

PARECER CONSOLIDADO setoriais humana/animal

Processo Número: 01200.001982/2013-96

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda

Data de Protocolo: 13/05/2013

Próton: 19286/2013

Assunto: Liberação comercial do milho geneticamente modificado (NK603 x T25), tolerante aos herbicidas glifosato e ao glufosinato de amônio, com vistas ao livre uso no meio ambiente, registro, consumo humano ou animal, comércio ou uso industrial e qualquer outro uso ou atividade relacionada ao evento e seus subprodutos.

Assessoria: Allan Edver

Parecer: Paulo Lee Ho

Decisão: Aprovado

FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA

I - Informações gerais

O presente processo visa à autorização relativa à biossegurança do milho tolerante ao glifosato e ao glufosinato de amônio NK603 x T25, para efeito de sua liberação no meio ambiente, uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e quaisquer progênies dele derivados.

No Brasil o milho *Zea mays L.* é a segunda cultura produtora de grãos mais cultivada após a soja.

O milho NK603 x T25 é resultante do cruzamento entre o milho NK603, desenvolvido pela Monsanto Company e o milho T25 desenvolvido pela Bayer CropScience, utilizando técnicas de melhoramento clássico. O milho NK603 foi aprovado em setembro/2008(EPT 1.596/2008) e o milho T25 foi aprovado em maio/2007(EPT 987/2007), pela CTNBio.

Milho NK603 - tolerante ao glifosato, desenvolvido com a utilização da sequência de DNA codificadora *cp4 epsps*, que produz a proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), e a sequência alvo do cloroplasto. O gene *cp4 epsps* é oriundo do microrganismo *Agrobacterium sp.* Cepa CP4, uma bactéria naturalmente encontrada no solo.

O controle de plantas daninhas realizado com o uso da substância glifosato, ocorre pela inibição da enzima EPSPS produzida naturalmente pela planta. Essa enzima catalisa uma etapa crítica na via metabólica do ácido shiquímico para a biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas e microorganismos. As proteínas CP4 EPSPS possuem baixa afinidade pelo glifosato, se comparadas com a proteína EPSPS selvagem. Assim, quando o milho NK603, que expressa a proteína CP4 EPSPS, é tratado com glifosato, as plantas continuam se desenvolvendo normalmente. A ação contínua da enzima CP4 EPSPS tolerante ao glifosato catalisa a síntese dos aminoácidos aromáticos necessários ao desenvolvimento normal das plantas. A via biossintética de aminoácidos aromáticos não é encontrada em animais, o que explica a atividade seletiva do glifosato em plantas e contribui para explicar sua baixa toxicidade em mamíferos. Duas construções genéticas ("cassetes") para a expressão do gene *cp4 epsps* foram introduzidas no genoma do milho através de um único inserto, produzindo o milho NK603. O organismo doador do gene, *A. tumefaciens* cepa CP4 é uma bactéria comumente encontrada no solo e causa galhas em plantas susceptíveis, não havendo evidência científica indicando que esse microrganismo cause efeitos adversos em humanos ou em animais. Testes de toxicidade foram realizados com a enzima

EPSP-sintase isolada de vegetais transformados. A proteína CP4 EPSPS não é tóxica, conforme demonstrado por estudo de toxicidade oral aguda, no qual a CP4 EPSPS foi administrada em camundongos, na forma de dose única elevada. A proteína CP4 EPSPS foi produzida e purificada a partir da *Escherichia coli*, e sua caracterização bioquímica demonstrou ser equivalente à CP4 EPSPS produzida no milho.

A proteína purificada foi administrada oralmente a camundongos para avaliação de sua toxicidade aguda. A administração aguda foi considerada apropriada para a avaliação da segurança da CP4 EPSPS, uma vez que as proteínas tóxicas atuam por meio de mecanismos agudos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso corporal, no peso corporal cumulativo ou no consumo de alimentos entre os grupos controle (com o veículo ou soro albumina bovina) e grupos tratados com a proteína CP4 EPSPS purificada. As proteínas EPSPS estão naturalmente presentes em alimentos derivados de fontes vegetais e microbianas, e não apresentam homologia significativa de aminoácidos com proteínas conhecidas como tóxicas ou alergênicas para mamíferos. A proteína CP4 EPSPS demonstrou ser rapidamente digerida nos fluidos gástrico e intestinal *in vitro*. Além disso, proteínas EPSPS que possuem um histórico de uso seguro, estando amplamente presentes na dieta humana e animal há muitos anos.

Milho T25 - tolerante ao glufosinato de amônio. O gene *pat*, responsável pela síntese da enzima fosfotricina-N-acetiltransferase (PAT) que catalisa a conversão de L-fosfotricina (glufosinato de amônio) a produtos não tóxicos, foi inserido na planta conferindo a ela a capacidade de inativar o ingrediente ativo L-fosfotricina, conferindo à planta a característica de tolerância ao herbicida. O gene *pat* é uma versão modificada do gene isolado da bactéria natural do solo, *Streptomyces viridochromogenes*, estirpe Tü 494, e foi inserido nas células vegetais por meio de incorporação direta de DNA em protoplastos de milho (eletroporação).

A proteína PAT foi detectada em baixos níveis nos tecidos vegetais analisados e possui rápida degradação nos fluidos gástricos e intestinais, apresentando grande suscetibilidade à digestão e desnaturação térmica, sendo improvável que possa ter algum efeito tóxico ou alergênico quando consumida por humanos ou animais. A modificação genética introduzida no evento T25 não resultou em diferenças importantes de composição química relativa a nutrientes, estando dentro da faixa de variação normal entre as variedades convencionais. A espécie silvestre mais próxima do milho é o teosinte, encontrado no México e em alguns locais da América Central.

Não há no Brasil espécies silvestres com que o milho possa cruzar. A coexistência entre cultivos de milhos convencionais (melhoradas ou crioulas) e cultivos transgênicos de milhos é possível do ponto de vista agrônomo. Ainda assim, a probabilidade de fixação do alelo contendo a sequência gênica que confere tolerância ao glufosinato de amônio em uma dada população é muito reduzida na ausência de pressão de seleção.

II - Objetivo e utilização do produto combinado Milho NK603 x T25.

Gerar uma planta de milho com tolerância ao glifosato e glufosinato de amônio como ferramenta para o controle e manejo de resistência de plantas daninhas.

A utilização do milho NK603 x T25 permite a aplicação do glifosato e/ou glufosinato de amônio pós-emergência, possibilitando o efetivo controle de plantas daninhas durante a safra, reduzindo os riscos

de prejuízo da colheita, uma vez que esses dois herbicidas possuem modos de ação distintos e controlam uma ampla gama de espécies de plantas daninhas.

O glifosato se liga à proteína endógena EPSPS da planta e bloqueia a biossíntese do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP), privando a planta de aminoácidos e metabólitos secundários essenciais ao seu desenvolvimento.

Nas plantas que expressam a proteína CP4 EPSPS, as quais são tolerantes ao glifosato, como no caso do milho NK603 x T25, os aminoácidos aromáticos e outros metabólitos necessários ao seu desenvolvimento são produzidos pela ação contínua dessa proteína, mesmo em presença do glifosato (Padgett et al.,1996).

Características ambientais e de segurança favoráveis à utilização do glifosato no manejo de plantas daninhas infestantes: ausência de efeito negativo sobre a cultura na pré-emergência e de efeito residual; menor disponibilidade para lixiviação; e risco mínimo de intoxicação para mamíferos, aves ou peixes nas condições normais de uso conforme bula do produto (EPA, 1993; Giesy et al.2000; WHO,1994).

O glifosato já foi avaliado em diversos estudos científicos realizados desde o seu desenvolvimento há mais de 40 anos, os quais tem mostrado que este herbicida não é carcinogênico, não causa defeitos em recém-nascidos, efeitos mutagênicos, no sistema nervoso ou problemas reprodutivos (William et al., 2000).

A proteína PAT (fosfotricina N-acetiltransferase) introduzida no milho T25 confere a característica de tolerância ao glufosinato de amônio na planta (EPA, 1997).

Os herbicidas que têm como princípio ativo a fosfotricina agem através da inibição da enzima glutamina sintetase, resultando em acúmulo de amônia em níveis tóxicos na planta.

A enzima PAT detoxifica a fosfotricina por acetilação em um composto inativo.

O glufosinato de amônio é um herbicida não sistêmico e não seletivo utilizado principalmente no controle de plantas invasoras em pós-emergência, tanto de folhas largas como de folhas estreitas. É biodegradável, apresenta baixa atividade residual, baixa toxicidade aos humanos, animais e outros organismos da cadeia alimentar; é considerado persistente e móvel no solo, sendo que em solos arenosos até 80% pode ser lixiviado.

Nenhum efeito pleiotrópico foi observado no milho NK603 x T25 durante os experimentos de campo realizados em diferentes países e também a partir do seu uso comercial.

Diferenças significativas na morfologia, no crescimento ou no desenvolvimento do milho NK603 x T25 não foram encontradas quando este foi comparado ao milho controle convencional em experimentos de campo.

No Brasil, o monitoramento pós-colheita foi realizado nas cinco Estações Experimentais da Monsanto do Brasil. Os experimentos de campo conduzidos e o milho NK603 x T25 apresentaram comportamento semelhante ao milho controle convencional, exceto pela habilidade de ser tolerante ao glifosato e ao glufosinato de amônio.

O milho NK603 x T25 encontra-se atualmente aprovado nos Estados Unidos, Canadá, Japão, México, Coréia do Sul, Filipinas, Colômbia e Taiwan.

O milho NK603 x T25 produz as mesmas proteínas CP4 EPSPS e PAT produzidas em eventos individuais de milho geneticamente modificado, entretanto em uma só planta.

As caracterizações moleculares dos eventos individuais NK603 e T25 incluíram as análises da estabilidade dos respectivos insertos, que foram detalhadas e apresentadas à CTNBio para aprovação comercial desses eventos individuais. Os dados de segregação e estabilidade foram consistentes com as análises de *Southern blot*, as quais demonstraram a estabilidade das sequências inseridas nos eventos individuais NK603 e T25 e em sua progênie.

Não existe base científica para qualquer afirmação sobre a possibilidade dessas sequências alterarem o seu grau de estabilidade quando combinadas por melhoramento genético clássico em uma única planta.

Adicionalmente à caracterização molecular confirmatória do milho NK603 x T25, a caracterização detalhada dos eventos individuais é também apropriada para a avaliação da segurança do milho NK603 x T25.

Com base na caracterização molecular do milho NK603 x T25, existe alta probabilidade de que os insertos sejam conservados com relação às suas propriedades de herdabilidade. Os grãos colhidos (F₂) de milho NK603 x T25 são comercializados pelo produtor para uso como qualquer grão de milho e não são utilizados subsequentemente para cultivo.

Assim, como sementes híbridas de NK603 x T25 existem somente por uma geração, não há oportunidade para a estabilidade dos insertos ser comprometida.

A ausência de interação entre proteínas CP4 EPSPS e PAT permite que cada proteína seja testada independentemente nos estudos de avaliação de segurança.

A ausência de interação das proteínas CP4 EPSPS e PAT é justificada pelas seguintes evidências:

- os níveis de expressão das proteínas CP4 EPSPS e PAT no milho NK603 x T25, embora suficientes para conferir as respectivas características de tolerância ao glifosato e ao glufosinato de amônio, são baixos;

- os modos de ação e a segurança das proteínas CP4 EPSPS e PAT são bem conhecidos. A proteína PAT possui via metabólica distinta da proteína CP4 EPSPS;

- os locais de atividade biológica das proteínas CP4 EPSPS e PAT no milho NK603 x T25 são distintos. A proteína CP4 EPSPS é direcionada para o cloroplasto enquanto a PAT é direcionada para o citoplasma;

- o histórico de uso seguro das proteínas CP4 EPSPS e PAT em outros produtos combinados que expressam essas proteínas simultaneamente mostra que, nunca foram relatadas consequências adversas da expressão dessas proteínas em uma mesma planta.

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction*) pode ser aplicada para a detecção específica e identificação do DNA inserido, já que os indicadores utilizados na reação são desenhados para a identificação do evento específico. O método criado em 1983 (Mullis et al., 1994) é conhecido e difundido em várias áreas da biologia, agronomia, medicina e outras e tem como algumas de suas vantagens a alta sensibilidade e especificidade (Ferreira and Grattapaglia, 1996; Gama, 1998).

A base desta técnica de detecção de organismos geneticamente modificados está na identificação de elementos genéticos específicos presentes nos “cassetes” gênicos introduzidos no organismo, independente da metodologia de transformação utilizada.

Para os DNAs exógenos presentes no milho NK603 x T25, os iniciadores específicos devem reconhecer, portanto, as sequências dos genes *cp4 epsps* e *pat* já descritos na caracterização molecular do milho NK603 e do milho T25, ou sequências dos elementos genéticos presentes na construção que contém esses genes.

Uma grande quantidade de informações foi gerada para avaliar se a expressão das proteínas CP4 EPSPS e PAT no milho NK603 x T25 alterou de alguma forma o potencial desse milho de se tornar uma planta daninha quando comparado ao milho controle convencional. As avaliações na safra 2011/2012 levaram em conta as características fenotípicas e agronômicas, e também observou plantas voluntárias, vigor e germinação e interações ecológicas.

Os resultados das avaliações fenotípicas e agronômicas realizadas no Brasil indicam que o milho NK603 x T25 não possui características que possam conferir um risco significativo de se tornar uma planta daninha e nem resulta em risco ao meio ambiente quando comparado ao milho controle convencional.

O milho NK603 x T25 é uma alternativa importante para o manejo de plantas daninhas e pragas, sendo compatível com outras tecnologias dentro de um sistema de MIP, com plantio direto ou conservacionista.

II - Avaliação de risco à saúde humana e animal.

A proteína CP4 EPSPS não exibe efeitos tóxicos agudos em mamíferos. Resultados de estudos de toxicidade oral aguda em camundongos demonstraram que a proteína não causa toxicidade aguda ou efeitos adversos, mesmo nas altas doses testadas, muito maiores do que aquelas relativas a exposição humana.

Nos estudos com camundongo, após a administração da proteína durante um dia, os níveis de efeito não observado (NOEL) foram as doses mais altas das proteínas CP4 EPSPS e CP4 EPSPS L21 4P testadas (572 e 814 mg/kg respectivamente) presentes no milho NK603 (Harrison et al.1996;MSL 13077,1993; MSL 18267, 2002).

A baixa concentração da proteína CP4 EPSPS nos grãos do milho NK603 x T25, e sua rápida digestibilidade em fluidos digestivos simulados, fornecem segurança adicional para as conclusões sobre a segurança alimentar dessa proteína.

A espécie *Streptomyces viridichromogenes*, da qual a proteína PAT é derivada, é comumente encontrada na flora natural de microorganismos do solo, amplamente distribuídos na natureza. Plantas cultivadas no solo possuem *S. viridochromogenes* na sua superfície, existindo dessa forma histórico de consumo seguro da proteína PAT.

A proteína PAT também compartilha de similaridade estrutural e funcional com a classe de proteínas acetiltransferase, amplamente encontrada na natureza (Delaney et al., 2008; Hérouet et al.,2005).

A proteína PAT não exibe efeitos tóxicos agudos em mamíferos. Resultados de estudos de toxicidade oral aguda em camundongos demonstraram que a proteína PAT não causa toxicidade aguda ou efeitos adversos, mesmo nas altas doses testadas, muito maiores do que aquelas a que humanos são normalmente expostos. Efeitos adversos não foram observados após a administração durante um dia, na dose de 10 mg/kg da proteína PAT (Hérouet et al.,2005). A baixa concentração da proteína PAT nos

grãos do milho NK603 x T25, e sua rápida digestibilidade em fluídos digestivos simulados, fornecem segurança adicional para as conclusões sobre a segurança alimentar dessa proteína (EPA, 1997; Hérouet et al., 2005).

As proteínas CP4 EPSPS e PAT foram avaliadas quanto ao seu potencial para toxicidade a humanos e animais de acordo com recomendações da *Codex Alimentarius Commission* (Codex, 2003). Essas proteínas têm um longo histórico de uso seguro, ausência de similaridade estrutural com toxinas conhecidas ou proteínas biologicamente ativas que causam efeitos em mamíferos, e não causam toxicidade oral aguda em camundongos, além de constituírem uma fração muito pequena da proteína total presente em ração e alimentos derivados do milho NK603 x T25.

Esses aspectos, em conjunto e aliados à segurança dos eventos individuais NK603 e T25, permitem a conclusão de que é bastante improvável e inesperado que as proteínas CP4 EPSPS e PAT causem qualquer efeito tóxico em humanos e animais.

III - Avaliação de risco ao meio ambiente

O teosinte e o milho são espécies polinizadas pelo vento, auto compatíveis, altamente variáveis e estéreis (Wilkes, 1989; Wilkes, 1972). São geneticamente compatíveis, sendo que em áreas do México e da Guatemala, se inter-cruzam livremente quando próximos ou em outras condições favoráveis.

O teosinte existe primariamente como uma planta daninha nas margens dos campos de milho e a frequência dos híbridos entre teosinte e milho tem sido estudada.

Embora o milho cruze facilmente com o teosinte, esta espécie não está presente no Brasil. A distribuição natural do teosinte é limitada às zonas de secas sazonais e zonas subtropicais com chuvas de verão no México e Guatemala e ao Platô Central do México (Gonzalez and Corral, 1997; Wilkes, 1972). Dependendo da caracterização do teosinte em ambiente local, este pode ser considerado uma planta daninha. Entretanto notou-se que populações de teosinte tiveram um declínio durante várias décadas pelo aumento da pastagem e da urbanização do México (Wilkes, 1995).

As plantas de milho possuem fecundação cruzada e são largamente polinizadas com ajuda do vento, insetos, gravidade e outros. A introdução dos elementos gênicos não alterou as características reprodutivas da planta.

O milho é a espécie que atingiu o mais elevado grau de domesticação entre as plantas cultivadas, tendo perdido suas características de sobrevivência na natureza, sendo uma planta incapaz de sobreviver em condições naturais quando não assistida tecnicamente.

O fluxo gênico no milho pode ocorrer por meio da transferência de pólen e da dispersão de sementes. A dispersão de sementes é facilmente controlada, uma vez que a domesticação do milho eliminou os mecanismos ancestrais de dispersão de sementes e, portanto, o movimento de pólen é o único meio efetivo de escape de genes de plantas de milho.

As chances de fecundação cruzada entre híbridos e linhagens de milho não geneticamente modificadas e entre plantas do milho NK603 x T25 e outras plantas de milho são as mesmas.

Na avaliação do risco associado à transferência dos genes *cp4 epsps* e *pat* do milho NK603 x T25 para o milho convencional verifica-se o potencial de ocorrência da transferência de genes e o efeito que essa transferência poderia acarretar, ou seja, a consequência do fenômeno.

Não se espera que as características conferidas pelos genes *cp4 epsps* e *pat* proporcionem qualquer vantagem competitiva ou maior agressividade ao milho NK603 x T25, que poderiam resultar no milho se tornar uma espécie invasora.

As características de tolerância ao glifosato e ao glufosinato de amônio não tornam o milho NK603 x T25 uma planta daninha ou invasora de habitats naturais, uma vez que as características reprodutivas e de desenvolvimento do milho não foram alteradas.

As observações de abundância de organismos não alvos realizadas no estudo apresentado foram suficientes para concluir que o milho NK603 x T25 não difere do milho controle convencional e, portanto, não tem capacidade de causar maior impacto sobre o ecossistema do que aquele causado pelo milho convencional.

Concluiu-se também que a combinação das proteínas CP4 EPSPS e PAT em um só produto não faz com que este cause impacto adverso sobre os organismos não alvo diferente do que é observado no milho controle convencional. Portanto, o conceito de equivalência substancial permanece inalterado, a exceção do objetivo da modificação genética, que foi a introdução das características de tolerância ao glifosato e ao glufosinato de amônio concomitantemente.

Considerando:

- que os milhos T25 e NK 603 foram avaliados e aprovados individualmente pela CTNBio respectivamente em maio/2007 (EPT 987/2007) e em setembro/2008 (EPT 1596/200);
- que os eventos obedecem aos critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas;
- que o milho NK603 x T25 tem composição similar ao milho controle convencional, o que tem uma implicação importante para a segurança alimentar deste produto combinado que expressa as proteínas CP4 EPSPS e PAT;
- que não há no Brasil espécies silvestres com que o milho possa intercruzar, já que a espécie silvestre mais próxima ao milho é o teosinte, encontrado apenas no México e em alguns locais da América Central, onde pode cruzar com o milho cultivado em campos de produção;
- que o milho é uma planta incapaz de sobreviver em condições naturais, quando não assistida tecnicamente, não havendo, portanto, qualquer possibilidade de que se transforme numa planta invasora ou daninha;
- que em relação ao meio ambiente, o cultivo do milho NK603 x T25 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à do milho convencional;
- que o amplo espectro para controle de plantas daninhas conferido pela inserção dos genes tolerantes ao glifosato e glufosinato de amônio, resulta em maior flexibilidade de aplicação, permitindo a substituição de vários herbicidas seletivos com eficácia, alta degradabilidade e ausência de toxicidade;
- que o milho é a espécie que atingiu o mais elevado grau de domesticação entre as plantas cultivadas, sendo incapaz de sobreviver na natureza sem intervenção humana.
- que não foram encontradas evidências de que as proteínas expressas causem alergia ou efeito tóxico em humanos e animais.

É possível concluir que o milho NK603 x T25 é tão seguro quanto seu equivalente convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal.

Dr. Paulo Lee Ho
Relator - Membro da CTNBio
Envio eletrônico em 03/09/17