



## COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

**PARECER TÉCNICO Nº 6235/2018 - RETIFICADO**

**Processo SEI:** 01250.031453/2018-36

**Documento SEI:** 3036375, 3083813, 3120718, 3145847, 3368626, 3488784

**Data de protocolo:** 6/6/2018

**Requerente:** CTC - Centro de Tecnologia Canavieira S/A.

**CQB:** 006/96

**CNPJ:** 06.981.381/0002-02

**Presidente da CIBio:**

**Assunto:** Liberação Comercial de Organismo Geneticamente Modificado (RN5)

**Extrato Prévio:** 6074/2018 de 22/6/2018

**Decisão:** DEFERIDO

**Reunião:** 218ª Reunião Ordinária da CTNBio, ocorrida em 6/12/2018

## **I - Identificação do OGM**

**Designação do OGM:** Cana-de-açúcar geneticamente modificada para resistência a insetos, evento CTC91087-6

**Espécie:** Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)

**Característica Inserida:** Resistência a insetos da ordem Lepidoptera.

**Classificação de risco do OGM:** Classe de risco 1

**Método de introdução da característica:** O evento CTC91087-6 foi obtido por meio de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com um fragmento de DNA (T-DNA) contendo os cassetes de expressão dos genes *cryIAC* e *bar*.

**Uso proposto:** Liberação no meio ambiente, comercialização, consumo e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM, material de propagação vegetativa existente e progênies dele derivadas.

## **II - Informações Gerais**

Trata-se da solicitação do Centro de Tecnologia Canavieira sobre a Proposta de Liberação Comercial de Cana-de-Açúcar Geneticamente Modificada, Evento CTC91087-6, aprovado pela CIBio da empresa e, elaborado de acordo com a Resolução Normativa nº 05 da CTNBio, de 13 de março de 2008. Os usos propostos para a cana-de-açúcar geneticamente modificada evento CTC91087-6 são: liberação no meio

ambiente, comercialização, consumo e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM, material de propagação vegetativa existente e progênies dele derivadas.

A cana-de-açúcar geneticamente modificada CTC91087-6 possui o background genético da cultivar CTC9001 e expressa a proteína Cry1Ac constitutivamente, de forma a ser resistente à *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae). Esta espécie é popularmente conhecida como broca comum, broca-da-cana ou apenas broca.

Os ataques da broca têm como consequências perda de peso e morte dos brotos, perfilhos e colmos; enfraquecimento da planta favorecendo o tombamento; enraizamento aéreo e brotações laterais e secamento dos ponteiros de canas novas resultando em um sintoma conhecido como coração morto. Além disso, ao perfurar o colmo da planta a broca cria condições favoráveis à entrada de fungos e bactérias especialmente *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, resultando em deterioração fisiológica, microbiológica e tecnológica da cana.

Atualmente, a praga é controlada por meio de controle químico, realizado com aplicação de inseticidas, e controle biológico, através da liberação de predadores e parasitoides, com o uso principalmente da vespa *Cotesia flavipes*, um endoparasitoide larval e o *Trichogramma galloi*, parasita dos ovos da broca-da-cana. Apesar de consistirem importantes ferramentas de controle, há desvantagens como alto custo financeiro, exposição direta e indireta de pessoas aos componentes químicos, crescente questionamento da população sobre as aplicações aéreas, consumo de água e emissão de gases do efeito estufa, no caso do controle químico, e o dispendioso trabalho no caso do controle biológico.

Dados de dezembro de 2016 sugerem que a broca da cana é responsável por perdas anuais no valor de R\$ 4,88 bilhões em Margem de Contribuição Agrícola e Industrial (MCAI), se considerarmos a área total cultivada de cana no Brasil (ALMEIDA, 2016).

A proteína Cry1Ac expressa pelo evento CTC91087-6 é 100% idêntica aos 613 primeiros aminoácidos da proteína de tamanho completo (113,1 kDa) isolada de *Bacillus thuringiensis*. O evento CTC91087-6 expressa ainda a proteína PAT, que codifica para a enzima acetilfosfotransferase, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, utilizado como marcador de seleção no processo de transformação. Foi utilizada a versão da proteína PAT codificada pelo gene *bar* derivado de *Streptomyces hygroscopicus*. O único objetivo da inserção do gene *bar* no evento CTC91087-6 foi a seleção de células transformadas com o gene *cry1Ac*.

O herbicida glufosinato de amônio tem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob número 000691, com o objetivo de facilitar a desfolha da cana-de-açúcar durante a colheita. A liberação do MAPA é para realização de uma única aplicação do herbicida sobre as folhas da cana-de-açúcar na pré-colheita, quando a cultura se encontrar no final do estágio de desenvolvimento vegetativo e antes da emissão da inflorescência, sendo que o equipamento de aplicação é o aéreo (MAPA, 2018). Sendo assim, o herbicida glufosinato de amônio não é utilizado para o controle de ervas daninhas na cultura da cana-de-açúcar e, também, não poderá ser utilizado no manejo do evento CTC91087-6 em condições de campo.

### III - Caracterização Molecular do Evento

O evento CTC91087-6 foi obtido por meio de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com um fragmento de DNA (T-DNA) contendo os cassetes de expressão dos genes *cry1Ac* e *bar*. O vetor pCTC001 foi utilizado como base para clonagem e multiplicação do T-DNA que contém os cassetes alvo e de seleção que foram inseridos no evento CTC91087.

Este vetor foi sintetizado com a finalidade única de permitir a clonagem de regiões nucleotídicas de interesse e garantir a transferência do T-DNA para o genoma da cana-de-açúcar.

O gene *cry1Ac* produz uma  $\delta$ -endotoxina que é naturalmente encontrada na bactéria não patogênica *Bacillus thuringiensis* que vem sendo empregada em produtos bio-inseticidas amplamente empregados na agricultura orgânica. A proteína Cry1Ac é tóxica para insetos lepidópteros, incluindo a broca da cana-de-açúcar, devido a uma interação específica com receptores presentes no intestino do inseto. Quando esta interação específica

proteína-receptor ocorre, há uma disrupção da função e integridade do intestino que leva à toxicidade e consequente morte do inseto. Esses receptores da proteína Cry1Ac são encontrados apenas no intestino de insetos da ordem Lepidoptera, conferindo a especificidade deste efeito tóxico, confirmada por estudos extensivos sobre a inocuidade desta proteína em outros insetos e animais. A proteína PAT (*bar*) é uma enzima, fosfinotricina-acetiltransferase, que catalisa a acetilação e detoxificação do herbicida glufosinato, que foi utilizada como marcador seletivo in vitro, para a seleção de calos que incorporaram a construção genética no processo de transformação. O gene *bar* foi isolado de *Streptomyces hydropiscus*, uma bactéria não patogênica muito estudada. Uma bactéria intimamente relacionada *S. viridochromogenes* produz uma versão da proteína PAT altamente homóloga, PAT (*pat*), com 86% de homologia com a proteína PAT encontrada no evento CTC91087-6.

O DNA integrado no genoma do evento CTC91087-6 foi caracterizado utilizando várias metodologias. O número de cópias dos genes heterólogos foi previamente estimado por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os resultados indicaram que uma cópia do inserto contendo uma única cópia de ambos os genes *cry1Ac* e *bar* foi integrado no genoma do evento e, que não houve integração de sequências referentes ao esqueleto (*backbone*) do plasmídeo utilizado na transformação. Análises de *Southern blot* utilizando sondas homólogas às sequências do gene *cry1Ac* e do promotor UBI-1 corroboraram as evidências de integração de uma cópia dos genes *cry1Ac* e *bar* em um único inserto e ausência de integração parcial de elementos do T-DNA em outros sítios do genoma do evento CTC91087-6. Adicionalmente, foram realizados ensaios de *Southern blot* com três sondas sobrepostas desenhadas para cobrir toda a extensão do *backbone* do plasmídeo utilizado na transformação. Esses ensaios também não detectaram qualquer integração de *backbone* no genoma do evento CTC91087-6.

O grau de estabilidade genotípica do evento CTC91087-6 também foi verificado via metodologia de *Southern blot* que comprovou que a integração do cassete se manteve constante durante seis gerações de propagação vegetativa representando os diferentes ciclos da cultura (cana planta e socas). Esse resultado corrobora o fato de que o T-DNA se fixa no genoma da cana-de-açúcar uma vez que o sistema de propagação vegetativo da cultura utilizado nos plantios comerciais não permite a segregação genética.

Finalmente, o sequenciamento completo do T-DNA e das regiões flanqueadoras foi realizado utilizando metodologia de PCR inversa (iPCR) e sequenciamento de captura (*capture sequencing*). As metodologias produziram resultados concordantes que foram posteriormente confirmados utilizando *primers* de PCR complementares às regiões flanqueadoras e sequências internas do inserto propriamente dito. Esses *primers* permitiram amplificar completamente o T-DNA e suas regiões flanqueadoras em dois fragmentos de DNA que foram posteriormente sequenciados via metodologia *Sanger* e alinhados para criar a sequência final consenso e o mapa de integração.

Resumidamente, os dados de *Southern blot*, qPCR e sequenciamento de DNA indicam que o evento CTC91087-6 contém uma única integração de T-DNA, que codifica as proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*), e não contém qualquer sequência referente ao *backbone* do vetor utilizado na transformação genética. Os dados também confirmam que essa inserção de T-DNA é estável ao longo de seis gerações de propagação vegetativa.

Não existe relatos de interação entre as proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) a despeito dos vários eventos que expressam essas proteínas isoladas ou conjuntamente. Tampouco existem relatos de que essas proteínas apresentem efeitos pleiotrópicos ou epistáticos.

Para avaliar a expressão dos genes *cry1Ac* e *bar* via ELISA foram estudados diferentes tecidos de cana-de-açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura. Os resultados demonstram que os níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) em colmos do evento CTC91087-6 são muito baixos e que os níveis de expressão da proteína Cry1Ac nas folhas do evento CTC91087-6 permanecem altos ao longo de todo o ciclo de cultivo, garantindo a resistência a *Diatraea saccharalis*.

Foram apresentadas as técnicas de detecção que podem ser utilizadas para identificar o evento CTC91087-6.

#### IV - Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

Uma análise detalha da expressão das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) em folhas, colmos e raízes do evento CTC91087-6 foi realizada. Foram colhidas amostras de folhas aos 100, 200 e 300 dias após o plantio (DAP) para monitorar a expressão das proteínas ao longo de um ciclo típico de cultivo de cana-planta. Além disso, foi monitorada a expressão das proteínas heterólogas em ciclo de cana-planta (60 e 120 Dias Após Plantio - DAP) e cana-soca (60 e 120 Dias Após Corte - DAC). Também foram coletadas amostras de colmos e raízes aos 330 DAP para medir a concentração dessas proteínas no momento usual de colheita da cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos para folha, colmo e raízes indicam que o evento CTC91087-6 apresenta níveis de expressão da proteína Cry1Ac muito maiores que a expressão de PAT (*bar*). Por exemplo, em folhas, a expressão média de Cry1Ac ao longo dos tempos/locais amostrados variou de 26,9 a 33,3 µg/g peso fresco enquanto que a expressão média de PAT (*bar*) variou de 0,11 a 0,18 µg/g peso fresco. A concentração média de Cry1Ac em folhas do evento CTC91087-6 ao longo do ciclo de cana-planta permaneceu constante (ou decresceu levemente) ao longo dos tempos de coleta de 100, 200 e 300 DAP, com concentrações de 26,9; 29,8 e 33,3 µg/g peso fresco, respectivamente.

O efeito do corte nos níveis de expressão também foi avaliado. A concentração média conjunta dos locais de Cry1Ac nesses períodos de coleta foram 36,2 e 51,1 µg/g (60 e 120 DAP) e 23,1 e 29,2 µg/g peso fresco (60 e 120 DAC). Os níveis de expressão de PAT (*bar*) foram 0,11 e 0,18 (60 e 120 DAP) e 0,16 e 0,19 µg/g peso fresco (60 e 120 DAC).

Os dados de expressão de colmo, conjuntos para locais, colhidos aos 330 DAP, mostraram que os níveis de expressão de Cry1Ac e PAT (*bar*) foram 3,65 µg/g peso fresco e 0,01 µg/g peso fresco, respectivamente. A média de expressão de Cry1Ac aos 330 DAP nos cinco locais variaram de 2,53 a 4,27 µg/g peso fresco. Os valores de expressão de ambas proteínas, Cry1Ac e PAT (*bar*), em raízes do evento CTC91087-6 são muito baixos, e se mostraram abaixo do limite de detecção da técnica.

Concluindo, os níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) no evento CTC91087-6 foram caracterizados em diferentes tempos, tecidos e locais de plantio representativos do cultivo da cultivar CTC91087-6 no Brasil. Os níveis de expressão da proteína Cry1Ac nas folhas do evento CTC91087-6 permanecem altos ao longo de todo o ciclo de cultivo, garantindo resistência a *Diatraea saccharalis*. Os níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) em colmos do evento CTC91087-6 são muito baixos e, portanto, a exposição alimentar às proteínas heterólogas via consumo do caldo ou de produtos derivados será mínima.

A caracterização detalhada das proteínas heterólogas confirmou que o evento CTC91087-6 expressa as proteínas de tamanho esperado Cry1Ac (68.7 KDa) e PAT (*bar*) (20.6 KDa). Análises de sequenciamento e bioinformática da construção genética e das sequências inseridas no evento CTC91087-6, bem como *Western blot* e sequenciamento das proteínas expressas, demonstraram que as proteínas heterólogas expressas pelo evento CTC91087-6 são idênticas às sequências de aminoácidos de proteínas presentes em eventos comerciais.

Dada a identidade de sequência das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*), a biossegurança do evento CTC91087-6 foi estudada por meio da revisão da extensa literatura científica existente para as proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*). Estas proteínas estão entre as proteínas mais utilizadas e estudadas em programas de melhoramento via biotecnologia, tendo sido examinadas e consistentemente aprovadas por reguladores em mais de 20 países, nos últimos 20 anos. Culturas derivadas da Biotecnologia, contendo as proteínas Cry1Ac e PAT (*bar* ou *pat*) apresentam atualmente um amplo histórico de uso seguro, em mais de 20 países, tendo obtido pelo menos 110 e 460 aprovações regulatórias, respectivamente.

A segurança alimentar humana e animal do evento CTC91087-6 foi realizada seguindo as recomendações da Resolução Normativa N° 05 da CTNBio e do WHO Codex Alimentarius Guidance (2003) e considerou a biologia da cana-de-açúcar, seus usos tradicionais, os usos pretendidos do evento CTC91087-6, a natureza dos genes inseridos, os organismos doadores e as proteínas heterólogas produzidas. Dessa forma, foram analisados os fenótipos e a composição nutricional do evento CTC91087-6, de acordo com as orientações da OECD (2011), incluindo as possíveis presenças de toxinas, alérgenos e substâncias antinutricionais sobre a segurança alimentar humana e animal do evento CTC91087-6. Adicionalmente, as potenciais propriedades tóxicas ou alergênicas das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) e do processamento da cana-de-açúcar na segurança alimentar humana e animal do evento CTC91087-6 também foram avaliadas.

Os estudos de composição nutricional, conduzidos de acordo com as recomendações da OECD (2011), demonstraram que o evento CTC91087-6 possui equivalência nutricional com a cultivar parental CTC9001, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados: sacarose, proteína, fibra (bruta, FDN e FDA), lipídeos, cinzas e umidade. Estudos demonstraram que o processamento e o refino da cana-de-açúcar resultam na perda completa do DNA e proteínas heterólogos para níveis não detectáveis pelas metodologias atualmente disponíveis. Estudos com o açúcar derivado do evento CTC91087-6 confirmaram a ausência de DNA específico do evento e a ausência das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) no produto final.

Estudos toxicológicos de administração oral das proteínas purificadas Cry1Ac e PAT (*pat*) demonstraram valores de NOAEL (Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis) muito altos, de aproximadamente 5.000 mg/kg peso corporal. Muitos estudos de segurança alimentar foram conduzidos com materiais contendo a proteína Cry1Ac, incluindo produtos microbiológicos e culturas expressando Cry1Ac e PAT. Estes estudos incluem: estudos de alimentação de ratos por 90 dias com grãos contendo ambas proteínas e estudos que avaliaram produtos microbiológicos incluindo efeitos de administração de tais produtos em humanos. Estes estudos não encontraram efeitos adversos.

A alergenicidade dessas proteínas também foi avaliada. A análise de bioinformática atualizada apresentada demonstrou que as proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) não têm homologia com alérgenos conhecidos. Além disso, estudos publicados com as proteínas purificadas demonstraram que ambas proteínas são rapidamente degradadas em Fluido Gástrico Simulado (SGF) e Fluido Intestinal Simulado (SIF) e que as proteínas são desnaturadas por aquecimento. Baseados no longo histórico de uso seguro das proteínas Cry1Ac e PAT na agricultura e na alimentação, e na homologia direta das proteínas expressas no evento CTC91087-6 com as proteínas Cry1Ac e PAT estudadas e aprovadas em eventos comerciais, bem como, estudos prévios, as principais agências regulatórias do mundo concluíram que essas proteínas não são tóxicas, tampouco alergênicas.

O consumo das proteínas heterólogas devido à ingestão do evento CTC91087-6 e produtos derivados em qualquer situação será muito menor que os valores de NOAEL estimados para ambas as proteínas, levando a margens de segurança extremamente elevadas. A exposição alimentar humana pode se dar via consumo direto (colmos de cana-de-açúcar ou caldo de cana) ou via produtos alimentares processados tais como açúcar e melado. É difícil estimar precisamente o consumo típico de cana-de-açúcar in natura ou de caldo de cana no Brasil devido à falta de estimativas oficiais uma vez que a produção e consumo desses produtos se dá principalmente no mercado informal. Considerando que o evento CTC91087-6 expressa aproximadamente 3,65 µg de Cry1Ac e 0,01 µg de PAT (*bar*) por grama de peso fresco de colmo, é possível calcular a quantidade de cana-de-açúcar necessária para atingir a NOAEL de cada proteína. Especificamente, um brasileiro com peso de 60 kg teria que consumir aproximadamente 82 e 30.000 toneladas de cana-de-açúcar para atingir o NOAEL das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*), respectivamente. Baseando-se nesta análise e no fato de que a cana-de-açúcar não produz toxinas ou composto anti-nutrientes (OECD, 2011) é possível concluir que o consumo alimentar humano de derivados não processados do evento CTC91087-6 (cana-de-açúcar in natura e caldo de cana) é seguro.

No entanto, a principal forma de consumo de cana-de-açúcar por humanos se dá na forma de açúcar, tanto no mercado doméstico quanto no mercado exterior. O processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar envolve altas temperaturas e ajustes de pH que reconhecidamente precipitam e eliminam macromoléculas como DNA e proteínas (CULLIS et al., 2014). Estima-se que o consumo médio de açúcar adicionado no Brasil seja de 47,6 g/pessoa/dia (KENNEDY et al., 2018). CULLIS et al. (2014) determinaram que o açúcar refinado não contém qualquer proteína total de planta até o limite de detecção (LOD) de 1 µg/g de açúcar refinado.

Consequentemente, o consumo teórico das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) estimado no “pior cenário” é de 0,79 µg/kg peso corporal/dia (considerando o LOD de detecção de total proteína de 1 µg/g de açúcar refinado e uma pessoa de 60 kg que consome 47,6 g de açúcar/dia). Também é possível calcular as margens de segurança para ambas proteínas considerando os valores de NOAEL divididos pelos valores de consumo estimados no “pior cenário”. Uma vez que ambas proteínas possuem valores de NOAEL de consumo oral de 5,000 mg/kg peso corporal/dia, as margens de segurança de ambas as proteínas equivalem a  $6,3 \times 10^6$ . Apesar desta margem astronômica grande, este valor baseado no “pior cenário” de exposição é uma superestimativa uma vez que: 1) assume que todo açúcar consumido é derivado do evento CTC91087-6 e 2)

assume que todo o a proteína residual no LOD (CULLIS et al., 2014) é ou Cry1Ac ou PAT (*bar*). KENNEDY et al. (2018) conduziram um estudo de caso similar a respeito de consumo teóricos de países representativos do mundo, incluindo o Brasil, e chegaram a margens de segurança similares.

Análises similares a respeito de consumo teórico de substâncias altamente purificadas demonstram que o consumo de ingredientes alimentícios produzidos a partir do evento CTC91087-6 é seguro. De maneira similar, o processamento da cana-de-açúcar para produzir cachaça também envolve condições estridentes. As proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*), assim como as proteínas endógenas da cana-de-açúcar, não codestilam com o etanol e, mesmo que o fizessem, seriam precipitadas nas altas concentrações de etanol encontradas na cachaça. Para o propósito desta análise de risco, é assumido que as proteínas heterólogas são completamente removidas da cachaça antes do consumo humano. Concluindo, o consumo humano das proteínas heterólogas nos alimentos processados ou in natura e nas bebidas derivados do evento CTC91087-6 é insignificante quando comparado com as altas quantidades das proteínas já demonstradas seguras em animais.

No Brasil, também há o uso de cana-de-açúcar para forragem de gado na época seca. A segurança das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*) presentes no evento CTC91087-6 foi avaliada para este uso. Assim como no cenário de exposição alimentar humana a derivados de cana in natura descrito acima, a quantidade de forragem necessária para exceder os valores estimados de NOAEL são extremamente altos. Por exemplo, uma vaca de 200 kg teria que consumir 1.000 g de Cry1Ac para atingir o NOAEL das proteínas Cry1Ac e PAT (*bar*). Considerando a expressão de 3,65 µg de Cry1Ac/g de peso fresco de colmos, uma vaca de 200 kg teria que consumir 273 toneladas de forragem produzida com colmos do evento CTC91087-6 para exceder a NOAEL desta proteína. Mesmo considerando que as vacas fossem alimentadas somente com folhas do evento CTC91087-6, onde a expressão da proteína Cry1Ac pode atingir níveis de 50 µg de Cry1Ac/g de peso fresco, seria necessário que a vaca consumisse 20.000 kg de folhas para exceder o NOAEL dessa proteína.

A avaliação das exposições potenciais humana a produtos in natura ou processados derivados do evento CTC91087-6, e da exposição do gado à forragem derivada do evento CTC91087-6, levam à conclusão que o consumo alimentar humano e animal do evento CTC91087-6 é tão seguro quanto o consumo da cana-de-açúcar convencional.

O cultivo e uso disseminado e ininterrupto de vários organismos que tiveram a inserção desses mesmos genes (soja, milho, algodão) por muitos anos sem haver qualquer registro de efeito prejudicial ao homem ou aos animais corrobora a conclusão de que a introdução desses genes a plantas de consumo humano e animal não interfere no grau de segurança dessas plantas em relação a plantas equivalentes que não tiveram a inserção desses genes.

## V - Aspectos Ambientais

A cana-de-açúcar não é nativa do Brasil e, portanto, é considerada uma espécie exótica nos ecossistemas brasileiros. O centro de origem da espécie é o sudeste da Ásia e Ilhas da Melanésia. Ela chegou ao Brasil logo após o descobrimento, junto com a implementação das primeiras capitâneas. (MIOCQUE, 1977). Hoje ela é cultivada em praticamente todos os estados brasileiros, ainda que em alguns deles não de forma extensiva. Sendo uma planta exótica, não há qualquer possibilidade de hibridação introgressiva, pois nenhuma das espécies ancestrais do complexo *Saccharum* (DANIELS e ROACH, 1987) ocorre no Brasil.

As cultivares comerciais modernas de cana-de-açúcar, dentre as quais se encontram a cultivar em análise, são híbridos de várias espécies pertencentes ao gênero *Saccharum*. Estas espécies (*S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi* e *S. sinense*) são todas originadas do Sudeste Asiático (MOORE et al., 2014). Ainda que várias espécies de *Saccharum* tenham contribuído para dar origem às cultivares comerciais atuais da cana, elas são o resultado do cruzamento entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (DILLON et al., 2007) e, foram desenvolvidas por melhoramento genético realizado no final do século XIX (MATSUOKA et al., 1999), com o objetivo de reunir características de interesse presentes nas diferentes espécies.

Dessa forma, pode-se dizer que as cultivares de cana-de-açúcar atualmente comercializadas são híbridos interespecíficos, sendo *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum* os que mais contribuíram para o genoma

dessas cultivares. *S. sinense*, *S. barberi* e *S. robustum* provavelmente deram contribuições de menor expressão para algumas cultivares específicas (MATSUOKA et al., 1999). *S. officinarum* apresenta um número de cromossomos  $2n = 80$ , com um número básico de cromossomos igual a 10, sendo portando octaplóide (oito cópias de cada cromossomo) (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2011). Mas *S. officinarum* é mais do que poliploide, é também autopoliploide (possui mais de duas cópias de cromossomos homólogos provenientes de uma única espécie) e alopoliploide (possui duas ou mais cópias de cromossomos híbridos) (SREENIVASAN et al., 1987). Por outro lado, *S. spontaneum* é uma espécie altamente polimórfica, vigorosa, resistente a doença e com um alto teor de fibra. Ela apresenta  $2n = 40$  e 128 cromossomos e é um poliploide complexo, com um número básico de cromossomos igual a 8 ou 10 (D'HONT et al., 1996). As cultivares modernas apresentam número de cromossomos variando de  $2n = 100$  a 130, indicando alta ploidia com presença de aneuploidia (GRIVET e ARRUDA, 2002). Surpreendentemente, os grupos de homologia da cana-de-açúcar podem apresentar diferentes números de cromossomos. Estima-se que os níveis de ploidia mais prováveis variem entre 6 e 14, mas que podem ser tão altos quanto 20 (GARCIA et al., 2013).

No Brasil, existem três espécies nativas que foram recentemente reclassificadas como pertencentes ao gênero *Saccharum* (anteriormente *Eryanthus*): *S. villosum*, *S. angustifolium* e *S. asperum*. Não é esperado que tais espécies tenham capacidade de hibridização com as cultivares modernas de cana-de-açúcar devido a não coincidência de centros de origem e, por consequência, devido às diferenças nas histórias evolutivas. Dados apresentados na Audiência Pública N° 06, promovida pela CTNBio em Brasília em 06 de outubro de 2016, indicam que nenhuma das plantas dessas espécies, até agora estudadas, pode receber pólen de outra espécie, nem doar pólen para outra espécie em condições naturais e que, se o cruzamento existir, ele deve ser extremamente raro.

De fato, não existe nenhum relato na literatura sobre a hibridização das cultivares modernas de cana-de-açúcar e as espécies nativas de *Saccharum* no Brasil, a despeito desta cultura estar sendo cultivada extensivamente há cinco séculos no país e as espécies nativas serem alvo de interesse de vários trabalhos científicos. Similarmente, não há preocupação de escape gênico para cultivos de cana-de-açúcar convencional uma vez que a cana-de-açúcar não é propagada comercialmente via sementes.

A cana-de-açúcar é propagada comercialmente por meio de reprodução vegetativa através do plantio de colmos segmentados e, conseqüente, brotação de suas gemas laterais. O florescimento, apesar de ser essencial para programas de melhoramento genético, é prejudicial à produtividade da cultura, uma vez que a sacarose, ao invés de ser armazenada no colmo, é consumida durante a formação das panículas, resultando em um fenômeno conhecido como isoporização. A principal consequência da isoporização é a redução no volume de caldo e conseqüente diminuição da produtividade. Por este motivo, os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar trabalham no sentido de desenvolver variedades que tendem a não florescer nas áreas a que são destinadas. Dados históricos de florescimento do programa de melhoramento do CTC indicam que, quando comparada com outras cultivares modernas, a cultivar CTC9001 apresenta níveis medianos de florescimento.

O florescimento de cana-de-açúcar é um processo complexo, que além de depender do genótipo da planta, é altamente influenciado por fatores ambientais tais como o fotoperíodo, a temperatura e a umidade, o que favorece a ocorrência desse fenômeno a regiões específicas do globo terrestre. No Brasil, de maneira geral, as condições ideais para o florescimento de variedades de cana-de-açúcar ocorrem em regiões litorâneas do Nordeste que possuem altas temperaturas e umidade e se localizam próximas ao Equador. Por este motivo, as estações de melhoramento brasileiras se encontram nessa região, inclusive a estação do melhoramento do CTC que se localiza em Camamu (BA). Nas condições de cultivo da região Centro-Sul, o florescimento é desfavorecido e, mesmo quando ocorre, a viabilidade do pólen e das sementes é comprometida pois o florescimento ocorre tardiamente, no inverno, que apresenta baixas temperaturas e umidades (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2018).

O evento CTC91087-6 não apresentou alteração da capacidade de reprodução assexuada em relação a cultivar parental **CTC9001**, avaliada por meio da germinação e vigor de Mudas Pré-Brotadas (MPB) em casa de vegetação e capacidade de perfilhamento em campo. Não houve indução ambiental do florescimento do evento CTC91087-6, da cultivar CTC9001 e das referências comerciais nos experimentos conduzidos para realizar a caracterização fenotípica do evento CTC91087-6 no período avaliado. Esses resultados confirmam que o florescimento da cana-de-açúcar ocorre apenas esporadicamente em anos que apresentam condições ambientais favoráveis. O fato de a cana-de-açúcar apresentar restrições quanto a sua reprodução

sexuada e só ser propagada comercialmente via propagação assexuada, faz com que a cana-de-açúcar não apresente populações espontâneas no meio ambiente brasileiro, não sendo uma espécie invasiva. De fato, a cana-de-açúcar só é encontrada associada a atividades humanas.

O evento CTC91087-6 possui duas características que o difere da variedade parental CTC9001: a resistência ao inseto *D. saccharalis* devido à inserção do gene *cry1Ac*, e a tolerância ao herbicida glufosinato de amônio devido à inserção do gene *bar*. Esta última característica teve utilidade nas primeiras etapas de seleção de transformantes *in vitro*, como parte do processo de obtenção do evento geneticamente modificado. Além dessas, nenhuma característica adicional foi apresentada pelo evento, de acordo com resultados de diferentes testes, experimentos e observações.

Os resultados apresentados demonstram que o evento CTC91087-6 não difere da cultivar CTC9001 em relação à sua taxa de degradabilidade, à capacidade de adicionar ou remover substâncias ao solo, tampouco com sua capacidade de influenciar positiva ou negativamente a microbiota do solo.

O efeito da proteína Cry1Ac sobre organismos não-alvo foi conduzido em uma variedade de espécies não lepidópteras para submissões regulatórias relacionadas a plantas produtoras de Cry1Ac (CERA, 2011). Os organismos de teste incluíram *Apis mellifera* adulta e larva, coleópteros predadores (*Hippodamia convergens*), neurópteros (*Chrysoperla carnea*), Hymenoptera parasitas (*Nasonia vitripennis*), bem como, as espécies *Folsomia candida* e *Xanylla grisea*. Nenhum destes organismos mostrou uma resposta significativa à proteína Cry1Ac nas concentrações testadas.

O CTC comprovou a resistência a insetos presentes no evento CTC91087-6 por meio da condução ensaios de eficácia com inoculação massiva de larvas de *Diatraea saccharalis*. O evento demonstrou apresentar resistência à *D. saccharalis* quando comparado à variedade parental CTC9001 em quatro localidades representativas da área de cultivo da CTC9001: Piracicaba, Barrinha e Valparaíso (SP) e Quirinópolis (GO). Esta resistência ao ataque da brocada- cana pode ser verificada pela menor intensidade de infestação, medida pelo número de colmos que apresentaram danos pelo inseto. A resistência do evento CTC91087-6 também foi constatada em ensaios de diluição. Larvas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta contendo folhas do evento CTC91087-6 diluídas na proporção de 25× apresentaram desenvolvimento atrasado quando comparadas com insetos alimentados com dieta com folhas da cultivar CTC9001 diluídas na mesma proporção, indicando que o evento CTC91087-6 apresenta alto índice de resistência à *D. saccharalis*.

Além da comprovação da eficácia do evento CTC91087-6 sobre o inseto alvo da tecnologia, *Diatraea saccharalis*, também foi avaliado o possível efeito do evento CTC91087-6 sobre outras pragas secundárias da cultura da cana-de-açúcar pertencentes a ordem Lepidoptera e que, portanto, poderiam ser potencialmente afetados pela expressão da proteína Cry1Ac. Foram avaliados as seguintes espécies: broca gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus*), lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), curuquerê dos capinzais (*Mocis latipes*) e *Helicoverpa armigera*. Os resultados indicam que o evento CTC91087-6 possui efeitos potenciais sobre a broca gigante e a curuquerê dos capinzais. Por outro lado, mesmo em condições ótimas de inoculação artificial, o evento CTC91087-6 não apresentou efeitos sobre o desenvolvimento da lagarta do cartucho ou sobre *H. armigera*, indicando que o evento CTC91087-6 não terá a capacidade de controlar tais insetos nas condições reais de cultivo da cana-de-açúcar. Conclui-se que nem todos lepidópteros possuem os mecanismos de suscetibilidade à proteína Cry1Ac e, por consequência, nem todas as pragas lepidópteras de cana-de-açúcar serão afetadas pelo cultivo do evento CTC91087-6.

A avaliação do impacto do cultivo do evento CTC91087-6 sobre a comunidade de artrópodes não-alvo visitantes nas áreas de cultivo da cana-de-açúcar foi realizada por meio da instalação de armadilhas de coletas instaladas em experimentos realizados em localidades representativas da área de plantio da cultivar CTC9001: Piracicaba-SP, Barrinha-SP, Valparaíso-SP, Quirinópolis-GO e Camamú-BA. Foram feitas coletas em armadilhas e análise da abundância geral dos organismos não-alvo coletados durante o desenvolvimento da cultura em quatro momentos distintos. Foram realizadas 422 comparações em análise por local e 27 comparações em análise conjunta. Foram verificadas 24 diferenças significativas entre o material teste e o material controle nas análises por local e nenhuma diferença significativa na análise conjunta. Os dados sugerem que a presença das proteínas Cry1Ac e/ou PAT (*bar*) em folhas, colmos ou raízes não interfere significativamente na abundância e visitação de organismos não-alvo do evento CTC91087-6 em comparação à variedade controle CTC9001. Dessa forma, é possível concluir que baseado nos tempos de coleta, locais de amostragens e tipo de armadilhas utilizadas, existe equivalência substancial entre o evento

CTC91087-6 e a variedade controle CTC9001. É fato que o ambiente de monocultivo de cana-de-açúcar pode ser considerado como empobrecido em relação a abundância e número de insetos e outros artrópodes, pela razão do monocultivo e agroquímicos de amplo espectro utilizado no plantio e condução das soqueiras. Não obstante, mesmo nessa condição, as diferenças significativas são pontuais e não se repetem ao longo dos tempos de avaliação ou entre os locais de condução do estudo.

No geral, as avaliações realizadas e apresentadas neste documento demonstram que o evento CTC91087-6 é equivalente em todas as características fenotípicas, agrônômicas, fisiológicas, bioquímicas e industriais ao seu parental, exceto pelas características conferidas pelos genes introduzidos: o *cry1Ac* de resistência a insetos da ordem Lepidóptera e o *bar* de tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (utilizado no processo inicial de seleção de transformantes, e sem nenhuma vantagem seletiva ao evento em seu ambiente de cultivo). Da mesma forma, a cultura da cana-de-açúcar possui um amplo histórico de uso seguro no ambiente, com mais de cinco séculos de cultivo no Brasil. Com todo o levantamento bibliográfico levantado, somado às avaliações de risco, podemos concluir que o evento CTC91087-6 é tão seguro quanto seu equivalente convencional, a cultivar CTC9001, para alimentação humana, animal e ao ambiente.

## VI - Parecer

Diante do exposto, e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas, é possível concluir que o evento em questão é tão seguro quanto seus equivalentes convencionais, não sendo causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à cana-de-açúcar convencional.

No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e as legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que o evento CTC91087-6 de cana-de-açúcar geneticamente modificada é substancialmente equivalente à cana convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal.

## VII - 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, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental”.

## VIII - Bibliografia

ALMEIDA, L.C. Broca da cana causa prejuízos milionários. 2016. Disponível em: <http://www.canalbioenergia.com.br/artigoprejuizos-bilionarios-causados-pela-broca-da-cana/>. Acessado em 21/09/2018.

AUSTRALIAN GOVERNMENT (2011). The Biology of the *Saccharum* spp. (Sugarcane). Disponível em [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/biologysugarcane-toc/\\$FILE/biologysugarcane11.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/biologysugarcane-toc/$FILE/biologysugarcane11.pdf). Acessado em 26/10/2018.

CERA - CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, ILSI RESEARCH FOUNDATION (2011). A review of the environmental safety of the Cry1Ac protein. Environmental biosafety research, v. 10, n. 2, p. 27-49. Disponível em: <https://www.ebr-journal.org/articles/ebp/pdf/2011/02/ebp120002-s.pdf>

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A., GENTILE, A., OLDEMBURGO, D. A., MERHEB, G. D. A., SERENO, M. L., LIRETTE, R. P., FERREIRA, T.H.S.; OLIVEIRA, W. S. D. (2018). Lack of detection of Bt sugarcane Cry1Cb and NPTII DNA and proteins in sugarcane processing products including raw sugar. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 6, 24.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2003). Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization. Codex Principles and Guidelines on Foods Derived from Biotechnology. 26th session, Rome, Italy. 30 June–7 July, 2003. Report on the 4th session of the Codex ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. Yokohama, Japan, 11–14 March, 2003, ALINORM 03/34A, 1–56.

CULLIS, C., CONTENTO, A. L., & SCHELL, M. A. (2014). DNA and Protein Analysis throughout the Industrial Refining Process of Sugar Cane. *International Journal of Agricultural and Food Research (IJAFR)*, 3(2).

DANIELS, J., ROACH, B.T. (1987). Taxonomy and evolution. In: Heinz, D.J. *Sugarcane. Improvement through Breeding*. Elsevier, Amsterdam, 1987. p. 7-84.

D'HONT, A., GRIVET, L., FELDMAN, P., RAO, S., BERDING, N., GLASMANN, J.C. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics*, 250, p. 405-413.

DILLON, S.L., SHAPTER, F.M., HENRY, R.J., CORDEIRO, G., IZQUIERDO, L., LEE, L.S. (2007). Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogoneae). *Annals of Botany*, 100(5), p. 975-989.

GARCIA, A.A.F. et al. (2013). SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. *Scientific Reports* 3: 3399.

GRIVET, L., ARRUDA, P. (2002). Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(2), p.122-127.

KENNEDY, R. D., CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A., DE OLIVEIRA, W. S., LIRETTE, R. P., & HJELLE, J. J. (2018). a general safety assessment for purified food ingredients derived from biotechnology crops: case study of Brazilian sugar and beverages produced from insect-protected sugarcane. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6.

MAPA, 2018. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 25/10/2018

MATSUOKA, S., GARCIA, A. A. F., & CALHEIROS, G. C. (1999). Híbridação em cana-de-a ugar. *Híbridação Artificial de Plantas*. Viçosa: Editora UFV, p. 221-254.

MIOCQUE, J.Y. (1977). Review of sugarcane varieties and breeding in Brazil. *Sugar Journal*, 40(7), p. 9-13.

MOORE, P.H., PATERSON, A.H., TEW, T. (2014). Sugarcane: the crop, the plant, and domestication. *Sugarcane: physiology, biochemistry and functional biology*. Wiley Blackwell, Oxford, p. 1-17.

OECD (2011). Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of SUGARCANE (*Saccharum ssp. hybrids*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Toxicants. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Novel Foods and Feeds. Paris. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/49343153.pdf>.

SREENIVASAN, T.V., AHLOOWALIA, B.S., HEINZ, D.J. (1987). Cytogenetics. Chapter 5, In: DJ Heinz, ed. *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier Amsterdam. p. 221-253.

## IX - Votos Contrários:

O processo foi deferido com 21 votos favoráveis e 1 abstenção, do Dr. João Dagoberto dos Santos.

Brasília, 3 de abril de 2019

**DRA. MARIA SUELI SOARES FELIPE****PRESIDENTE DA CTNBIO**

Documento assinado eletronicamente por **Maria Sueli Soares Felipe, Presidente da CTNBio**, em 19/04/2019, às 09:40 (horário oficial de Brasília), com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **4027440** e o código CRC **741FB7AC**.

Referência: Processo nº 01250.031453/2018-36

SEI nº 4027440