, se coloca que “o estudo compreendeu duas repetições (grifo meu) de um sô sexo (blocos ao acaso) cada um contendo uma gaiola por grupo de tratamento.” Em seguida é complementado que “o estudo consistiu de um grupo controle e um grupo de tratamento, cada um contendo cinco machos e cinco fêmeas”.

Nossa interpretação é muito clara: trata-se de um experimento para testar o efeito do evento GM MIR 162 em camundongos, usando-se parcelas de 5 camundongos machos e fêmeas, com dois Tratamentos (o

Evento e a Testemunha) e duas repetições em delineamento em Blocos ao Acaso. Isso nos parece um delineamento absurdo para se testar efeitos de tratamentos tão sensíveis e complexos, além de polêmicos. A empresa tem que explicar isso e fazer experimentos no mínimo com delineamentos estatísticos adequados. As referências do trabalho são um relatório (Report SSB-023-06) e dois trabalhos sobre modelos estatísticos (SIC !). Por último, no Apêndice 9, deste anexo 9, referente à Química Clínica do Sangue, em todos os animais testados aparecem a indicação: “amostra obtida insuficiente”, sem nenhuma explicação do por que e sem novos dados coletados. Nos resultados deste apêndice 9 em “resultado comentário” aparecem em todos os animais: “ sem resultado, amostra insuficiente”. De novo, sem nenhuma explicação ou justificativa.

Com todas essas falhas experimentais e de delineamentos não se pode concluir que não haja efeitos significativos das proteínas do milho MIR 162, e que as mesmas sejam inofensivas a camundongos, como o processo quer demonstrar.

3.4.3.1. Perfil Composicional

Para o estudo de equivalência substancial do milho MIR 162, foi realizado um perfil de composição química da forragem e do Grão em comparação com sua versão isogênica não GM e outros híbridos comerciais não GM, a fim de verificar se os níveis de variação das características apresentavam-se dentro da amplitude conhecida para suas características (Food Standards Agency, 2001). Este estudo foi realizado no Brasil (Liberação Planejada – CTNBio proc 3982/2005-11).

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso com **4 Tratamentos** (milho MIR 162; híbrido isogênico; mais 2 híbridos comerciais não GM) em **3 repetições**, em Uberlândia e Ituiutaba – MG). Novamente as regras de uso de boa estatística não são seguidas. No caso, o grau de liberdade do Resíduo, termômetro da eficiência estatística dos experimentos teria o valor de 6 (3x2), o que é simplesmente ridículo. Sabe-se que o GL do resíduo para experimentos de campo seria de no mínimo 11, muito acima do obtido no experimento. Inclusive, os 2 híbridos comerciais não GM não valem como tratamentos pois não

entram no mérito da comparação entre o GM e o Não GM, que é o objetivo do experimento. Portanto os 2 tratamentos adicionais são simplesmente enchimento para aumentar o GL do tratamento. Portanto, o delineamento experimental apresenta duas falhas grosseiras. Inaceitável em ensaios dessa natureza, muito sensíveis.

Na tabela 1, não são apresentados os CVs Experimentais das análises entre os tratamentos, o que não permite avaliar a significância ou não. Inclusive não são apresentados os valores de F, no tradicional Teste F. Em alguns casos as amplitudes entre as médias apresentadas são muito amplas, sugerindo que existem diferenças significativas, porém nada se pode concluir. Por exemplo, na tabela 3, a amplitude das médias é de (0,73-18,5); se dividimos a amplitude por 4 dá aproximadamente o desvio 4,5 (7,8:4); o desvio $\times 100 = 450$ dividido pela média (1,75) seria o CV% que daria em torno de 260% (?). A impressão que dá é que tudo é levado para a não obtenção de significância, talvez até para somente justificar a equivalência substancial. Não há outra alternativa: Ou se conclui que não se fornece a informação do CV para não se poder ter esta conclusão, ou para não se concluir o contrário.

Exemplos de pleiotropia têm sido verificados, apontando para a não equivalência substancial e o aparecimento de outras características não esperadas. É o caso por exemplo do aumento da lignina verificado em alguns milhos GM quando comparados aos seus híbridos isogênicos (Saxena e Stotzky, 2001). Conforme Stotzky (2000), numa comparação de 10 híbridos de milho GM e não GM, a taxa de lignina apareceu maior que 33 a 97% em milho Bt em relação aos seus isogênicos. Isso pode acarretar maior tempo de decomposição dos restos vegetais, impacto sobre as comunidades de decompositores, alterações no balanço de carbono, maior tempo de ação da proteína Bt, etc.

3.5.3. Efeito da proteína Vip3A em joaninhas (*Coleomegilla maculata*)

O estudo foi conduzido com a substância teste Propacha-0100 (pólen) em joaninhas adultas de acordo com as diretrizes do EPA-EUA. *C. maculata* um predador generalista ocorre em lavouras de milho e se alimenta de pólen de milho e outras espécies de plantas. As joaninhas adultas receberam por um período de 21 dias, pólen de linhagens de milho expressando a proteína Vip3Aa19 ou pólen controle misturados

com uma dieta comercial de joaninhas. Um grupo controle recebeu apenas uma dieta comercial. Um grupo controle positivo recebeu apenas uma dieta contendo 50 mg de Tiodicarb/Kg de dieta. Cada tratamento constou de 3 repetições de 25 joaninhas cada, em um total de 75 joaninhas.

Os resultados apresentados de significância estatística não apontam coeficientes de variação, ou outro parâmetro que possa indicar confiabilidade nos dados, o que prejudica a avaliação do impacto ou não dos tratamentos. E a conclusão: “no estudo, nenhum efeito adverso foi observado nas joaninhas que consumiram dietas contendo 5% de pólen da substância-teste Propacha-0100. E temos que acreditar ou acreditar. Infelizmente. Ademais, a maioria dos testes foi feito nos EUA, com espécies das condições de lá com as regras daquele país.

Andow e Hilbeck (2004) acreditam que as interações das proteínas Bt, com moléculas de defesas secundárias das plantas, seriam responsáveis pelos efeitos negativos observados em alguns estudos de toxicidade das proteínas Bt de OGMs sobre Organismos Não Alvos. Em relação ao número de repetições dos bioensaios, Rose et al (2007) nos bioensaios com abelhas *Apis mellifera* “estudos de laboratório para medir sobrevivência de abelhas adultas, deveria testar pelo menos seis grupos de 50 abelhas por tratamento para detectar 50% de redução com 80% de poder estatístico”. Essas especificações é que deveriam ser bem apresentadas.

3.5.5 Efeitos da Vip3A em minhocas (*Eisenia foetida*)

A descrição dos ensaios experimentais de toxidez aguda dos efeitos da proteína VipA sobre minhocas é simplesmente ridícula, sem nível científico, não havendo rigor nem comparável a um bom relatório. Para começar. Não é citado o local dos ensaios, se no Brasil ou no exterior. As diferenças estatísticas são colocadas sem referencial estatístico, como se fosse um ensaio banal. A grande importância desses organismos para a vida do solo não é sequer considerada. Sem condições de avaliação com rigor estatístico, infelizmente.

3.5.10. Efeitos da Vip3Aa20 em abelhas (*Apis mellifera*)

Neste ensaio as abelhas foram expostas a Vip3Aa20 por meio da substância-teste MIR162Vip3A-0106 segundo protocolo de Oomem et al (1992). A substância teste foi dissolvida em 50 mM do tampão de Tris-HCl (pH 9,5) e adicionada à dieta de 50, 200 e 500 ug de Vip3Aa20/g da dieta; essas concentrações representavam aproximadamente 1,4 e 10 vezes a concentração de Vip3Aa20 no pólen do MIR 162. O controle negativo era alimentado com dieta de 50% da solução de sucrose em 50mM do tampão de Tris-HCl. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência, após 24 dias entre a prole nas colméias expostas à dieta tratada com MIR162VIP3A-0106 e a prole nas colméias expostas à dieta do controle negativo em qualquer estágio de desenvolvimento. Detalhes no Anexo 17.

Novamente, devido à importância econômica da espécie por um lado, e considerando que esses organismos se alimentam de grandes quantidades de pólen, inclusive de milho Bt de outro (Sabugosa-Madeira et al, (2007), os polinizadores como a *Apis mellifera* merecem destaque especial na avaliação de riscos. Ademais, a abundância e riqueza de espécies de abelhas silvestres existentes no Brasil (Raw et al, 2006) e o comportamento diferencial de alimentação das crias dessas abelhas, torna esse grupo de abelhas um alvo importante para as análises de risco das plantas Bt.

Na tabela 4 do Anexo 17, referente à mortalidade da prole e de abelhas adultas em DAT 1-24 (armadilhas para abelhas mortas), chamou a atenção a forma de análise e a grande variação dos dados experimentais, a saber. São apresentados dados médios de mortalidade referentes a 3 repetições, onde se apresentam esses 3 dados e a média, com seus respectivos D.P. (desvios padrões). As amplitudes entre os dados médios são extremamente altos, dando CVs muito altos, variando de 40 a 77%, o que coloca em dúvida, novamente, as conclusões de não significância. Aliás, na comparação de médias, aparecem diferentes índices para mostrar a não significância usando o Teste de Student e de Welch, quando deveriam ter sido utilizados o mesmo teste. Isso tudo para mostrar que não existiram diferenças. Nos parece serem mais artifícios para mostrar que as colônias se comportaram normais com a adição da proteína do evento na

alimentação das abelhas das colméias. Como os experimentos são solicitados pela empresa e não publicados, sempre se fica em dúvida sobre o uso indevido das estatísticas para acomodar os dados.

Os estudos de Kaatz (2005) revelaram que abelhas alimentadas com pólen de milho Bt mostraram-se mais susceptíveis a uma infecção parasitária de microsporídea. Isso indica segundo o autor uma interação da toxina e do patógeno nas células epiteliais do canal alimentar das abelhas, com mecanismo desconhecido. Além disso, o estudo de Ramirez-Ramiro (2008) revela que abelhas alimentadas com pólen de milho Bt podem ser afetadas no comportamento de associação das fontes de néctar com moléculas odoríferas. Esses exemplos mostram que os testes de laboratório procurando somente efeitos letais e sub-letais sobre abelhas não levam em consideração os fatores exteriores e merecem, então, a complementação com estudos de campo. Esses dados mostram a necessidade de se aprofundar os estudos em relação à atual visão simplificada do modo de ação das proteínas Bt dependendo unicamente da ligação proteína Bt – receptor específico, como apresentado por Hilbeck e Schmidt (2006). Nesse caso, e tendo os estudos sido feitos na Suíça, fica difícil crer que os dados possam ser concludentes.

3.5.13. Avaliação da influência do milho MIR 162 sobre a comunidade de insetos em ambientes do Brasil

O estudo visou avaliar a influência do milho GM sobre a comunidade de insetos e a interferência dessas plantas sobre as pragas primárias de solo e parte aérea, assim como sobre as pragas secundárias. Os estudos foram desenvolvidos com o híbrido MIR162 e seu isogênico nas estações experimentais da empresa em Uberlândia e Ituiutaba, ambas no estado de MG. Portanto não seriam ambientes do Brasil, mas sim em dois locais de um estado MG do Brasil.

Na conclusão do experimento coloca-se que “com as armadilhas e análises utilizadas pode-se concluir que o milho GM MIR 162 não apresenta efeito adverso sobre a comunidade de insetos ou sobre o predador *Doru luteipes* ou artrópodos do solo. O relato está apresentado no Anexo 18.

Inicialmente, na conclusão de fato o relatorista falhou na redação da conclusão e mudou de comunidade de insetos para do predador *D. luteipes* e para artrópodos. Isso é interessante, pois o título do item do relatório é um e as conclusões são de outro. Mas fica interessante observarmos com atenção, senão vejamos.

No relatório, é ressaltado que “os ácaros representam mais de 82% do total de artrópodos coletados tanto em Uberlândia como Ituiutaba, sendo a maior parte dos artrópodos presente no cerrado (Oliveira, 2006). Ácaros e colêmbolas que, via de regra, constituem a maioria dos microartrópodes edáficos, desempenham papel importante nos processos de decomposição e mineralização da matéria orgânica, favorecendo a decomposição microbiana (Oliveira, 2006).

Com toda essa relevância colocada nos ácaros de solo, o autor não foi capaz de verificar na Tabela 3 do Anexo 18, que tanto no plantio como na colheita o número total do MIR 162 comparado com o Convencional eram respectivamente de 69 x 174 e 37 x 128. Essas diferenças não são significativas? Como se esquece dessa informação? Que pesquisadores são esses? Parece que o relatório enorme foi feito mesmo para não se ler. Nem se discutir. Só aprovar! Como a hipótese é a de que não existem diferenças entre o Convencional e o GM, esquece-se do que se está comparando.

3.6. Fluxo Gênico e possível transferência horizontal de genes

Nesse capítulo tão importante e essencial para análise de riscos de biossegurança, somente se coloca a questão do fluxo gênico para espécies selvagens, indicando que existe uma baixa probabilidade de transferência do gene do milho MIR 162 para espécies selvagens, colocando o *Tripsacum* como a única possibilidade. Esquecendo-se das variedades não GMs, das variedades crioulas, das plantações de milho orgânicas, etc.

A partir do alerta exatamente de hoje na FSP (10 de maio 2009) com a manchete na 1ª página: “Brasil não tem controle sobre milho transgênico: não há estrutura para separá-lo da variedade normal, alegam produtores”, fica difícil se ignorar a realidade. Existem milhares de agricultores, principalmente familiares pequenos que

cultivam suas próprias variedades, denominadas crioulas, e mesmo agricultores que utilizam variedades de polinização livre, que não optaram pelos transgênicos e têm direito de continuarem com o uso dessas sementes sem serem contaminados.

Nessa linha de fluxo gênico indesejável, o caso mais emblemático é o do milho. Isso porque sendo a espécie alógama e de polinização pelo vento, dependendo da velocidade e da direção do mesmo, a contaminação pode ser a longuíssimas distâncias, com casos comprovados de muitos quilômetros. Ademais, quem conhece o segmento da agricultura familiar, principalmente tradicional, sabe avaliar quantos milhares de variedades ditas crioulas, derivadas originalmente dos povos indígenas, existem nesse Brasil afora. E esse potencial de contaminação não tem sido considerado na CTNBio, tendo sido dito muitas vezes: “milho crioulo não existe”. Nem os trabalhos publicados recentemente pela Nature (2001) e confirmados pela Molecular Ecology: Alvares-Builla (2008) sobre a constatação científica de contaminação a longuíssimas distâncias dos milhos crioulos no México, berço original da espécie, causam alguma mudança, no geral, na CTNBio. A resolução da CTNBio de coexistência do Milho OGM com Não OGM de somente 100m diz tudo.

III. CONSIDERAÇÕES E PARECER FINAL

1. No item 3.3.3. Eficácia do milho MIR 162 contra lepdópteros-praga, na tabela 13 são apresentados resultados médios de comparação do milho MIR 162 e respectivos híbridos isogênicos não GM. O experimento referente a *Diatraea sacchatalis* mostram CV experimental de 54,2% e 51,4%, o que mostra controle experimental muito elevado segundo Pimentel Gomes. Na tabela 14 são apresentados resultados médios da porcentagem de plantas cortadas por *Spodoptera frugiperda*. Neste experimento não são apresentados os CV experimentais de nenhum dos resultados de comparação entre os tratamentos da tabela. No Anexo também não constam os CVs experimentais, o que caracteriza pouco rigor estatístico.

Nenhum dos resultados referentes aos experimentos foi publicado e avaliado por pares não da empresa, o que não aponta inteira confiabilidade. Com falhas gritantes quanto a CVs experimentais

extremamente altos (acima de 50%) e à falta de dados de CVs experimentais, fica difícil avaliar os resultados dos experimentos da empresa referentes ao processo.

2. No item 3.4.2.4. Estudo de toxidez aguda das proteínas expressas no milho MIR 162 em camundongos. Não são apresentados resultados em tabelas, somente a descrição dos resultados e uma conclusão sucinta: “que a administração da dosagem proposta não produziu efeitos adversos que poderiam ser considerados como relacionados à Vip3Aa20. Não houve efeitos sobre a condição clínica, peso corporal, consumo de alimentos, etc. No anexo 9, vemos a saída dos dados brutos, sem uma organização dos mesmos em tabelas entendíveis para análise. Em 3.4.4 Casualização e identificação dos animais, se coloca que “o estudo compreendeu duas repetições (grifo meu) de um só sexo (blocos ao acaso) cada um contendo uma gaiola por grupo de tratamento.” o estudo consistiu de um grupo controle e um grupo de tratamento, cada um contendo cinco machos e cinco fêmeas”. Portanto, trata-se de um experimento com dois Tratamentos (Evento e Testemunha) e duas repetições em delineamento em Blocos ao Acaso. Isso nos parece um delineamento absurdo para se testar efeitos de tratamentos tão sensíveis e complexos, além de polêmicos. A empresa tem que explicar isso e fazer experimentos no mínimo com delineamentos adequados. No Apêndice 9, deste anexo 9, referente à Química Clínica do Sangue, em todos os animais testados aparecem a indicação: “amostra obtida insuficiente” , sem nenhuma explicação do por que e sem novos dados coletados. Nos resultados deste apêndice 9 em “resultado comentário” aparecem em todos os animais: “ sem resultado, amostra insuficiente”.

Com todas essas falhas experimentais e de delineamentos não se pode concluir que não haja efeitos significativos das proteínas do milho MIR 162 e nem que sejam inofensivas a camundongos, como o processo quer demonstrar.

3. Em 3.4.3.1. Perfil Composicional, para o estudo de equivalência substancial do milho MIR 162, foi realizado um perfil de composição química da forragem e do Grão em comparação com sua versão isogênica não GM e outros híbridos comerciais não GM. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso com 4 Tratamento

(milho MIR 162; híbrido isogênico; mais 2 híbridos comerciais não GM) em 3 repetições, em Uberlândia e Ituiutaba – MG). Novamente as regras de uso de boa estatística não são seguidas. No caso, o grau de liberdade do Resíduo, termômetro da eficiência estatística dos experimentos teria o valor de 6 (3x2), o que é simplesmente ridículo para experimentos dessa natureza. Sabe-se que o GL do resíduo para experimentos de campo seria de 11, muito acima do obtido no experimento, portanto, com falhas grosseiras. Ainda, na tabela 1, não são apresentados os CVs Experimentais das análises entre os tratamentos, o que não permite avaliar a significância ou não. Nem os valores de F, no tradicional Teste F. Em alguns casos as amplitudes entre as médias apresentadas são muito amplas, sugerindo que existem diferenças significativas, porém nada se pode concluir. Por exemplo, na tabela 3, a amplitude das médias é de (0,73-18,5); grosseiramente, o CV daria em torno de 260% (?). A impressão que dá é que tudo é levado para a não obtenção de significância, talvez para justificar a equivalência substancial.

Solicita-se à empresa que responda a essas questões ou refaça o processo, corrigindo as falhas grosseiras.

4. Em 3.5.3. Efeito da proteína Vip3A em joaninhas, o estudo foi conduzido com a substância teste Propacha-0100 (pólen) em joaninhas adultas de acordo com as diretrizes do EPA-EUA. As joaninhas adultas, predadores generalistas de lavouras de milho, receberam pólen de linhagens de milho expressando a proteína Vip3Aa19 ou o pólen controle misturado à uma dieta comercial de joaninhas. Cada tratamento constou de 3 repetições de 25 joaninhas cada, em um total de 75 joaninhas. Os resultados apresentados de significância não apontam coeficientes de variação, o que prejudica a avaliação do impacto ou não dos tratamentos. E a conclusão: “no estudo, nenhum efeito adverso foi observado nas joaninhas que consumiram dietas contendo 5% de pólen da substância-teste Propacha-0100. Ademais, a maioria dos testes foi feita nos EUA, com espécies das condições de lá com as regras daquele país. Em relação ao número de repetições, Rose et al (2007) nos bioensaios com abelhas *Apis mellifera* “estudos de laboratório para medir sobrevivência de abelhas adultas, deveria testar pelo menos seis grupos de 50 abelhas por tratamento para

detectar 50% de redução com 80% de poder estatístico”. Essas especificações é que deveriam ser bem apresentadas.

5. Em 3.5.5 Efeitos da Vip3A em minhocas (*Eisenia foetida*), a descrição dos ensaios experimentais de toxidez aguda dos efeitos da proteína VipA sobre minhocas é simplesmente ridícula, sem nível científico, não havendo rigor nem comparável a um bom relatório. Para começar, não é citado o local dos ensaios, se no Brasil ou no exterior. As diferenças estatísticas são colocadas sem referencial estatístico, como se fosse um ensaio banal. A grande importância desses organismos para a vida do solo não é sequer considerada. Sem condições de avaliação com rigor estatístico, infelizmente.

Solicita-se à empresa que responda a isso e refaça as considerações sobre o tema.

6. Em 3.5.10. Efeitos da Vip3Aa20 em abelhas (*Apis mellifera*), neste ensaio as abelhas foram expostas a Vip3Aa20 por meio da substância-teste MIR162Vip3A-0106. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência. Devido à importância econômica da espécie por um lado, e considerando que esses organismos se alimentam de grandes quantidades de pólen, inclusive de milho Bt, os polinizadores como a *Apis mellifera* merecem destaque especial na avaliação de riscos. Ademais, a abundância e a riqueza de espécies de abelhas silvestres, existentes no Brasil, tornam esse grupo de abelhas um alvo importante para as análises de risco das plantas Bt. Na tabela 4 do Anexo 17, referente à Mortalidade da prole e de abelhas adultas, chamou a atenção a forma de análise e a grande variação dos dados experimentais. As amplitudes entre os dados médios são extremamente altos, dando CVs elevados, variando de 40 a 77%, o que coloca em dúvida as conclusões de não significância. Aliás, na comparação de médias, aparecem diferentes índices para mostrar a não significância usando o Teste de Student e de Welch, quando deveriam ter sido utilizados o mesmo teste. Isso tudo para mostrar que não existiram diferenças. Como os experimentos são solicitados pela empresa e não publicados, sempre se fica em dúvida sobre o uso indevido das estatísticas para acomodar os dados. Testes de laboratório procurando somente efeitos letais e sub-letais sobre abelhas não levam em consideração os fatores exteriores e merecem,

então, a complementação com estudos de campo. Esses dados mostram a necessidade de se aprofundar os estudos em relação à atual visão simplificada do modo de ação das proteínas Bt dependendo unicamente da ligação proteína Bt – receptor específico. Nesse caso, e tendo os estudos sido feitos na Suíça, fica difícil crer que os dados possam ser concludentes. Solicitamos esclarecimentos sobre a questão.

7. Em 3.5.13. Avaliação da influência do milho MIR 162 sobre a comunidade de insetos em ambientes do Brasil, o estudo visou avaliar a influência do milho GM sobre a comunidade de insetos e a interferência dessas plantas sobre as pragas primárias de solo e parte aérea e sobre as pragas secundárias. Os estudos foram desenvolvidos nas estações experimentais da empresa em Uberlândia e Ituiutaba, ambas no estado de MG. Portanto não seriam ambientes do Brasil, mas sim em dois locais de um estado MG do Brasil. Na conclusão do experimento coloca-se que “com as armadilhas e análises utilizadas pode-se concluir que o milho GM MIR 162 não apresenta efeito adverso sobre a comunidade de insetos ou sobre o predador *Doru luteipes* ou artrópodos do solo. Na conclusão o relatorista falhou na redação da conclusão e mudou de comunidade de insetos para do predador *D. luteipes* e para artrópodos. Isso é interessante, pois o título do item do relatório é um e as conclusões são de outro. Mas fica interessante, senão vejamos. No relatório, é ressaltado que “ os ácaros representam mais de 82% do total de artrópodos coletados, sendo a maior parte dos artrópodos presentes no cerrado, que desempenham papel importante nos processos de decomposição e mineralização da matéria orgânica, favorecendo a decomposição microbiana. O autor não foi capaz de verificar na Tabela 3 do Anexo 18, que tanto no plantio como na colheita o número total do MIR 162 comparado com o Convencional eram respectivamente de 69 x 174 e 37 x 128. Essas diferenças não são significativas? Pede-se esclarecimentos à empresa.

8. Em 3.6. O Fluxo Gênico e a possível transferência horizontal de genes, somente se coloca a questão do fluxo gênico para espécies selvagens, indicando que existe uma baixa probabilidade de transferência do gene do milho MIR 162 para espécies selvagens, colocando o *Tripsacum* como a única possibilidade. Esquecendo-se das variedades não GMs, das variedades crioulas, das plantações de milho

orgânicas, etc. O alerta exatamente de hoje na FSP (10 de maio 2009) com a manchete na 1ª página: “Brasil não tem controle sobre milho transgênico: não há estrutura para separá-lo da variedade normal, alegam produtores”, fica difícil se ignorar a realidade. Existem milhares de agricultores, principalmente familiares pequenos que cultivam suas próprias variedades, denominadas crioulas, e mesmo agricultores que utilizam variedades de polinização livre, que não optaram pelos transgênicos e têm direito de continuarem com o uso dessas sementes sem serem contaminados. Nessa linha de fluxo gênico indesejável, o caso mais emblemático é o do milho. Isso porque sendo a espécie alógama e de polinização pelo vento, quem conhece o segmento da agricultura familiar, principalmente tradicional, sabe avaliar quantos milhares de variedades ditas crioulas, derivadas originalmente dos povos indígenas, existem nesse Brasil afora. E esse potencial de contaminação não tem sido considerado na CTNBio, tendo sido dito muitas vezes: “milho crioulo não existe”. Nem os trabalhos publicados recentemente pela Science (2002) e confirmados pela Molecular Ecology: Alvares-Builla (2008) sobre a constatação científica de contaminação a longuíssimas distâncias dos milhos crioulos no México, berço original da espécie, causam alguma mudança, no geral, na CTNBio. A resolução da CTNBio de coexistência do Milho OGM com Não OGM de somente 100m diz tudo. Pedem-se esclarecimentos sobre o tema à empresa.

Em função das inúmeras falhas constatadas no processo, assim como em relação às deficiências na experimentação e na análise estatística, mostram a grande dificuldade de se acreditar cientificamente nos resultados estatísticos e por conseguinte nas conclusões obtidas. Dessa forma, e considerando as deficiências apontadas também pelos vários outros relatores ad hoc, somos favoráveis ao indeferimento do processo.

IV. CONSIDERAÇÕES EM RELAÇÃO À RESPOSTA À DILIGÊNCIA ENVIADA PELA EMPRESA

Foram enviadas à empresa 11 questões, que na foram respondidas adequadamente, ou foram negligenciadas, como será apontado a seguir. Sugerimos que essas respostas sejam enviadas aos pareceristas ad hoc que muito adequadamente colocaram as questões.

- 1. A resposta foi não conclusiva acerca das questões feitas, sendo que especificamente sobre os *Trichogramma* spp nada foi respondido. Sugerimos mandar essa resposta ao consultor ad hoc que formulou a questão;**
- 2. As respostas não foram completamente respondidas. Quanto à variação na concentração de Vip3Aa20 aponta-se que existe “influência do ambiente e interações entre genótipo e ambiente”. Isso é muito importante, pois sempre se argumenta que tais interações não existem, principalmente para os piramidados. Quando é importante se considerar as interações elas ocorrem, quando o contrário, ... As respostas 2.2. e 2.3. foram evasivas. Mandar aos consultores ad hoc.**
- 3. Essa questão diz respeito ao respeito às análises e aos parâmetros estatísticos, que no geral têm vieses inadmissíveis para processos tão importantes, como para a biossegurança de OGMs por exemplo. O número de repetições já foi muitas vezes apontado como uma das grandes falhas experimentais, ao ponto de se considerar que seria possível ser até de má fê. Pois quando se quer que seja significativo o resultado, se utilizam muitas repetições o que acarreta um baixo CV experimental, facilitando resultados significativos. Ao contrário, usam-se poucas repetições. Isso seria inadmissível e até fraude. Essa possibilidade já foi apontada muitas vezes.**
- 4. Todas as questões levantadas nesse item não foram respondidas adequadamente, sendo evasivas as respostas. Pede-se enviar aos ad hocs para confirmação.**
- 5. Apesar da resposta afirmativa, a respeito da meia-vida da proteína variando de 6,0 a 12,6 dias, vem se verificando que a mesma pode persistir no ecossistema, como estudos recentes vêm sendo publicados (ver Nature, vol461/3set2009; pag 27-32).**
- 6. Em relação a essa questão novamente a resposta é evasiva, referindo-se resultados supostamente apresentados em liberações planejadas, quando deveriam ser colocadas no processo de liberação comercial para a análise adequada.**

- 7. Essa resposta foi objetiva e adequada**
- 8. Nessa questão, novamente a resposta é evasiva reportando-se a processos de liberação planejada anteriores, mas não confirmando estudos conclusivos em condições brasileiras, como foi questionado pelo consultor ad hoc.**
- 9. Nessa questão várias irregularidades estatísticas são novamente recorrentes, usando-se de subterfúgios para justificar o uso de formas não adequadas para se afirmar resultados e conclusões não bem justificadas. Por ex. na Tabela 3 apresentada para as características de conteúdo de proteína e de FDA e FDN as diferenças são significativas, sem que isso fosse considerado como conclusão. Da mesma forma, na Tabela 5 para Ferro, além do CV muito alto e destoante para o elemento Sódio. Por sua vez, na Tabela 8., não são explicadas as diferenças altamente significativas para médias de abundância de artrópodos tanto em Uberlândia como Ituiutaba.**
- 10. A questão primordial sobre a inclusão de um tratamento adicional utilizando-se inseticidas seletivos não foi adequadamente respondida.**
- 11. Novamente a questão da meia-vida é respondida de forma geral sem muita consistência, voltando-se à resposta da questão 5 já colocada: apesar da resposta afirmativa, a respeito da meia-vida da proteína variando de 6,0 a 12,6 dias, vem se verificando que a mesma pode persistir no ecossistema, como estudos recentes vêm sendo publicados (ver Nature, vol461/3set2009; pag 27-32).**

A conclusão posta anteriormente fica ainda mais afirmativa, ou o pedido de indeferimento ao processo de pedido de Liberação Comercial ao Milho MIR 162 da Syngenta Seeds Ltda.

Dr Paulo Kageyama

Membro da CTNBio

IV. Referências Bibliográficas

Andow, D.A e Hilbeck, A. (2004). Negative and positive data, statistical Power and confidence intervals. Environment. Biosafety Res. 2: 75-80.

Hilbeck, A. e Schmidt, J.E.U. 2006. Another view on Bt proteins – How specific are they and what else might they do? Biopestic. Int. 2(1): 1-50.

Kaatz, H. 2005. Auswirkungen Von Bt-Maispollen auf die Honigbiene. BMBF Vrbundprojekt: Sicherheitsforschung und monitoring zum anabu Von Bt-Mais.

Ramirez-Ramiro, R., Desneux, N. Decourtye, a., chaffiol, A. E Pham-Delégue, M.H.(2008. Does Cry 1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* ? Ecotoxicol Environ. Saf. 70: 327-33.

Raw, A., Boaventura, M.C. e Freitas G.S. 2006. The diversity of a bee fauna: the species of the Cerrados of Central Brazil. In: Kevan, P.G. e Imperatriz-Fonseca, V. (Eds) Pollinating Bees: the conservation link between agriculture and nature. 2nd Ed. Brasilia. DF. MMA. P 321.

Rose, R., Dively, G.P. e Petis, J. (2007). Effects of Bt corns pólen on honey bees: Emphasis on protocol development. Apidologie 38: 368-377.

Sabugosa-Madeira, B., Abreu, L., Ribeiro, H. e Cunha M. 2007. Bt transgenic mayze pollen and the silent poisoning of the hive. Journal of Gricultural Research. 46: 57-58.

Saxena, D. e Stotzky, G. 2001. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. American Journal of Botany. 88; 1704-1706.

Stotzky, G. 2000. 2000 Progress report. Toxins of *Bacillus thuringiensis* in trnsgenic organisms; persistence and ecological affects. Disponível na internet em <http://es.epa.gov/ncer/progress/grants/97/envbio/stotzky00.html>.