

Processo: 01200.702479/2016-02

Data de Protocolo: 23/08/2016

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

Assunto: Liberação comercial de milho geneticamente modificado para uso na alimentação humana e animal.

CQB: 003/96

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Av. Nações Unidas, 12901 – Torre Norte – 7º e 8º Andar – São Paulo – SP.

Presidente da CIBio: Geraldo Berger

Descrição do OGM: O milho MON 87460 contém o gene *cspB*, derivado de *Bacillus subtilis*, o qual codifica a proteína CSPB (do inglês Cold Shock Protein B, ou proteína de choque frio B). Ele também contém o gene *nptII*, derivado de *Escherichia coli*, o qual codifica a proteína NPTII, a qual confere resistência a neomicina e canamicina.

Classificação: Classe de Risco I

Resolução Normativa: RN 09/2011

- ✓ Designação do OGM: Milho MON87460
- ✓ Espécie: *Zea mays* L.
- ✓ Característica Inserida: resistência ao estresse hídrico.
- ✓ Método de introdução da característica: O milho MON 87460 foi desenvolvido através de transformação mediada por *Agrobacterium* de embriões imaturos de milho com o plasmídeo PV-ZMAP595.
- ✓ Uso proposto: efeito de seu uso comercial e seus derivados e quaisquer outras atividades relacionadas a esse produto para fins de alimentação humana ou animal.

1. Proteínas Expressas:

CSPB – proteína de choque frio;

NPTII - confere resistência ao antibiótico canamicina.

2. Área de Restrição Ambiental: Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação”. Também fica proibido o plantio comercial do MON 87460 no Brasil, sendo seu uso restrito na alimentação animal e humana.

3. Fundamentação Técnica:

A Monsanto desenvolveu o milho MON 87460 que reduz perdas em produtividade em condições de redução hídrica quando comparado com ao milho convencional. O “**Relatório de Biossegurança Alimentar do Milho MON 87460**” foi elaborado conforme a Resolução

Normativa nº5 de 13/03/2008, que dispõe sobre normas para liberação comercial de organismos geneticamente modificados e seus derivados. A CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. levou em consideração os resultados de estudos realizados com o milho MON 87460 nos Estados Unidos.

As informações e os resultados apresentados no “**Relatório de Biossegurança Alimentar do Milho MON 87460**” demonstram a segurança do referido evento. Assim, pelo presente parecer a CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. aprova o documento “Relatório de Biossegurança Alimentar do Milho MON 87460” e conclui pela segurança do milho MON 87460 para a saúde humana e animal, sendo o milho MON 87460 considerado tão seguro quanto o milho convencional.

No Brasil, o milho (*Zea mays* L.) é o segundo grão mais cultivado, ficando a soja em primeiro lugar. Na safra 2015/2016, a produção brasileira de grãos tem média estimada em aproximadamente 188,10 milhões de toneladas, 9,5% inferior à obtida na safra 2014/2015, de 207,8 milhões de toneladas, representando um déficit de 19,67 milhões de toneladas segundo o levantamento de agosto/2016 da CONAB (CONAB, 2015; CONAB, 2016). As razões para isso foram a redução de 12,2% da área plantada na 1º safra e fatores climáticos, déficit hídrico, que atuou sobre as plantações da 2º safra.

Informações relativas ao OGM:

A Monsanto desenvolveu o milho MON 87460 que reduz perdas em produtividade em condições de redução hídrica quando comparado ao milho convencional. A eficácia do milho MON 87460 advém da expressão da proteína de choque frio B (CSPB) oriunda de *Bacillus subtilis*. O gene *cspB* que expressa a proteína de choque frio B (CSPB) foi inserido em planta de milho utilizando o método de transformação genética mediada por *Agrobacterium spp.* O plasmídeo **PV-ZMAP595** utilizado para gerar o milho MON 87460 possui dois cassetes de expressão. O primeiro cassete expressa a proteína CSPB e o segundo expressa a proteína neomicina fosfotransferase II (NPTII), um marcador de seleção que confere tolerância a antibióticos, tais como a neomicina e paromomicina.

O cassete de expressão do gene *cspB* contém a sequência codificadora *cspB* sob regulação do promotor e sequência líder *Ract1*, do íntron *Ract1* e da sequência 3' UTR *tr7*, perfeitamente processados durante o processo de expressão do transgene no organismo receptor. Já o cassete de expressão do gene *nptII* contém a sequência codificadora *nptII* sob regulação do promotor *35S* e da sequência 3' UTR *nos*, também perfeitamente processados durante o processo de expressão do transgene no organismo receptor. A matriz do plasmídeo PV-ZMAP595, localizada fora do T-DNA, contém duas origens de replicação para a manutenção do plasmídeo em bactéria (*oriV* e *ori-pBR322*), um gene marcador de seleção bacteriano (*aadA*) e uma sequência codificadora da proteína repressora de *primer* (*rop*) para manutenção do número de cópias do plasmídeo em *E. coli*.

Caracterização molecular do inserto no organismo receptor:

Na caracterização molecular do milho MON 87460 apresentada pela empresa proponente, os resultados confirmaram que este evento possui as seguintes características: 1) presença de um único inserto com a sequência de interesse, e ausência do inserto em outras regiões do genoma; 2) ausência de sequências do plasmídeo; 3) o inserto demonstrou-se estável em

várias gerações, e 4) não houve expressão de nenhum produto gênico com similaridade às substâncias tóxicas ou alergênicas.

A estabilidade do DNA integrado e a ausência de sequências do plasmídeo em diversas gerações testadas no milho MON87460 foram também confirmadas. Estes resultados são consistentes e confirmam um único sítio de inserção que segrega nas gerações subsequentes de acordo com as Leis de Mendel.

As análises moleculares demonstraram que uma cópia intacta dos cassetes de expressão *cspB* e *nptII* foi integrada em um único *locus* cromossômico contido dentro do fragmento de restrição de *HindIII* de aproximadamente 6,8 kb. Elementos adicionais do vetor de transformação PV-ZMAP595, ligados ou não ao inserto de DNA intacto, não foram detectados no genoma do milho MON 87460. A sequência da matriz do plasmídeo PV-ZMAP595 também não foi detectada. A análise de estabilidade de gerações demonstrou que a assinatura esperada de *Southern blot* do milho MON 87460 foi mantida ao longo de sete gerações de cruzamento, confirmando, assim, a estabilidade do inserto de DNA ao longo de múltiplas gerações. Também foi possível mostrar que essas gerações não continham qualquer sequência da matriz do plasmídeo PV-ZMAP595. As análises de sequência de DNA confirmaram a identidade da sequência entre o inserto do milho MON 87460 e a porção do T-DNA do plasmídeo PV-ZMAP595 que foi integrada no genoma do milho. Esses resultados também confirmaram a organização dos elementos genéticos dentro dos cassetes de expressão *cspB* e *nptII* do milho MON 87460, que foi igual àquela do plasmídeo PV-ZMAP595. Ainda, a análise do sítio de inserção do T-DNA indica que há uma deleção de 22 pb de DNA genômico na junção de DNA inserto-planta. Análises de segregação mostram que a herdabilidade e a estabilidade dos genes *cspB* e *nptII* ocorreu como esperado ao longo de múltiplas gerações, o que corrobora a análise molecular de estabilidade do inserto e estabelece que o inserto de DNA está presente em um único *locus* cromossômico.

Efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos:

Nenhum efeito pleiotrópico foi observado no milho MON 87460 até o presente momento durante os experimentos de campo realizados em diferentes países. Diferenças significativas na morfologia, no crescimento ou no desenvolvimento do milho MON 87460 não foram encontradas quando este foi comparado ao milho controle convencional nesses experimentos de campo.

As plantas transformadas foram testadas quanto à sua capacidade produtiva de grãos em comparação com suas versões convencionais em condições de restrição hídrica (< 50% de umidade do solo durante o final do estágio vegetativo até o início do preenchimento de grãos, quando a produtividade do milho é mais suscetível ao estresse, mas sem estresse por seca total). O milho MON 87460 apresenta aumento de produtividade e dá maior estabilidade de produção em condições de restrição hídrica. O milho MON 87460 em condições de restrição hídrica demonstrou aumento da ordem de 16,5% em produtividade, 13,1% em grãos/espiga e 3,9% em peso de grãos. Resultados similares foram encontrados em outros estudos. Os resultados desses estudos demonstram que o principal contribuinte da maior produtividade no milho MON 87460, sob condições de restrição hídrica, é o maior número de grãos/espiga, o que é consistente com o entendimento atual de que o estresse hídrico causa redução no potencial de produtividade do milho.

Segurança alimentar para humano e animal:

A caracterização realizada confirmou a segurança das proteínas para o consumo humano e animal. As avaliações incluíram as seguintes metodologias: 1) caracterização das propriedades funcionais e físico-químicas de cada proteína; 2) quantificação da expressão das proteínas em diferentes tecidos das plantas; 3) avaliação da similaridade de cada proteína com substâncias tóxicas ou alergênicas e outras substâncias biologicamente ativas conhecidas que possam ter efeitos adversos para mamíferos; 4) avaliação da digestibilidade das proteínas em fluidos gastrointestinais simulados; 5) documentação do histórico de uso e consumo seguro das proteínas ou dos homólogos estruturais e funcionais que não possuem efeito adverso documentado para saúde humana ou animal; 6) avaliação da potencial toxicidade para mamíferos através de análise de administração forçada da proteína (gavagem). Todas as avaliações indicaram que as proteínas CSPB e NPTII são seguras para o consumo humano e animal.

Estas duas proteínas não possuem qualquer similaridade com substâncias tóxicas, alergênicas ou outras proteínas anti-nutricionais conhecidas. Ainda, essas proteínas são rapidamente digeridas em fluidos gástricos e intestinais simulados e nenhuma delas possui toxicidade aguda em avaliações de administração por gavagem, mesmo em doses com várias ordens de magnitude acima daquelas observadas nos cenários mais conservadores (alta dose) de exposição. Considerando todas as avaliações e análises, fica evidenciado que a exposição alimentar das proteínas CSPB ou NPTII expressas no milho MON 87460 não causam qualquer risco para a saúde humana ou animal.

Uma detalhada avaliação da composição centesimal e nutricional do milho MON 87460 comparado com o milho controle convencional e híbridos comerciais convencionais confirmou que este milho é tão seguro e nutritivo quanto o milho convencional. As amostras foram geradas a partir de seis locais diferentes nos Estados Unidos na safra de 2006 (10 anos atrás). Os resultados destas análises adicionais corroboraram que o milho MON 87460 é composicional e nutricionalmente equivalente ao milho convencional.

O documento encaminhado pela requerente trata da biossegurança alimentar do milho MON 87460, sem requerimento para plantio no Brasil, por esta razão os dados das avaliações ambientais não são aqui apresentados.

4. Parecer:

O conjunto dos dados apresentados reforça que rações e alimentos produzidos a partir do milho MON 87460 são tão seguros e nutricionalmente equivalente àqueles produzidos pelo milho convencional.

A requerente solicita o requerimento de liberação comercial desse produto com base na Resolução Normativa nº05, na caracterização molecular do milho MON 87460, nos estudos de biossegurança alimentar realizados nos USA, na literatura e no histórico de uso e exposição desse produto em diversos países, sem relatos de efeitos adversos à saúde humana e animal.

A requerente apresentou apenas a caracterização molecular e os dados de segurança alimentar do milho MON 87460. Os resultados de estudos de campo e avaliação agronômica e fenotípica não foram apresentados. Caso este evento de transformação seja exposto não intencionalmente no ambiente de outra forma que não para uso em alimentação humana e animal, a requerente ressalta que ele é tão seguro quanto o milho convencional também nas suas características agronômicas e fenotípicas.

O milho MON 87460 já se encontra aprovado nos seguintes países: **Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia, Canadá, Colômbia, Japão, China, Coreia do Sul, México, Filipinas, Taiwan, Singapura, África do Sul, Vietnã e União Europeia.** A aprovação do milho MON 87460 na União Europeia concedida pela EFSA (*European Food Safety Authority*) é apresentada no Anexo 1 do presente documento (versões original e traduzida juramentada em português). Até o momento não há um só relato de efeitos adversos desse milho à saúde humana e animal, e também ao meio ambiente nesses países onde ele se encontra aprovado.

Considerando que:

- 1) Que estudos de toxicidade oral aguda em camundongos demonstraram que essas proteínas não apresentam toxicidade aguda e não causam nenhum efeito adverso, mesmo nas doses mais altas testadas, que foram 4,7 mg/kg e 5.000 mg/kg de massa corporal para a CSPB e a NPTII, respectivamente.
- 2) As proteínas CSPB e NPTII são rapidamente digeridas em fluidos gástrico e intestinal simulados. Proteínas que são rapidamente digeridas nos sistemas gastrointestinais de mamíferos apresentam probabilidade desprezível de causar alergias quando consumidas.
- 3) As proteínas CSPB e NPTII não compartilham nenhuma similaridade de sequência de aminoácidos com alérgenos conhecidos, gliadinas, gluteninas ou proteínas tóxicas que causem efeitos adversos em mamíferos. Isso foi mostrado em avaliações utilizando ferramentas de bioinformática.
- 4) Não se espera possíveis efeitos deletérios do OGM em animais prenhes bem como também não se espera potencial teratogênico, já que as proteínas expressas não produzem efeitos adversos em animais prenhes e sua progênie, além da alta digestibilidade no trato gastrointestinal.

Sendo assim, somos pelo DEFERIMENTO do pedido da empresa Monsanto do Brasil Ltda que solicita a Liberação comercial do milho MON 87460 e seus derivados para uso exclusivo na alimentação Humana e Animal incluindo as finalidades de manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte deste Milho GM e de seus derivados. Este DEFERIMENTO NÃO INCLUI autorização para plantios comerciais do Milho 3271, ficando a cargo dos órgãos de Fiscalização e Registro observar se as determinações deste parecer se fazem cumprir, principalmente a rastreabilidade e a proteção para evitar fluxo gênico por grãos durante o transporte dos pontos de chegada no Brasil até os pontos de uso para consumo animal e humano.

Mais especificamente com o objetivo de se evitar o fluxo gênico dos grãos, considerando que o uso proposto é apenas para alimentação humana e animal, deverão ser adotadas as seguintes medidas de biossegurança:

(i) Notificar previamente o MAPA (os órgãos de registro e fiscalização) sobre o local de internalização dos grãos de milho, data, quantidade e local de destino;

(ii) Durante as operações de carga e descarga, todo o material derramado, se houver, deverá ser coletado e depositados nos veículos de transporte ou destruídos, sob a responsabilidade do importador;

(iii) O transporte do ponto de ingresso para o estabelecimento de destino deverá ser feito em "transportadores" que assegurem a cuidadosa contenção do produto, de maneira a evitar dispersão dos grãos de milho geneticamente modificado no meio ambiente;

(iv) Apenas produtos derivados de milho não contendo formas viáveis e obtidos após o processamento poderão ser utilizados para a alimentação;

(v) Nas unidades de processamento, toda a movimentação do milho importado deverá ser registrada e executada com acompanhamento de responsável técnico, de forma a evitar a dispersão no meio ambiente;

(vi) Os grãos de milho derramados inadvertidamente nas áreas próximas às unidades de armazenamento e/ou moega deverão ser coletados e ajuntados ao montante original ou destruídos, sob a responsabilidade do responsável técnico do estabelecimento;

(vii) Os resíduos provenientes da limpeza de equipamentos, silos ou armazéns de estocagem deverão ser obrigatoriamente destruídos;

(viii) Todas as fases de movimentação dos grãos deverão ser registradas de forma a se ter a rastreabilidade do produto. Toda a documentação deverá ser mantida à disposição da fiscalização;

(ix) Liberações acidentais no meio ambiente do grão de milho geneticamente modificado deverão ser imediatamente comunicados à CTNBio e aos órgãos e entidades de registro e fiscalização.

Os procedimentos e demais medidas complementares deverão ser estabelecidos pelos órgãos de fiscalização e controle.

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno

Membro da CTNBio

Dra. Maria Sueli Felipe

Membro da CTNBio

Referências:

Abimilho. 2015. www.abimilho.com.br.

Ashby, R., Hjortkjaer, R.K., Stavnsbjerg, M., Gurtler, H., Pedersen, P.B., Bootman, J., Hodson-Walker, G., Tesh, J.M.,

- Willoughby, C.R., West, H. e Finn, J.P. 1987. *Safety evaluation of Streptomyces murinus glucose isomerase. Toxicol. Lett.* 36: 23-35.
- Astwood, J.D., Leach, J.N. e Fuchs, R.L. 1996. *Stability of food allergens to digestion in vitro. Nature Biotechnology* 14:1269-1273.
- Barker, T., Campos, H., Cooper, M., Dolan, D., Edmeades, G., Habben, J., Schlusser, J., Wright, D. e Zinselmeier, C. 2005. *Improving drought tolerance in maize. In: Janick, J., editor Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. p. 173-253.*
- Campos, H., Cooper, M., Edmeades, G.O., Löffler, C., Schussler, J.R. e Ibañez, M. 2006. *Changes in drought tolerance in maize associated with fifty years of breeding for yield in the U.S. Corn Belt. Maydica* 51: 369-381.
- Claassen, M.M. e Shaw, R.H. 1970. *Water deficit effects on corn. II. Grain components. Agronomy Journal* 62: 652-655.
- Etchegaray, J.-P. e Inouye, M. 1999. *CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of Escherichia coli, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. J. Bacteriol.* 181: 1827-1830.
- FAO/WHO. 2001a. *Evaluation of allergenicity of genetically modified foods - Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United States, Roma, Itália.*
- FAO/WHO. 2001b. *Stability of known allergens (digestive and heat stability) Document Biotech 01/07. Joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. . Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, Rome, Italy.*
- Fu, T.J., Abbott, U.R. e Hatzos, C. 2002. *Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid - a comparative study. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7154-7160.
- Graumann, P., Wendrich, T.M., Weber, M.H.W., Schroder, K. e Marahiel, M.A. 1997. *A family of cold shock proteins in Bacillus subtilis is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. Molecular Microbiology* 25.
- Hileman, R.E., Silvanovich, A., Goodman, R.E., Rice, E.A., Holleschak, G., Astwood, J.D. e Hefle, S.L. 2002. *Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. International Archives of Allergy and Immunology* 128: 280-291.
- Schindler, T., Graumann, P.L., Perl, D., Ma, S.F., Schmid, F.X. e Marahiel, M.A. 1999. *The Family of Cold Shock Proteins of Bacillus subtilis. - Stability and dynamics in vitro and in vivo. Journal of Biological Chemistry* 274: 3407-3413.

Data: 01-09-2016

Dra. Maria Sueli Felipe
Membro da CTNBio

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno
Membro da CTNBio

Orlando Cardoso
Assessor Técnico