



Milho Herculex I evento TC1507

Processo CTNBio 01200.007232/2006-07

1 - Introdução

Constitui produto de desenvolvimento conjunto da Pioneer Sementes e Dow AgroSciences uma variedade de milho que contém o gene *cryIF* que efetivamente controla pragas importantes do milho, como a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta-da-cana (*Diatraea saccharalis*) e a lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*).

Este milho foi modificado, via técnica de DNA recombinante (rDNA), para expressar uma proteína inseticida cristalizada, também referida como delta-endotoxina, de *Bacillus thuringiensis var aizawai*. Dados de segurança obtidos experimentalmente demonstram a ausência de toxidez a humanos e aos animais vertebrados, e a ausência de efeitos adversos a organismos não-alvo e ao ambiente. Além do gene *cryIF*, o gene *pat*, que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) e confere tolerância ao glufosinato de amônio, também está presente no evento nesta variedade de milho, comercialmente conhecida como HERCULEX I (HXI).

Essas novas características foram avaliadas através de ensaios no Brasil e em outros países e não foi identificado efeito adverso ao ambiente, ao homem e outros animais, como toxicidez ou alergenicidade. Os genes *cryIF* e *pat* estão ligados no mesmo vetor de transformação, PHI8999A. Ambos foram inseridos nas plantas de milho via transformação por biolística. Este evento genético, conhecido como TC 1507 foi molecularmente caracterizado, com estabilidade mitótica comprovada, não apresenta nenhum gene marcador que confira resistência a antibióticos e não identificou-se nenhuma sequência homóloga a alergenicos. Não existem fatos científicos que indiquem efeitos prejudiciais para a saúde humana ou animal relacionada com os genes *cryIF* ou *pat* ou com os elementos associados utilizados para regular sua expressão no evento TC1507. As seqüências genéticas obtidas dos organismos doadores não apresentam características patogênicas e não afetam a saúde humana ou animal

Após décadas de experimentação testando proteínas *B.t.* demonstrou-se a ausência de toxidez ao homem e aos animais vertebrados e, a ausência de efeitos adversos a organismos não-alvo e ao ambiente. O evento TC1507 foi testado a campo em 1999, 2000, 2001 e 2002, sendo avaliados até hoje nas principais regiões de cultivo de milho nos Estados Unidos, na Argentina com confirmação dos dados em ensaios conduzidos no Brasil, desde 1998. Dados e informações relacionadas com características agrônomicas, características de resistência a pragas e doenças foram coletadas durante esses testes e, foram submetidos para análise da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, juntamente com análises de laboratório, relatos e referências da literatura, constituindo assim um *dossiê* público. De forma similar a dos outros países que comercializam este milho, não foram encontrados em experimentação no Brasil efeitos adversos sobre a abundância de organismos não-alvo ou alterações das propriedades microbiológicas do solo. A expectativa é que na eventual aprovação desta tecnologia no Brasil, ocorra uma rápida adoção da mesma por parte da comunidade agrícola como observado nos EUA, Canadá e Argentina. Esses países tem aprovação para cultivo desse milho transgênico e

aprovação para importação e consumo para alimentação humana e animal, figuram países como o Japão, Coréia, Taiwan, China, México, Filipinas, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Colômbia e União Européia.

A análise de composição do grão e de ração confirma que o milho HERCULEX é substancialmente equivalente ao milho não modificado geneticamente e por conseguinte de valor nutritivo comparável. Esta assertiva decorre dos diversos estudos feitos em animais, apresentados no processo protocolado na CTNBio nº 01200.007232/2006-07.

Estas informações e dados experimentais e comerciais demonstram que o evento TC1507 não exibe propriedades patogênicas às plantas e não causa danos a outros insetos que são benéficos à agricultura. Não se tem nenhuma evidência ou indicação que a proteína Cry1F de *Bacillus thuringiensis* aumente o potencial do milho transformado atuar como planta invasora, uma vez que a sua fenologia, morfologia, além de vários outros aspectos agrônômicos não foram alterados, desta forma, nos testes conduzidos no Brasil e no mundo, não foi verificado que o inserto genético conferiu vantagem adaptativa a este milho.

O uso do milho Herculex I, evento TC1507, juntamente com as práticas de manejo de resistência a insetos, reduzirão a pressão de seleção para desenvolvimento de resistência a inseticidas e ajudarão a manter uma gama de opções efetivas de controle de Lepidópteros à disposição dos produtores de milho do Brasil.

2. Eficácia do milho Herculex I evento TC1507

Um estudo de expressão das proteínas Cry1F e PAT foi realizado por Stauffer e Rivas (1999) em vários tecidos da planta usando uma análise ELISA especificamente desenvolvida para cada proteína. O estudo foi feito em ensaios de campo de quatro localidades produtoras de milho no Chile, em 1998/99. Observou-se a proteína Cry1F a níveis mensuráveis em todos os tecidos amostrados (tabela 1).

Tabela 1: Resumo dos níveis de proteína Cry1F no tecido colhido de um híbrido derivado da linhagem de milho Bt Cry1F 1507

Tecido	Medias ¹ Cry1F (pg Cry1F/μg TEP)	Desvio padrão	Varição Mín/Máx
Folha	110.9	27.2	56.6 – 148.9
Pólen	135.5	13.5	113.4 – 168.2
Barbas	50.3	16.5	26.8 – 79.8
Talo	550.0	104.0	355.9 – 737.4
Planta inteira	1063.8	361.7	803.2 – 1572.7
Grão	89.8	23.3	71.2 – 114.8
Planta inteira senescente	714.3	95.5	622.2 – 845.3

¹ Os valores são medias das quatro localidades na base de valores médios calculados a partir da análise de cinco amostras individuais por localidade, de folhas, pólen, barbas, colmo, grão e uma amostra composta das localidades para ambas amostras de planta inteira.

Para a proteína PAT foi observado expressão a níveis mensuráveis somente em amostras do tecido da folha. Os níveis de expressão das proteínas Cry1F e PAT obtiveram registros abaixo do limite de detecção em todas as amostras de tecido das testemunhas de milho convencional.

Tanto a proteína Cry1F como a PAT são condicionadas por genes nucleares dominantes simples com segregação mendeliana em uma determinada geração segregante e em gerações sucessivas de cruzamentos demonstrando estabilidade ao longo de várias

gerações. Mostra, portanto, que os genes introduzidos mostram estabilidade meiótica e mitótica no milho TC1507.

A atividade biológica da proteína Cry1F tem sido estudada em uma gama de insetos-pragas que se alimentam das plantas de milho. Estes ensaios foram realizados expondo os insetos a dietas artificiais tratadas com formulações aquosas da proteína Cry1F produzida a partir de uma fonte microbiana (*P. fluorescens*). Evans (1998) demonstrou que as características bioquímicas da proteína produzida na forma vegetal e microbiana foram equivalentes. Os insetos avaliados foram os seguintes: lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), lagarta européia do milho (*Ostrinia Nubilalis*), lagarta da espiga do milho (*Helicoverpa zea*), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus*), broca do milho do sudoeste (*Diatraea grandiosella*), larva alfinete (*Diabrotica virgifera virgifera*), pulgão da folha do milho (*Rhopalosiphum maidis*) e a cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*). Hua *et. al.* (2001), avaliaram a especificidade das proteínas Cry através de ensaios de ligação em vesículas celulares, evidenciando a alta especificidade deste complexo protéico a receptores de insetos.

Os insetos suscetíveis à proteína Cry1F incluem a lagarta do cartucho, a broca da cana-de-açúcar, broca européia do milho, lagarta da espiga de milho, lagarta rosca, lagarta elasmó e broca do milho do sudoeste. Não se verificou atividade alguma da proteína Cry1F contra os insetos: larva alfinete, cigarrinha do milho e pulgão da folha do milho. Hua *et al.* (2001), avaliaram a especificidade das proteínas Cry através de ensaios de ligação em vesículas celulares, evidenciando a alta especificidade deste complexo protéico a receptores de insetos.

Estudos tem sido realizados a campo para determinar a eficácia dos híbridos da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 contra as principais pragas do cereal no Brasil e na Argentina, respectivamente a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*).

Um estudo de eficácia e praticabilidade agrônômica de milho geneticamente modificado expressando a proteína Cry1F no manejo da Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* Smith foi realizado no Brasil, ano agrícola 2005/6 (Souza *et. al.*, 2006). O ensaio foi instalado na Unidade Operativa de Indianópolis-MG, da Dow AgroSciences Industrial Ltda, utilizando-se híbridos de milho geneticamente modificados e suas versões convencionais para uma análise comparativa. Nesse experimento fez-se infestação das parcelas experimentais com larvas do inseto criadas em laboratório. Para a avaliação usou-se a escala de Davis (1992). Essa escala varia de 0 a 9 onde 0 corresponde à planta sem danos e 9 a planta com muitas folhas na quase totalidade destruídas. Verificou-se que os híbridos transformados apresentaram diferenças significativas em relação às suas versões convencionais, apresentando danos considerados de nível 1 (folhas com apenas pontuações), uma vez que há necessidade que a lagarta ingira uma quantidade pequena de proteína para causar sua morte. Por outro lado os híbridos convencionais apresentaram danos considerados significativos (lesões circulares ou alongadas, furos etc.), enquadrados nas notas de 3 a 9. As médias de danos acham-se na tabela 2 abaixo. Esses resultados mostram a excelente eficácia e proteção à planta conferida pela inserção do gene *Bt* TC1507 reduzindo drasticamente os danos causados por larvas da *S. frugiperda*.

Tabela 2: Efeito dos tratamentos, sobre a nota média referente ao dano por *Spodoptera frugiperda*. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Nota média obtida em 20 plantas de milho, em função dos danos por <i>Spodoptera frugiperda</i> ^{1/2/3}
Milho Convencional (Dow 2C577)	8,2 a
Milho Bt (Dow 2C577HXI)	1,1 c
Milho Convencional (Dow 8480)	6,3 b
Milho Bt (Dow 8480HXI)	1,0 c
Milho Convencional (Dow 2A120)	7,5 ab
Milho Bt (Dow 2A120 HXI)	1,1 c

^{1/}Danos expressos em notas, segundo a Escala de Davis (1992).

^{2/}Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = \arcsin\{(x+1)/100\}^{1/2}$ ”.

^{3/}Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$).

Fica evidente que os híbridos que expressam a proteína Cry1F foram levemente danificados pela *S. frugiperda*, dano este, necessário para infecção e morte da lagarta pela ingestão da proteína e que não representa prejuízo para a cultura. Já os híbridos convencionais apresentaram danos mais severos e significativos da praga, que certamente causarão perdas de produtividade das plantas atacadas.

Um outro estudo também realizado no Brasil avaliou a eficácia e a praticabilidade agrônômica de milho geneticamente modificado envolvendo híbridos da Dow AgroSciences expressando a proteína Cry1F no manejo da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* Fabr. (Tabela 3). Esse trabalho foi efetuado com ensaio a campo no ano agrícola 2005/6 (Souza *et. al.*, 2006). O experimento instalado na Unidade Operativa da Dow AgroSciences Industrial Ltda, Município de Indianópolis, MG, comparou milho geneticamente modificados expressando a proteína Cry1F, com suas versões convencionais. Os parâmetros avaliados foram: danos nas folhas atribuindo-se notas de 1 a 9, sendo 1, nenhum dano visível na folha, e 9, a maioria das folhas com lesões longas, e o tamanho da galeria (cm) realizada pelas lagartas (no caso das plantas danificadas) e o número de lagartas de *D. saccharalis* presentes no colmo cortado longitudinalmente. Na tabela 3 observa-se que todos os híbridos TC1507 mostraram número médio de lagartas significativamente menores que seus híbridos convencionais, sem lagartas ou com uma infestação muito baixa. Fato semelhante, foi evidenciado para o tamanho médio do dano de *D. saccharalis* no colmo das plantas (cm/planta), onde os híbridos Herculex I mostraram danos significativamente inferiores aos híbridos convencionais.

Tabela 3. Efeito dos tratamentos sobre o número médio de lagartas, *Diatraea saccharalis* e sobre o tamanho médio do dano (cm/planta) em plantas de milho. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Nº médio de lagartas, <i>Diatraea saccharalis</i> , em 10 plantas ^{1/2}	Dano médio por <i>Diatraea saccharalis</i> , em cm/planta ³
Milho Convencional (Dow 2C577)	6,5 a	5,1 b
Milho Bt (Dow 2C577 HXI)	0,0 b	0,0 c
Milho Convencional (Dow 8480)	4,0 a	7,1 ab
Milho Bt (Dow 8480HXI)	0,3 b	0,1 c
Milho Convencional (Dow 2A120)	7,5 a	9,6 a
Milho Bt (Dow 2A120HXI)	0,0 b	0,0 c

^{1/}Dados originais sem transformação. Para análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”.

^{2/}Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$).

^{3/}Dano médio (galeria) no colmo, medido em “cm”.

Em outro estudo de eficácia de milho geneticamente modificado expressando a proteína Cry1F no manejo da Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* Smith foi realizado pela Pioneer Sementes no ano agrícola 2005/6 (Souza *et. al.*, 2006). O estudo com infestação com larvas de segundo e terceiro instar permitiu uma boa avaliação da resposta dos tratamentos à infestação do milho pela lagarta-do-cartucho. A análise de variância dos dados de danos revelou diferenças altamente significativas ($P < 0,0001$) para tratamentos e para a interação local x tratamentos. Assim, os 3 tratamentos foram comparados dentro de cada local (tabela 4).

Tabela 4: Avaliação dos danos causados pela lagarta-do-cartucho do milho através de uma escala visual de notas de danos, variando de 0 (sem danos) a 9 (cartucho totalmente destruído) adaptada da escala proposta por Davis e Williams (1989), cerca de duas semanas após a infestação artificial.

Tratamento	Toledo	Jardinópolis	Indianópolis	Itumbiara
P30F33 S/ inseticida	8,11 A	6,70 A	5,88 A	4,21 A
P30F33 C/ inseticida	4,34 B	4,09 B	2,18 B	4,62 A
P30F33 -1507 (<i>Bt</i>)	1,21 C	1,20 C	0,93 C	1,43 B
Significância (F)	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$

Nas colunas, médias seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo “Duncan MRT” ($P \leq 0,05$).

De uma maneira geral o dano causado pelo inseto diferiu em todos os tratamentos, confirmando que o milho-Bt expressando a toxina Cry1F, foi altamente resistente à lagarta-do-cartucho, cuja média da nota de dano ficou em torno de 1, enquanto que, no tratamento com inseticida foi em torno de 4 e na testemunha em torno de 6. Portanto, o milho-Bt TC1507 resultou num controle melhor do que o oferecido pelo controle químico com inseticida. Conclui-se desses ensaios que a eficácia registrada pelo milho-Bt no controle da lagarta-do-cartucho foi excelente.

Dados semelhantes comparando híbridos TC1507 com controles convencionais foram obtidos em experimentos realizados na Argentina (Tabela 5). Os testes feitos durante a safra 1999/2000 e 2000/2001 demonstraram a eficiência da linhagem de milho Bt Cry1F 1507 contra as principais pragas do milho na Argentina, a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). Em resumo, os resultados demonstram que a linhagem de milho Bt Cry1F 1507 proporciona um maior controle sobre lepidópteros-praga, em comparação com o milho convencional.

Tabela 5: Eficácia comparativa da linhagem de milho Bt Cry1F 1507 e do milho controle na Argentina para a broca da cana-de-açúcar (BCA) e a lagarta-do-cartucho (LCM).

Milho	Dano por BCA ^a	Dano por BCA (cm de túnel)	Dano por LCM (1-9) ^b
Ciclo 2000/2001^c			
Linhagem de milho Bt Cry1F 1507	0,6	0,3	7,5
Testemunha	12,3	36,6	2,75
Ciclo 1999/2000^d			
Linhagem de milho Bt Cry1F 1507	5,5	11,0	7,7
Testemunha	38,0	96,0	2,0

a_ Quantidade média de orifícios de 5 plantas infestadas artificialmente.

b_ Médias do dano registrado visualmente segundo uma escala de 1 a 9 (1 = completamente susceptível e 9 = completamente resistente)

c_ Dados de 2 localidades

d_ Dados de 3 localidades

3. Elementos genéticos presentes na construção do milho Herculex I evento TC1507

As seqüências genéticas obtidas dos organismos doadores e inseridas na linhagem de milho *Bt Cry1F 1507* carecem de características patogênicas (USDA, 1995; EPA, 1996a).

Elementos genéticos e regulatórios isolados dos organismos são detalhados a seguir. Foram utilizados na modificação genética da linhagem de milho *Bt Cry1F 1507* genes das seguintes espécies: *Zea mays* L., *Bacillus thuringiensis* var *aizawai*, *Agrobacterium tumefaciens* cepa pTi15955, Vírus do Mosaico da couve-flor e *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tü494. Estes elementos foram molecularmente caracterizados e apresentam histórico seguro de uso, conforme descrito a seguir.

O milho (*Zea mays* L.) não é um organismo patogênico e sua domesticação como cultivo agrícola é de longa data. O milho não apresenta anti-nutrientes reconhecidos que se consideram nocivos para o meio ambiente ou para a saúde humana e animal (White e Pollak, 1995).

Bacillus thuringiensis é um grupo diverso de bactérias gram-positivas, formadoras de esporos, descobertos pela primeira vez no Japão em 1901, em lagartas doentes do bicho-da-seda. Foram utilizadas numerosas variedades de *B. thuringiensis* como inseticidas microbianos desde 1938 (Merrit, 1998). A subespécie *aizawai* é utilizada comercialmente para controlar as larvas de *Galleria mellonella* e várias lagartas especialmente a traça das crucíferas *Plutella xylostella* (Cornell University, 1996). O gene *cry1F* foi isolado de *B.thuringiensis* var. *aizawai*.

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria gram-negativa que não forma esporos, ocorre em forma de bastão, estreitamente relacionada com *Rhizobium*, no qual forma nódulos fixadores do nitrogênio em trevos e outras plantas leguminosas. *Agrobacterium tumefaciens* contém um plasmídeo (ou plasmídeo Ti) com a capacidade de penetrar nas células vegetais e inserir uma porção do seu genoma dentro de seus cromossomos. *Agrobacterium tumefaciens* é um patógeno que provoca uma deformação de raiz principalente em cultivos de beterraba açucareira, frutas e vitivinícolas. No inserto

PHI8999A somente se encontra o terminador *ORF25PolyA* do *Agrobacterium tumefaciens* e não se encontra presente nenhuma seqüência do plasmídio Ti.

O vírus do mosaico da couve-flor é um caulimovírus de DNA com uma gama de hospedeiros restrito principalmente à plantas crucíferas (Base de dados ICTV, 1998). As seqüências de DNA que se originam a partir do Vírus do Mosaico da Couve-flor, o promotor 35S e o terminador, não apresentam características patogênicas (USDA, 1995).

Streptomyces viridochromogenes é uma bactéria comum do solo (OECD, 1999) que produz o tripeptídeo L-fosfotricil-L-alanil-alanina (L-PPT), um herbicida não seletivo. O gene *pat*, que confere tolerância ao tripeptídeo, também foi identificado e caracterizado em *S.viridochromogenes*.

Na tabela 6 estão resumidos os elementos genéticos individuais e as seqüências regulatórias necessárias para sua expressão que compreendem o inserto PHI8999A utilizado na criação da linha de milho Bt Cry1F 1507.

Tabela 6: Elementos genéticos do inserto PHI8999A

Elemento genético	Organismo doador	Função
<i>ubiZM 1(2)</i>	<i>Zea mays</i>	Promotor de ubiquitina (mais o intron de ubiquitina e uma região 5' não traduzida de <i>Zea mays</i> (Christensen <i>et al.</i> , 1992) que rege a expressão de <i>cry1F</i> .
<i>cry1F</i> (trunc)	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	Versão sintética do gene truncado <i>cry1F</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>aizawai</i> (planta-otimizado).
ORF25 PolyA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Terminador de transcrição para <i>cry1F</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi15955.
<i>CaMV 35S</i> Promotor	Vírus do Mosaico de couve-flor	Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor que rege a expressão de <i>pat</i> (Odell <i>et al.</i> , 1985).
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Gene sintético de tolerância ao glufosinato de amônio (planta-otimizado) que se baseia em uma seqüência de genes de fosfonitrocina acetiltransferase de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Eckes <i>et al.</i> , 1989).
<i>CaMV 35S</i> Terminador	Vírus do Mosaico de couve-flor	Terminador de transcrição 35S do Vírus do Mosaico da couve-flor utilizado com o gene <i>pat</i> (Pietrzak <i>et al.</i> , 1986)

Os elementos genéticos presentes no inserto PHI8999A utilizado na transformação da linhagem de milho *Bt Cry1F 1507* carecem de potencial ou antecedentes de transferência natural a outros organismos. No inserto não se apresentam seqüências que permitam a transferência ou inserção para o genoma de outros organismos.

Ainda que improvável, se ocorresse a transferência dos genes *cry1F* ou *pat* para outros organismos, estes genes não apresentariam risco para a saúde humana ou animal. Os genes que codificam as enzimas PAT e acetiltransferases similares se encontram presentes na natureza. De igual modo o gene *cry1F* na linhagem de milho *Bt Cry1F 1507* foi isolado a partir de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* que é uma bactéria de solo ubíqua que produz uma variedade de proteínas Cry, incluindo a proteína Cry1F. Sendo assim os organismos receptores não apresentariam um risco maior que os microrganismos presentes no ambiente a partir dos quais se originaram os genes e os quais seres humanos e animais já estão expostos através da ingestão inadvertida por longo tempo.

4. Segurança Alimentar

4.1. Toxicidade do milho Herculex I evento TC1507

O microrganismo *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* se encontra presente em qualquer ambiente. Foram obtidos isolamentos de Bt em solos, poeira, fezes, guano, insetos, ninhos de aves, em criação do bicho da seda e em vegetação natural (Schnepf *et al.*, 1998). A dieta humana contém proteínas de diversas espécies de Bt. As cepas atualmente comercializadas de Bt em formulações de pesticidas microbianos, incluindo o *Bt* var. *aizawai* não demonstrou toxicidade ou patogenicidade animal (McClintock *et al.*, 1995). A partir de um contexto evolutivo, a exposição ao Bt natural tem ocorrido por ingestão de plantas colonizadas, produtos armazenados ou ingestão inadvertida de terra; nos últimos anos, o Bt tem sido ingerido como resíduo proveniente de pesticidas microbianos. Não existem provas de efeitos a longo prazo na saúde humana pela exposição ao *Bt* var. *azawai* ou à sua proteína Cry1F. As proteínas Bt cristalinas de ação inseticida são conhecidas por apresentar um elevado grau de especificidade em sua toxicidade para pequenos grupos de insetos relacionados geralmente dentro de uma ou duas ordens taxonômicas. A proteína Cry1F expressa no evento TC1507 é altamente ativa contra um grupo limitado de insetos lepidópteros (que possuem receptores específicos na membrana intestinal) e não é tóxica para outros insetos ou organismos. Não existem provas de que as proteínas inseticidas cristalinas que se originam no *Bacillus thuringiensis* tenham efeitos prejudiciais na saúde do homem ou de animais (EPA, 1995a; EPA, 1996a). A segurança para o consumo de vegetais geneticamente modificados é suportada por uma abordagem multidisciplinar empregada durante a fase de testes de segurança alimentar (Cockburn, 2002).

O milho e seus derivados não são considerados tóxicos. A modificação genética da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 resulta na expressão de proteínas Cry1F e PAT. A proteína Cry1F apresenta toxicidade específica contra certos insetos lepidópteros-praga (organismos alvo) mas não existem evidências que as proteínas Cry geradas a partir do *Bacillus thuringiensis* tenham efeitos nocivos na saúde de seres humanos e animais (EPA, 1995a, EPA, 1996a).

Entende-se que os alérgenos das proteínas devem ser estáveis na digestão péptica e triptica, e nas condições de acidez do sistema digestivo humano, de modo que possam alcançar e passar através da mucosa intestinal para produzir uma resposta ao alimento alergênico. A proteína Cry1F é facilmente degradável no fluido digestivo simulado, minimizando o potencial destas proteínas de serem absorvidas pela mucosa intestinal ao ser consumidas. A proteína Cry1F é quase completamente proteolisada depois de um minuto em condições gástricas simuladas, a uma relação molar de 100:1 (Cry1F:pepsina) (Evans, 1998).

A proteína PAT, tal como expressa no evento TC1507, foi degradada a níveis não detectáveis dentro dos 5 segundos posteriores a introdução de um fluido gástrico simulado que continha pepsina (Glatt, 1999). A proteína PAT é facilmente degradada em fluido digestivo simulado, minimizando o potencial da proteína de ser absorvida pela mucosa intestinal ao ser consumida. Demonstrou-se que a proteína PAT, segundo se expressa a partir de outras linhagens de milho tolerantes ao glufosinato de amônio é rapidamente desnaturada pelo calor ou por pH baixo (EPA, 1995b; OECD, 1999).

A toxicidade potencial para seres humanos e animais da proteína Cry1F foi examinada em um estudo toxicológico oral agudo no qual se avaliou o potencial de toxicidade aguda em ratos (Kuhn, 1998) da delta-endotoxina Cry1F do *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*.

A dose mais elevada que foi submetido a ensaio foi de 5050 mg/kg PV, ao ajustar a pureza do material de ensaio (11.4%), a dose foi de 576 mg de proteína Cry1F/kg de peso corporal. No curso do estudo, foram realizadas observações sobre mortalidade, sintomas de patologia clínica e de comportamento, como também foram tomados os pesos corporais, e ao conduzir o estudo foram realizadas necrópsias totais. Não se observou mortalidade no curso do estudo. Durante o estudo não foram apresentados sinais clínicos adversos nem foram observados resultados adversos nas necrópsias. A variação de dose utilizado neste estudo não provocou mortalidade entre os indivíduos do ensaio, portanto não pôde-se determinar a DL50 da proteína Cry1F.

Em outro estudo de toxicidade oral aguda, foram alimentados ratos com 6000mg/kg de material de ensaio que continha aproximadamente 500 mg de proteína PAT/kg PV (Brooks, 2000). Não se produziu observações clínicas relacionadas com o tratamento. Todos os ratos, 5 machos e 5 fêmeas, aumentaram de peso durante o período de observação de duas semanas e nenhum dos animais em estudo apresentaram lesões patológicas. Nas condições do estudo e devido a ausência de qualquer toxicidade observável, não se pode determinar a DL50 da proteína PAT.

A segurança em termos de toxicidade da proteína PAT foi determinada em detalhe durante a avaliação do milho tolerante ao glufosinato de amônio (EPA, 1995b; EPA, 1997; CFIA, 1998; SCP, 1998; OECD, 1999). O gene *pat* foi obtido originalmente da cepa Tü494 da bactéria *Streptomyces viridochromogenes* a qual não possui potencial tóxico ou patogênico conhecido. A proteína PAT é enzimaticamente ativa, mas tem uma alta especificidade para um substrato que não existe nem na planta de milho nem nas dietas animais e humanas, onde possa reagir.

Foi realizado um estudo de alimentação de frangos mediante a incorporação às dietas de grão de linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 e grão controle não transgênico de germoplasma comparável (Zeph, 2000). Analisou-se a mortalidade, o aumento de peso corporal e a conversão alimentar de frangos alimentados com a dieta que continha o grão derivado da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 e a de frangos alimentados com uma dieta padrão que continha milho comum. Não se observou diferença estatística significativa na mortalidade, aumento de peso corporal ou conversão alimentar entre os frangos alimentados com a dieta que continha o grão da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 e aqueles da dieta controle.

4.2. Alergenicidade do milho Herculex I evento TC1507

O milho não é considerado prejudicial para seres humanos, animais domésticos ou fauna silvestre. A exceção das novas características que foram introduzidas, as quais incluem a resistência a certos lepidópteros-praga conferida pelo gene *Cry1F* e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio conferido pelo gene *pat*, tem sido comprovado que a linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 é substancialmente equivalente a outras linhagens de milho encontradas comercialmente. Não foi modificada nenhuma outra característica do organismo original que possa ser perigosa ou que represente um risco para a saúde. Não se observou efeitos adversos da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 na saúde humana e no meio ambiente (Herman *et. al.*, 2004).

Baseando-se em tecnologias de processamento, a dieta humana contém pequenas quantidades de proteínas de diversas cepas de *B. thuringiensis* devido ao seu uso como pesticida microbiano ou em plantas geneticamente modificadas para que expressem a proteína Cry1Ab, como ocorre nos EUA, Canadá e Argentina. A proteína Cry1F aporta uma porção muito pequena da proteína total ingerida na dieta humana por dia. Portanto, não se antecipa uma mudança significativa na quantidade da proteína Cry1F na dieta

humana ou na quantidade de proteínas Bt relacionadas ao uso da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 em híbridos de milho comerciais. A proteína PAT não se expressou a níveis detectáveis em grãos da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 (LOD <20 pg PAT/μg TEP). Qualquer proteína PAT residual somente estará presente nas frações que contenham proteína, não havendo exposição adicional significativa através do óleo ou amido. Durante o processamento de alimentos os produtos podem chegar a aquecer-se a temperaturas nas quais as proteínas se desnaturam e perdem sua funcionalidade. Adicionalmente, conforme demonstrado, as proteínas em questão apresentam rápida digestão no fluido gástrico.

Ao avaliar o potencial alergênico, o fator mais importante a considerar é a origem biológica do gene introduzido se o mesmo expressa produto alergênico (FDA, 1992). Nem *Bacillus thuringiensis* (origem do gene *cry1F*) nem *Streptomyces viridochromogenes* (origem do gene *pat*) apresentam antecedentes como fatores desencadeantes de alergias. Ambos organismos doadores são bactérias comuns do solo. Em mais de 30 anos de uso comercial, não foram apresentadas informações concretas de alergenicidade do *B. thuringiensis*, incluindo alergias ocupacionais relacionadas com a fabricação de produtos que contém *B. thuringiensis* (EPA, 1995a).

O perfil bioquímico das proteínas Cry1F e PAT proporcionam uma base para a avaliação alergênica ao compará-las com alérgenos de proteínas conhecidas. A comparação da seqüência de aminoácidos de uma proteína introduzida com as seqüências de aminoácidos de alérgenos conhecidos pode resultar em um indicador útil de potencial alergênico (FAO/WHO, 2000). Uma homologia significativa é aquela que registra uma identidade de seqüência de 8 ou mais aminoácidos contíguos. A comparação das 15 seqüências de bases de dados mais homólogas confirmou que a proteína Cry1F não compartilha uma homologia significativa de seqüência de aminoácidos com proteínas alergênicas conhecidas.

De maneira similar, também foram comparadas seqüências de aminoácidos da proteína PAT com alérgenos de proteínas conhecidas (Meyer, 1999). Os resultados demonstram que a proteína PAT não compartilha homologia significativa de aminoácidos, com proteínas alérgenas conhecidas. A proteína PAT já havia sido objeto de avaliações de segurança prévia de plantas geneticamente modificadas (EPA, 1995b; EPA, 1997; CFIA, 1998; SCP, 1998; OECD, 1999).

Os alérgenos das proteínas de alimentos são geralmente estáveis na digestão péptica e trípica, e nas condições de acidez do sistema digestivo humano, de modo que podem chegar a passar através da mucosa intestinal para gerar uma resposta alergênica. Tanto a proteína Cry1F como a proteína PAT são facilmente degradáveis no fluido digestivo simulado, minimizando qualquer potencial destas proteínas serem absorvidas pela mucosa intestinal ao serem consumidas. Ao fim de um minuto a proteína Cry1F fica quase completamente proteolisada em condições gástricas simuladas, a uma reação molar de 100:1 (Cry1F:pepsina) (Evans, 1998). A técnica de detecção de imuno-blot (imuno-eleto-transferência) também demonstrou que a Cry1F não se encontra glicosilada. Por outro lado, a proteína Cry1F perde imunoreatividade depois de ser processada pelo calor e não possui antecedentes de uso prejudicial em pesticidas microbianos. A proteína PAT foi degradada a níveis não detectáveis dentro dos 5 segundos posteriores a introdução de um fluido gástrico simulado que continha pepsina (Glatt, 1999; OECD, 1999).

Portanto, os genes *cry1F* e *pat* introduzidos na linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 não codificam alérgenos conhecidos e tanto a proteína Cry1F como a proteína PAT não compartilham seqüências imunologicamente significativas de aminoácidos com alérgenos conhecidos. Estes resultados, junto com a rápida ruptura destas proteínas em condições digestivas, confirmam que as proteínas Cry1F e PAT não apresentam nenhum risco alergênico.

4.3. Equivalência substancial do milho Herculex I evento TC1507

O conceito conhecido como equivalência substancial se refere à forma como o organismo geneticamente modificado se equivale na composição de nutrientes ao organismo convencional e tem sido incorporado em política regulatória pelo Food and Drug Administration sobre novas variedades de plantas (FDA, 1992). A equivalência substancial no milho Herculex I evento TC1507 tem sido demonstrada em estudos comparativos da composição de milho TC1507 com milho convencional em ensaios de campo citados por Souza *et. al.*, 2006. Um estudo de composição de forragem de níveis de proteínas, gorduras, fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN), carboidratos, cinzas e umidade da forragem de um milho TC1507 e do controle convencional é resumido na tabela 7 (Herman *et. al.*, 2004).

Tabela 7: Médias e valores de P (nível de significância) da análise da forragem do evento TC1507 e do controle de amostras colhidas nos ensaios de campo de 1998/1999.

Análise da forragem				
Variável resposta^a	Valores médios do evento TC1507	Valores médios do milho testemunha	Efeito do tratamento Valor de P	Varição de valores da literatura^b
Gorduras %	2,42	2,42	0,997	0,7 - 6,7
Proteínas %	7,82	7,81	0,958	3,5 - 15,9
FDA %	26,91	27,56	0,097	30 ^c
FDN %	48,01	48,21	0,766	51 ^c
Carboidratos % ^d	84,15	84,13	0,925	66,9 – 94,5
Cinza %	5,61	5,63	0,848	1,3 - 10,5
Cálcio %	0,22	0,23	0,221	0,2 – 0,6
Fósforo %	0,25	0,24	0,151	0,15 – 0,55

^a – Porcentagem na base de peso seco

^b – Watson, 1982

^c – Watson, 1982, informa um valor médio de FDA de 30% e de FDN de 51%.

^d – Os carboidratos calculado como porcentagem do peso seco = 100% - % de proteínas - % de gorduras - % de cinzas. As fibras (FDA e FDN) estão incluídas nos carboidratos.

Os níveis de proteínas, gorduras, carboidratos, cinzas, cálcio e fósforo do evento TC1507 se encontram dentro dos padrões informados na literatura para forragem de milho. Em resumo, a análise de composição de nutrientes da forragem proveniente do evento TC1507 demonstrou que é comparável à forragem dos milhos convencionais.

A mesma análise, para composição do grão, é mostrada em resumo na tabela 8. Os níveis de proteínas, gorduras, FDA, FDN, carboidratos e cinzas do milho Bt Cry1F 1507 se encontram dentro do intervalo de classe publicado na literatura para grão do milho. A análise de composição de nutrientes do grão de milho TC1507, para as características estudadas, demonstrou ser comparável à do grão de milho convencional.

Tabela 8: Médias e valores de P (nível de significância) da análise do grão do evento TC1507 e do híbrido controle das amostras colhidas nos ensaios de campo de 1998/1999.

Análise do grão				
Variável de resposta^a	Valores médios do evento TC1507	Valores médios do híbrido testemunha	Efeito do tratamento Valor de P	Variação de valores da literatura
Gorduras %	3,83	3,94	0,046	3,1 - 5,7 ^b
Proteínas %	11,20	11,32	0,611	6,0 - 12,0 ^b
FDA %	3,55	3,68	0,250	3,0 - 4,3 ^c
FDN %	10,47	10,08	0,315	8,3 - 11,9 ^b
Carboidratos % ^d	83,45	83,23	0,352	63,3 - 89,7 ^c
Cinza %	1,51	1,50	0,335	1,1 - 3,9 ^c

^a - Porcentagem na base de peso seco

^b - Watson, 1982

^c - Watson, 1982, informa um valor médio de FDA de 30% e de FDN de 51%.

^d - Os carboidratos calculados como porcentagem do peso seco = 100% - % de proteínas - % de gorduras - % de cinzas. As fibras (FDA e FDN) estão incluídas nos carboidratos.

Componentes menores, porém não menos importantes, também foram estudados em análise comparativa do Milho TC1507 com o milho convencional. Aminoácidos essenciais e não-essenciais, ácidos graxos (palmítico, oleico, esteárico, linoleico e linolênico), vitaminas (B1, B2 e tocoferóis), minerais (Ca, P, Cu, Fe, Mg, Mn, K, Na e Zn), metabólitos secundários (inositol, rafinose, ácido p-cumátrico e ácido ferúlico) e antinutrientes (ácido fítico e inibidor de tripsina) foram estudados. Pode-se concluir que baseado na amplitude dos dados citados até então na literatura nenhum composto analisado no milho HXI apresentou teores diferentes dos encontrados no milho convencional (Herman *et. al.*, 2004; Stauffer e Zeph, 2000).

5. Segurança Ambiental do milho Herculex I evento TC1507

O milho é uma planta anual de baixa capacidade de dormência e tão domesticada que não consegue sobreviver no meio sem a ajuda do homem. As sementes precisam ser destacadas (debulhadas) do sabugo e serem enterradas em covas rasas com poucos grãos para em condições favoráveis germinar e produzir uma planta capaz de produzir sementes. Após a colheita alguns grãos podem ser enterrados pela movimentação de máquinas e em condições adequadas de temperatura e umidade podem sobreviver de uma estação de cultivo à outra. Estas plantas denominadas voluntárias são identificadas e controladas facilmente por meios manuais, mecânicos ou químicos.

O milho não exibe tendência a proliferar como erva daninha e não é invasivo em ecossistemas naturais (CFIA, 1994). Algumas espécies de *Zea* são plantas silvestres que se desenvolvem com êxito na América Central, mas não apresentam tendências pronunciadas de proliferar como erva daninha.

O evento TC1507 tem sido cultivado e monitorado cuidadosamente em relação a sua capacidade de proliferação como erva daninha e seu comportamento agrônomico em mais de oitenta localidades ao redor do mundo, incluindo Brasil, em pedidos de liberação aprovados pela CTNBio. Em todos os casos, as plantas da linhagem de milho *Bt Cry1F* 1507 registraram um comportamento similar ao milho comum, sem evidenciar o desenvolvimento de características morfológicas ou fenotípicas não previstas.

Para demonstrar que o evento TC1507 não altera características agrônomicas das plantas foi realizado um estudo comparativo no Brasil de híbridos TC1507 com seus

correspondentes convencionais (Souza *et. al.*, 2006) . Os resultados com híbridos da Dow AgroSciences são sumarizados na Tabela 9 em experimentos realizados no ano agrícola de 2005/6.

Tabela 9: Análise comparativa de características agrônômicas de híbridos transformados com o evento HXI TC1507 e seus híbridos convencionais correspondentes. Os híbridos DAS8480HXI e 2C577HXI tem a mesma linhagem parental transformada e foram avaliados nas Unidades de Indianópolis, Jardinópolis, Mogi Mirim e Castro-PR, em duas épocas de plantio. Médias estatisticamente distintas ao nível de 5% pelo teste Tukey tem letras diferentes nos pares de dados de um mesmo híbrido. Médias estatisticamente distintas ao nível de 5% pelo teste Tukey tem letras diferentes nos pares de dados de um mesmo híbrido.

Característica	DAS8480	DAS8480HXI	2C577	2C577HXI
Produção de grãos (ton/ha)	3.292 a	3.660 a	3.746 a	3.452 a
Umidade (%)	29,5 b	33,1 a	29,4 a	30,7 a
Vigor (nota)	7 a	6 a	6 a	5 a
Flor. masculino (dias)	60 a	62 b	62 a	62 a
Flor. feminino (dias)	61 a	63 b	62 a	62 a
Altura da planta (cm)	209 a	201 b	226 a	221 a
Altura da espiga (cm)	108 a	106 a	120 a	118 a
Empalhamento (nota)	7 a	7 a	7 a	7 a
Tombamento da raiz (%)	10,6 a	9,9 a	19,6 a	21,7 a
Quebramento do colmo (%)	0,4 a	0,4 a	0,4 a	0,0 a
<i>Puccinia polysora</i> (nota) *	3	4	4	4
<i>Puccinia sorghi</i> (nota) *	7	8	7	8
<i>Cercospora zea-maydis</i> (nota) *	5	6	7	7
<i>Exherohilum turcicum</i> (nota) *	7	7	6	6
<i>Phaeosphaeria maydis</i> (nota) *	6	6	7	7
<i>Diplodia macrospora</i> (nota) *	8	7	7	7

* Diferenças entre híbridos HXI e híbridos convencionais correspondentes, são não-significativas a 5% de significância.

Das 16 características estudadas verifica-se que apenas três, porcentagem de umidade, altura da planta e da espiga mostraram alguma diferença entre o milho TC1507 e seu correspondente convencional. Essas diferenças, pouco consistentes, ocorrem também com frequência em programas de retrocruzamentos de melhoramento de milho convencional com objetivo de corrigir uma característica desfavorável em germoplasma de alta performance. Pode-se concluir que os híbridos que receberam a construção gênica

TC1507 por meio de retrocruzamentos, não diferem dos híbridos convencionais correspondentes.

Experimentação semelhante realizada desde 1997 até os dias de hoje, em vários países, inclusive em plantios comerciais onde o milho TC1507 é cultivado, não se tem evidência alguma de mudanças de características da planta no sentido do cereal transformado ter adquirido características de erva daninha. As únicas diferenças fenotípicas visíveis tem sido a resistência a certos lepidópteros-praga e a tolerância a ação do herbicida glufosinato de amônio, conferidas pelos genes introduzidos.

No Brasil, para avaliar o impacto do cultivo do milho TC1507 sobre populações de artrópodes não-alvo, que ocorrem na parte aérea e no solo foi feita um estudo a campo pela Pioneer Sementes aprovado pela CTNBio, em Itumbiara-GO e Toledo-PR, na safra agrícola de 2005/6 (Souza *et al.*, 2006). O experimento foi realizado com 3 tratamentos e 3 repetições. Cada parcela teve uma área de 1500 m² (30 x 50 m), tamanho considerado adequado para ensaios de impacto (Prasifka *et al.*, 2005). Os tratamentos consistiram do milho híbrido transgênico P30F33-1507, do híbrido convencional P30F33 sem aplicação de inseticidas e do híbrido convencional P30F33 com aplicação de inseticidas. As avaliações foram realizadas nas plantas nos seguintes estádios de desenvolvimento: V4, V8, VT (Pendoamento), Polinização (50% abertura das anteras), R4 e R6. As avaliações consistiram em observações diretamente nas plantas, bem como, contagem e identificação de insetos em armadilhas.

Durante as observações visuais dos insetos nas plantas de milho notou-se os seguintes insetos:

Fitófagos: pulgão (Hemiptera: Aphididae); cigarrinha (Hemiptera: Cicadellidae); besouros crisomelídeos (Coleoptera: Chrysomelidae); elaterídeos (Coleoptera: Elateridae); *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae).

Predadores: aranhas (Aranae); bicho-lixeiro (Neuroptera: Chrysopidae); carabídeos com destaque para os gêneros *Callida* e *Lebia* (Coleoptera: Carabidae); tesourinha *Doru luteipes* (Dermaptera: Forficulidade); percevejos predadores com destaque para os gêneros *Orius*, *Geocoris* e *Nabis* (Hemiptera), percevejos da família Reduvidae (Hemiptera); Syrphidae (Diptera); Vespidae (Hymenoptera).

Formigas (Hymenoptera) e baratas (Blattodea) foram também observadas nas plantas.

A tesourinha, *D. luteipes*, foi espécie comum (constante e super dominante) nos diversos tratamentos das duas localidades estudadas sendo a espécie mais abundante e freqüente em comparação com as demais espécies de inimigos naturais. O percevejo pirata, *Orius* sp. depois de *D. luteipes*, foi a espécies mais abundante e frequente entre os predadores. Também as joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae), foram frequentes em ambas as localidades. Em todos os casos, os principais inimigos naturais (*D. luteipes*, *Orius* sp. e joaninhas), foram observados em todos os tratamentos.

Através da análise de agrupamento e análise de componentes principais das amostragens visuais de artrópodes não-alvo presentes em milho, em armadilhas adesivas amarelas e em armadilhas de solo (pitfall), em vários estádios fenológico da planta permitem afirmar que o cultivo do híbrido de milho transgênico Cry1F não diferiu do milho isogênico convencional com relação à efeitos na diversidade ou abundância dos artrópodes não-alvo (herbívoros, predadores e decompositores).

Através da análise de comparação de médias pode-se concluir que não há efeito adverso do milho transgênico Cry1F sobre os principais inimigos naturais predadores de ocorrência na cultura.

No mesmo projeto foi feito um outro estudo de monitoramento de artrópodes não-alvo de solo, em híbrido de milho transgênico contendo o evento TC1507 (Souza et al,

2006). O objetivo foi avaliar o impacto do cultivo de híbrido de milho transgênico contendo o evento TC1507 sobre populações de artrópodes não-alvo que habitam o solo. As comparações das comunidades de artrópodes em Itumbiara e Toledo, utilizando-se a análise de componentes principais e os índices de diversidade e equitabilidade, não evidenciaram diferenças entre os tratamentos. As comunidades nas duas localidades foram similares quanto à presença dos artrópodes mais abundantes. As ordens mais importantes foram as de ácaros Oribatida e Gamasida; e as de insetos Coleoptera e Hymenoptera. As morfoespécies mais importantes foram Microzetidae sp.1, Scheloribatidae sp.1 e Galumnidae sp.1.

O milho transgênico não diferiu do milho convencional sem inseticidas quanto à abundância de toda as ordens e morfoespécies.

Com base nos resultados, concluí-se que não ocorreu impacto significativo do milho transgênico evento TC1507, expressando a proteína Cry1F, sobre os artrópodes não-alvo que habitam o solo, nos dois locais estudados.

Resultados como esses realizados no Brasil tem sido obtidos em vários países. Diversos trabalhos mostram que o algodão e o milho Bt causam pouco ou nenhum efeito sobre os artrópodes não-alvo, sendo que quando ocorre efeito estes são explicados na sua maioria por alterações esperadas na população alvo do transgênico (Morandin e Winston, 2003; Frizzas, 2003; Naranjo *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2005; Daly e Bunting, 2005; Bhatti *et al.*, 2005a,b; Diveley, 2005; Naranjo, 2005; Head *et al.*, 2005; Torres e Ruberson, 2005; Whitehouse *et al.*, 2005). Estudos conduzidos para avaliar especificamente os efeitos de plantas Bt sobre artrópodes não-alvo do solo decompositores, tais como colêmbolos e ácaros oribatídeos, também não apresentaram impacto negativo dos transgênicos (Obrycki *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1997; Sims e Martin, 1997; Bitzer *et al.*, 2005).

Um outro estudo de toxicidade realizado com larvas de crisopídeo (*Chrysoperla carnea*) demonstrou a ausência da toxicidade da proteína Cry1F produzida na forma microbiana. Tão pouco observou-se efeito algum no processo de ecdise. O valor CL50 não pôde ser estabelecido e portanto o mesmo foi estimado como sendo superior a 480 ppm, o que representa até 15 vezes a concentração de Cry1F presente no pólen da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 (Hoxter *et al.*, 1999a e Mayes, 2001b).

Do mesmo modo, um estudo de toxicidade realizado com joaninha (*Hippodamia convergens*) não registrou mortalidade nem sinal algum de toxicidade. Não se pode determinar o valor CL50 para *H. convergens* e portanto estimou-se que seja maior que 480 ppm (Hoxter *et al.*, 1999b e Mayes, 2001e).

A proteína Cry1F expressa na forma microbiana não demonstrou toxicidade alguma contra o himenóptero parasitóide *Nasonia vitripennis*. Não se pôde determinar o valor CL50 e portanto se estimou que seja maior a 320 ppm, o qual representa até 10 vezes a concentração da proteína Cry1F no pólen da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 (Hoxter *et al.*, 1999c e Mayes, 2001d). De maneira similar, a proteína Cry1F não demonstrou ser tóxica a larvas de primeiro instar de borboletas monarcas (Hellmich *et al.*, 2001), bem como a outros insetos não-alvo (Wolt, *et al.*, 2005).

Nos EUA foi feito um estudo para comparar a quantidade de artrópodos benéficos presentes em áreas de campo da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 com milhos convencionais com germoplasma semelhante. Avaliou-se as quantidade de coccinélideos (*Cycloneda munda* e *Coleomegilla maculata*), percevejo predador (*Orius insidiosus*) percevejos da família Reduviidae, percevejos da família Nabidae), crisopídeos da família Hemerobiidae, crisopídeo (*Chrysoperla plorabunda*), coleópteros predadores (Carabidae) e himenóptero parasitóides (Ichneumonidae e Brachonidae), libélulas (Odonata), e de aranhas, visualmente e/ou mediante armadilha. Os resultados demonstraram que a expressão da proteína Cry1F na linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 não tem efeito algum

sobre a presença dos artrópodos benéficos observados. As parcelas foram suficientemente grandes para minimizar o movimento da maioria das espécies entre parcelas porém, existe a possibilidade de que insetos mais móveis, como por exemplo *Orius*, possam ter se movido entre as mesmas (Higgins, 1999).

A proteína Cry1F não demonstrou toxicidade para lagartas da borboleta monarca (*Danaus plexippus*) (Bystrak, 2000). A proteína Cry1F produzida na forma microbiana, truncada, cromatograficamente pura, foi incorporada numa dieta modificada para lepidópteros. Administrou-se esta dieta às larvas neonatas durante 7 dias corridos nos quais foram avaliadas a mortalidade e inibição de crescimento. A CL50 da proteína Cry1F para as lagartas neonatas não pôde ser determinada já que não se registrou mortalidade e a dose mais alta que se pode submeter ao ensaio, 10.000 ng/ml de dieta, foi a dose mais elevada que se poderia incorporar fisicamente à dieta.

Não se observou efeito algum na sobrevivência larval ou no comportamento de adultos de abelhas operárias (*Apis mellifera*). Resultado obtido ao se administrar uma dose única de 2 mg de pólen da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 ou de 5,6 µg de proteína Cry1F microbiana suspensa em uma solução de sacarose a 30% a cada célula da colméia. Os resultados não permitiram determinar a CL50 dietária e portanto estimou que este valor seja superior a 5,6 µg/larva de abelha (Maggi, 1999 e Mayes, 2001a).

A proteína Cry1F expressa na forma microbiana não mostra toxicidade para minhocas (*Eisenia foetida*) à uma concentração equivalente até 100 vezes a incorporação de plantas senescentes da linhagem de milho *Bt* Cry1F 1507 nos 15 cm da parte superior do solo numa densidade de 62.000 plantas por hectare. Não se pode determinar a CL50 e portanto se estimou que seja maior que 1,7 mg/kg de solo (Hoxter *et al.*, 1999d e Mayes, 2001c).

Também foi feito um estudo de laboratório para deteminar os efeitos crônicos da proteína Cry1F na sobrevivência e reprodução de Collembola (*Folsomia candida*) que habitam o solo. Os Collembola tem uma função importante nos ecossistemas do solo, já que se alimentam de materiais vegetais decompostos. Agregou-se a proteína *cry1F* produzida na forma microbiana a levedura da cerveja (alimento padrão dos colémbolos) nas concentrações de 1560, 388 e 79 vezes mais altas que as que se encontram no campo. Os resultados indicaram que depois de alimentar-se com estas dietas durante 28 dias não se registrou mortalidade nem redução na quantidade da progênie comparado com os controles (Halliday, 1998).

No Brasil um estudo de degradação da proteína Cry1F em amostras de raiz de milho e solo do Brasil através de análises quantitativas de ELISA foi realizado na safra agrícola 2005/06 em projeto de liberação no meio ambiente da Pioneer Sementes, aprovado pela CTNBio com colaboração e suporte do Laboratório de Mogi Mirim da Dow AgroSciences Industrial . Os tratamentos consistiram do milho híbrido transgênico Pioneer P30F33-1507 e do híbrido convencional P30F33 com aplicação de inseticidas.

As amostras foram coletadas em 3 períodos diferentes do ciclo da cultura do milho: antes do florescimento, 14-dias após a colheita e após a incorporação da planta no solo. Foram coletados 3 tipos de amostras sendo, solo ao redor da planta, solo da rizosfera e raiz, sendo que na última amostragem somente foi coletado o solo pois a planta foi incorporada ao mesmo. Com base nas informações geradas neste estudo de degradação da proteína Cry1F pode-se concluir que : Análises de amostras de solo da rizosfera e de amostras tiradas ao redor das plantas geneticamente modificadas com o evento TC1507 indicam que a proteína Cry1F, já a partir de pouco antes do florescimento, não conseguiu ser detectada por método quantitativo de ELISA. Apenas as raízes das plantas geneticamente modificadas mostraram a presença da proteína Cry1F antes do florescimento e 14-dias após a colheita. Amostras de solo em parcelas com o evento

TC1507, após a incorporação dos restos da cultura, isto é, 139 e 169 dias depois do plantio, respectivamente em Itumbiara-GO e em Toledo-PR, não revelaram a presença da proteína Cry1F. Desses estudos pode-se concluir que não ocorre acumulação da proteína Cry1F no solo.

6 – Conclusão

As considerações abordadas refletem apenas aspectos do extenso documento apresentado à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Em suma, frente aos diversos estudos realizados no Brasil e em outros países, relativos à biossegurança do Milho Geneticamente Modificado TC1507 (Milho Herculex) conclui-se:

6.1. Características do produto

- Herculex I (HXI) protege as plantas de milho contra um amplo espectro de insetos-praga, notadamente a Lagarta do Cartucho, principal praga do milho no Brasil (Souza, *et. al.*, 2006)
- HXI é um exemplo da utilização de uma proteína natural contribuindo para uma agricultura mais sustentável. Foi desenvolvido em co-autoria pela Dow AgroSciences e Pioneer (Souza *et. al.*, 2006).
- O evento Herculex I foi aprovado para cultivo comercial, como alimento humano e na alimentação animal nos EUA (2001), Canadá (2002) e Argentina (2005) e Colômbia (2006)
- HXI aprovado para importação. No Japão (alimentação humana e alimentação animal, 2002); Austrália (alimentação humana, 2003); Nova Zelândia (alimentação humana, 2003); Coreia do Sul (alimentação humana, 2002 e alimentação animal, 2004); África do Sul (alimentação humana e alimentação animal, 2002), União Européia (alimentação humana, 2006 e alimentação animal, 2005), Taiwan (alimentação humana, 2003); China (alimentação humana e alimentação animal, 2004) e Filipinas (alimentação humana e alimentação animal, 2003) (Agbios, 2007).

6.2. Condições para aprovação do produto

- Para submeter a petição para aprovação do registro comercial do evento Herculex I à CTNBio a Dow AgroSciences e a DuPont do Brasil – Divisão Pioneer Sementes tiveram que realizar um programa de pesquisa a campo nos Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Estas pesquisas foram autorizadas pela CTNBio, para demonstrar que o milho Herculex I é seguro para a saúde humana, saúde animal, e seguro para o meio ambiente (Processos aprovados pela CTNBio).
- A Dow AgroSciences e a DuPont do Brasil – Divisão Pioneer Sementes têm o firme compromisso através de seus programas internos de saúde, segurança e meio ambiente e de suas Comissões Internas de Biossegurança (*CIBio Dow AgroSciences Industrial e CIBio DuPont do Brasil – Divisão Pioneer Sementes*) de fiscalizar seus produtos derivados de biotecnologia nas fases de pesquisa, desenvolvimento e também na fase comercial.
- As características do Herculex I com relação à segurança e à saúde tem sido exaustivamente testadas e cuidadosamente avaliadas por órgãos de vigilância pública nos países onde já foi avaliado ou ainda se encontra em avaliação. Este

acompanhamento se dá desde a fase de pesquisa até a fase de comercialização do produto geneticamente modificado (Souza *et. al.*, 2006).

6.3. Segurança à saúde

- Ambas proteínas encontradas no milho Herculex I, Cry1F e PAT, estão presentes em bactérias de solo não patogênicas para o homem e animais (Van Wert, 1994; Narva *et. al.*, 1998; Evans, 1998).
- Proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis*, como a Cry1F, tem sido utilizadas há vários anos como bioinseticidas em agricultura comercial, como exemplo de marca comercial, temos o Lepinox (FDA, 1996). Recentemente foi desenvolvido pela Embrapa-Cenargen o bioinseticida Bt-horus que já está sendo usado no país para o controle do mosquito transmissor da Dengue.
- Estudos demonstram que as proteínas Cry1F e PAT não tem potencial alergênico (EPA, 1995a, Meyer, 1999; FAO/WHO, 2000)
- O milho Bt, por controlar melhor insetos que atacam a espiga e os grãos indiretamente reduzem o teor de micotoxinas em grãos (Munkvold *et. al.*, 1999; Masoero *et. al.*; 1999).
- Herculex I se apresenta como uma alternativa ao uso exclusivo de inseticidas químicos no controle de pragas do milho.

6.4. Segurança alimentar

- A análise da composição e valor nutricional do milho Herculex comparada com o milho convencional demonstra que os níveis de nutrientes não diferem nos dois tipos de milho. Os resultados mostram que o milho Herculex I e o milho convencional são substancialmente equivalentes (Stauffer e Zeph, 2000).
- A análise da composição do milho HXI mostra que os conteúdos de carboidratos, lipídeos, proteínas, minerais, (como Calcio, Fósforo, Cobre, Manganês, Ferro, Potássio, Sódio, Zinco) e fibras detergente ácido e detergente neutro, correspondem aos do milho convencional. Nesse estudo os conteúdos de aminoácidos, de ácidos graxos, de vitaminas B1, B2, de ácido fólico e de tocoferóis no grão do milho HXI e do milho comum foram similares ou permaneceram dentro da amplitude das determinações citadas na literatura para o milho comum. Os teores de metabólitos secundários como inositol, rafinose, ácido p-cumárico e ácido ferúlico também foram similares no HXI e no milho comum. No caso dos antinutrientes, o ácido fítico foi detectado em níveis semelhantes no OGM e no milho não-OGM e o inibidor de tripsina não foi detectado em nenhum dos dois produtos comparados (Herman *et. al.*, 2004). Baseado na amplitude dos dados citados até então na literatura pode-se concluir que nenhum composto analisado no milho HXI apresentou teores diferentes dos encontrados no milho convencional.
- Vários estudos demonstram que as proteínas Cry1F e PAT são seguras para o consumo humano e animal (EPA, 1996a; EPA, 1995b; EPA, 1997; CFIA, 1998; SCP, 1998; OECD, 1999). Em animais, um estudo de toxicidade oral realizado ao longo de 90 dias em ratos, usando grãos de milho Herculex I, avaliando o comportamento e desenvolvimento dos animais, não diferiu em relação aos animais que consumiram a mesma dieta com milho convencional (Brooks, 2000). Ratos não mostraram toxicidade aguda às proteínas Cry1F e PAT quando alimentados com dose bem mais alta que a ingerida na dieta humana (Kuhn, 1998). Em aves, um estudo com frangos alimentando-se num período longo com milho Herculex I e milho

convencional , mostrou que os animais se equivaleram tanto em aspectos de saúde como em seu desenvolvimento (Zeph, 2000).

6.5. Segurança Ambiental

- Crescentes aumentos na produtividade da terra com o uso de eventos como o Cry1F e outros, garante maior oferta de alimentos sem a necessidade de ampliar a fronteira agrícola com a utilização de áreas frágeis ou áreas de florestas.
- O uso de Herculex I reflete em menor uso de pesticidas reduzindo o risco de impacto ao meio ambiente.
- O milho Herculex não difere do milho convencional para características botânicas. Ambos tem características de plantas domesticadas e não conseguem sobreviver na natureza sem a ajuda do homem .
- O milho Cry1F à semelhança do milho convencional não tem características de planta invasora.
- O milho Herculex I não tem potencial para transferir seus genes para espécies selvagens ou asselvajadas no Brasil, pois os parentes mais próximos, inclusive seu possível ancestral, não ocorrem no país .
- Nos ensaios realizados no Brasil pela Dow AgroSciences e DuPont do Brasil – Divisão Pioneer Sementes com híbridos de milho Herculex I, em experimentos aprovados pela CTNBio e realizados em Indianópolis-MG, Jardinópolis-SP, Mogi Mirim-SP e Castro-PR, comparando-se o milho transgênico com o correspondente convencional, não foram observadas alterações significativas na viabilidade das sementes, germinação, vigor das plantas, florescimento, arquitetura das plantas e resposta aos principais patógenos (Souza *et. al.*, 2006). Portanto as características de sobrevivência do milho Herculex I são comparáveis a aquelas de milho não modificado geneticamente dado que o potencial de sobrevivência no meio ambiente depende de uma completa interação de fatores externos bióticos e abióticos.
- A presença adventícia do HXI pode ser evitada em áreas agrícolas onde várias cultivares não geneticamente modificadas são cultivadas utilizando-se bordaduras de milho não OGM como área de refúgio.
- Estudo de degradação da proteína Cry1F em amostras de solo e da raiz de plantas de milho HX e milho comum, coletadas em Toledo-PR e em Itumbiara-GO, indicou que pouco antes do florescimento já não se conseguiu detectá-la por método quantitativo de ELISA. Apenas as raízes das plantas geneticamente modificadas mostraram a presença da proteína Cry1F antes do florescimento e 14 dias após a colheita. Amostras de solo em parcelas com o evento TC1507 não revelaram a presença da proteína Cry1F após a incorporação dos restos da cultura. Portanto não ocorreu acumulação da proteína Cry1F no solo (Souza *et. al.*, 2006).
- As comparações das comunidades de artrópodes em experimentos em Itumbiara-GO e Toledo-PR, utilizando-se a análise de componentes principais e os índices de diversidade e eqüitabilidade, de modo geral não evidenciaram diferenças entre o milho transgênico e o milho convencional sem inseticidas, quanto à ocorrência das ordens e das morfoespécies de artrópodes. As comunidades nas duas localidades foram similares quanto à presença dos artrópodes mais abundantes (Souza *et. al.*, 2006)
- O número total de inimigos naturais predadores (*Doru luteipes*, *Orius* sp., *Geocoris* spp., Coccinellidae, Chrysopidae, Syrphidae, Carabidae, Formicidae e Araneae), coletados em 6 estágios da cultura em Toledo-PR e em 5 fases em Itumbiara-GO, não diferiu no milho HXI e no milho convencional (Souza *et. al.*, 2006).

- Estudos realizados com parasitóides (Hoxter *et. al.*, 1999a; Mayes, 2001a), em artrópodes benéficos (Higgins, 1999), em abelhas (Maggi, 1999; Mayes, 2001b), em minhocas (Hoxter *et. al.*, 1999b; Mayes, 2001c), em Collembola (Halliday, 1998), em *Daphnia* (Drottar e Krueger, 1999) mostraram que a proteína Cry não causa danos aos organismos estudados.

7 - Referências

- Agbios: Disponível em: <<http://www.agbios.com/>> acesso em: 6 de março de 2007.
- Augustin, S.; Courtin, C; Rejasse, A.; Lorme, P; Genissel, A & Bourguet, D. Genetics of Resistance to Transgenic *Bacillus thuringiensis* Poplars in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 97, n. 3, p. 1058-1064, 2004.
- Barrett, K.L.; Grandy, N.; Harrison, E.G.; Hassan, S.A.; Oomen, P.A. (Eds.). **Guidance document on regulatory testing procedures for pesticides with non-target arthropods**. Proceedings of the ESCORT workshop (European Standard Characteristics of Beneficials Regulatory Testing), Wageningen, the Netherlands, 28-30 March 1994. SETAC Europe.
- Beadle, G. The Ancestry of Corn, **Sci. Am.**, p. 242:112, 1980.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. **Gene**, n.19, p. 327-336, 1982.
- Betz, F.S.; Hammond, B. G.; & Fuchs R.L. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, n. 32, p. 156–173, 2000.
- Bhatti, M.A.; Duan, J.; Head, G.; Jiang, C.; Mckee, M.J.; Nickson, T.E.; Pilcher, C.L.; Pilcher, C.D. Field Evaluation of the Impact of Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-Protected Bt Corn on Foliage-Dwelling Arthropods. **Environmental Entomology**, v.34, p.1336-1345, 2005.
- Bitzer, R.J.; Rice, M.E.; Pilcher, C.D.; Pilcher, C.L.; Lam., W.-K.F. Biodiversity and Community Structure of Epedaphic and Euedaphic Springtails (Collembola) in Transgenic Rootworm Bt Corn. **Environmental Entomology**, v.34, p.1346-1376, 2005.
- Bravo, A. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. **Journal of Bacteriology**, p. 2793-2801, 1997.
- Brooks, K.J. **PAT microbial protein (FL): Acute Oral Toxicity Study in CD-1 Mice**. Report number 991249, an unpublished technical report by Mycogen c/o Dow AgroSciences LLC., Indianapolis, IN. 2000.
- Bystrak, P. **Toxicity of the Cry1F protein to neonate larvae of the monarch butterfly (*Danaus plexippus* (Linnaeus))**. Study number GH-C 5073, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LCC., Indianapolis, IN, 2000.
- CFIA, Decision document 98-22: Determination of the safety of AgrEvo Canada Inc.'s glufosinate ammonium tolerant corn (*Zea mays*) lines, T14 and T25. CFIA, **Plant Health and Production Division, Plant Biotechnology Office, Ottawa**. 1998.

- CFIA Regulatory Directive Dir94-11: The Biology of *Zea mays L.* (Corn/Maize). **Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Division, Plant Biotechnology Office**, Ottawa., 1994.
- Chavaux, J; Seguin, I; Swanson, J. J; Bourguet, D. & Siegfried, B. D. Chronic Exposure of the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* Toxin. **J. Econom. Entomol.** v. 94, n 6, 1564-1570. 2001.
- Cheryan, M. Phytic acid and interactions in food systems. In **CRC Critical Review in Food Science and Nutrition.** p 297-335, 1980.
- Christensen, A.H., R.A. Sharrock, and P.H.Quail. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation **Plant. Mol. Biol.** n.18, p.675-689, 1992
- Cockburn, A. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach. **Journal of Biotechnology**, v. 98, p. 79–106, 2002.
- Cornell University. Bacteria. In: **Biological control: A guide to natural enemies in North America Weeden**, Shelton e Hoffmann (eds). Cornell University, Ithaca, NY, 1996. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/bacteria.html>.
- Dalecky, A.; Ponsard, S.; Bailey, R. I.; Pelissier, C.; Bourguet, D. Resistance Evolution to Bt Crops. Predispersal Mating of European Corn Borers. **PLoS Biology**, v. 4, n. 6, p. 181. 2006.
- Daly, T.; Buntin, G.D. Effect of *Bacillus thuringiensis* Transgenic Corn for Lepidopteran Control on Nontarget Arthropods. **Environmental Entomology**, v.34, p.1292-1301, 2005.
- Davis, F.M., Ng, S.S.; Williams, W.P. Visual Rating Scales for Screening Whorl-Stage Corn for Resistance to Fall Armyworm. **Technical Bulletin 186.** Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station. 1992.
- Davis, F. M., Williams, W. P. Methods used to screen maize for and to determine mechanisms of resistance to theSouthwestern corn borer and Fall armyworm. In: International Symposium on Methodologies for DevelopmentHost Plant Resistance to Maize Insects, CIMMYT, México.1989, **Proceedings**, 1989. p. 101-104
- De Wet, J.M.J., Timothy, D.H., Hilu, K.W., and Fletcher, G.B. Systematics of South American *Tripsacum* (*Gramineae*). **Amer. J. Bot.** n. 68, p. 269-276, 1991.
- Del Valle, F.R., Pico, M.L., Camacho, J.L., Bourges, H. Effect of processing parameters on trypsin inhibitor and lectin contents of tortillas from whole raw corn-soybean mixtures. **J. Food Science**, n. 48, p. 246-252, 1993.
- Della Valle, C. and Pescio F.E. Complejo Agroindustrial Maicero. Análisis de su transformación en la ultima década. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.** República Argentina. 2000.
- Dively, G.P. Impact of Transgenic VIP3A * Cry1Ab Lepidopteran-resistant Field Corn on the Nontarget Arthropod Community. **Environmental Entomology**, v.34, p.1267-1291, 2005
- Doebley, J.F. Maize introgression into teosinte – a reappraisal. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v. 71, p. 1100-1113, 1994.

- Drottar, K.R. and Krueger, H.O. **Bt Cry1F delta-endotoxin: A 48-hour static-renewal acute toxicity test with the Cladoceran (*Daphina magna*) using bacterially expressed Bt Cry1F delta-endotoxin, and pollen from maize expressing Bt Cry1F delta-endotoxin.** Study number 354A-111, an unpublished technical report by Mycogen c/o Dow AgroSciences LCC. Indianapolis, IN. 1999.
- Eckes, P., Vijtewaal, B., Donn, G. Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-phosphinothricin in plants. **J. Cell. Biochem.** n. 13D, p. 334. 1989.
- EPA. 1997. Phosphinothricin Acetyltransferase and the Genetic Material Necessary for its Production in All Plants; Exemption from the Requirement of a Tolerance On All Raw Agricultural Commodities. **Fed. Reg.**, v. 62, p. 17717-17720, 1997.
- EPA. Plant pesticide *Bacillus thuringiensis* CryIIIa delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production; tolerance exemption. **Fed. Reg. PP3F4273/R2132; FRL-4953-2.**, 1995a.
- EPA. Plant pesticide inert ingredient phosphinothricin acetyltransferase (PAT) and the genetic material necessary for its production (plasmid vector pCIBP3064) in corn; tolerance exemption. **Fed. Reg.**, v. 60, n. 158, p. 42450-42453, 1995b.
- EPA. Lepinox Bioinsecticide (formerly Crystar Technical) for the manufacture of insecticide end-use products; for application to vegetables and cole crops, herbs, spices, ornamentals, and other crops. **Registration Number 55638-35), 1996.**
- EPA. *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in all plants; exemption from requirement of a tolerance **Fed. Reg.**, v. 61, n. 150, p. 40340-40343, 1996a.
- EPA. Microbial pesticide test guidelines. OPPTS 885.4340 Non-target insect testing, **Tier 1. 712-C-96-336**, 1996b.
- Evans, S.L. **Equivalency of microbial and maize expressed Cry1F protein; characterization of test substances for biochemical and toxicological studies.** Report number MYCO98-001, an unpublished technical report by Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LCC. Indianapolis, IN. 1998.
- FAO, 2001. <http://apps.fao.org/>
- FAO/WHO. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland., 2000.
- FAS online. 2001. News. www.fas.usda.gov.
- FDA (Food and Drug Administration). U. S. Food and Drug Administration. Statement of policy: foods derived from new plant varieties . **Fed. Reg. (USA)**, n. 57, p. 22984-23005, 1992.
- Frizzas, M.R. **Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a comunidade de insetos.** 2003. 192. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- Galinat, W.C. The origin of Corn. pp. 1-31. In: **Corn and Corn Improvement (El origen del maíz**, pp 1-31, En: Maíz y Fitomejoramiento del maíz), Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds.) 3rd ed., American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, WI. 1988.

- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920 p. 2002.
- Gao, Y; Fencil, K.J; Xu, X.; Schwedler, D. A.; Gilbert, J. R & Herman, R. D. Purification and Characterization of a Chimeric Cry1F δ -Endotoxin Expressed in Transgenic Cotton Plants. **J. Agric. Food Chem.**, n. 54, p. 829-835, 2006.
- Gatch E. W., Hellmich R. L., Munkvold, G. P. A Comparison of Maize Stalk Rot Occurrence in Bt and Non-Bt Hybrids. **Plant Disease**, v. 86, n. 10, 2002.
- General Accounting Office (GAO). **Biotechnology**. Information on Prices of Genetically Modified Seeds in the United States and Argentina. GAO/RCED/NSAID-00-55. 2000.
- Halliday, W.R. **Chronic exposure of *Folsomia candida* to bacterially expressed CRY1F protein**. Study number 7535-98-0078-AC-001, an unpublished technical report by Mycogen c/o Dow AgroSciences LCC. Indianapolis, IN. 1998.
- Head, G.; Moar, W.; Eubanks, M.; Freeman, B.; Ruberson, J.; Hagerty, A.; Turnipseed, S. A multiyear, large-scale comparison of arthropod populations on commercially managed *Bt* and non-*Bt* cotton fields. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1193-1210, 2005.
- Hellmich, L. R.; Siegfried. B. D.; Sears, M. K.; Stanley-Horn, D., E.; Daniels, M. J.; Mattila, M. D. H.; Spencer, T. Bidne, K. G. & Lewis, L. C. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis* purified proteins and pollen. **PNAS**. v. 98. n. 21, p. 11927, 2001
- Herman, R. A.; Phillips, A. M.; Collins, R.A.; Tagliani, L. A.; Claussen, F. A.; Graham, C.D.; Bickers, B. L.; Harris, T. A.; Prochaska, L. M. Compositional Equivalency of Cry1F corn Event TC6275 and conventional corn (*Zea mays* L.). **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 2726-2734, 2004.
- Herman, R. A.; Wolt, J. D., Halliday, W.R. Rapid Degradation of the Cry1F Insecticidal Crystal Protein in Soil. **J. Agric. Food Chem.**, n. 50, p. 7076-7078, 2002.
- Higgins, L. **Field survey of beneficial arthropods associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1F maize**. Study number PHI99-018, an unpublished technical report by Pioneer Hi-Bred International, Inc. 1999.
- Hoxter, K.A., Porch, J.R., Krueger, H.O. 1999a. **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: A dietary toxicity study with green lacewing larvae.** Study number 354-115A, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation. Indianapolis, IN, 1999a.
- Hoxter, K.A.; Porch, J.R.; Krueger, H.O. **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: A dietary toxicity study with the ladybird beetle**. Study number 354-113B, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation. Indianapolis, IN, 1999b.
- Hoxter, K.A., Porch, J.R.; Krueger, H.O. **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: A dietary toxicity study with parasitic Hymenoptera**. Study number 354-114D, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation. Indianapolis, IN, 1999c.

- Hoxter, K.A., Porch, J.R.; Krueger, H.O. **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: An acute toxicity study with the earthworm in an artificial soil substrate.** Study number 354-112, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation. Indianapolis, IN, 1999d.
- Hua G.; Masson L.; Jurat-Fuentes, J. Schwab, G. & Adang, M. Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry d-Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Ostrinia nubilalis*. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 872–879, 2001.
- ICTV Database 1998. 15.0.1.0.001 *Cauliflower mosaic virus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/15010001.htm>).
- IFBC. 1990. Safety Evaluation of Whole Foods and Other Complex Mixtures (Chapter 6). In: **Biotechnologies and Food: Assuring the Safety of Foods Produced by Genetic Modification International Food Biotechnology Council.** (eds. Coulston, F. and Kolbye, Jr., A.C.). Published in: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Volume 12, No. 3, December 1990. Academic Press, Inc.
- Iowa Gold Catalog, 1994. **Iowa Department of Agriculture and Land Stewardship.** 1993 Catalog.
- Kiesselbach, T.A. The Structure and Reproduction of Corn. **Nebraska Agricultural Experimental Station Research Bulletin.** 1949.
- Klein, T.M., E.D. Wolf, R. Wu, and J.C. Sanford. *High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells.* **Nature**, n. 327, p. 70-73., 1987.
- Kuhn, J.O. **Cry1F *Bt.* var. *aizawai* delta-endoprotein: Acute oral toxicity study in mice.** Report number 4281-98, an unpublished technical report by Mycogen Seeds c/o Dow AgroSciences LLC. Indianapolis, IN. 1998.
- Ladics, G. S; Bardina, L; Cressman R. F.; Mattsson, J. L.; Sampson H. A. Lack of cross-reactivity between the *Bacillus thuringiensis* derived protein Cry1F in maize grain and dust mite Der p7 protein with human sera positive for Der p7-IgE. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, n. 44, p. 136–143, 2006.
- Lopez, M.D.; Prasifka, J.R.; Bruck, D.J.; Lewis, L.C. Utility of Ground Beetle Species in Field Tests of Potential Nontarget Effects of Bt Crops. **Environmental Entomology**, v.34, p.1317-1324, 2005
- Maggi, V.L. **Evaluation of the dietary effect(s) on honeybee development using bacterially expressed Bt Cry1F delta-endotoxin and pollen from maize expressing Bt Cry1F delta-endotoxin.** Study number CAR 172-99, an unpublished technical report by Mycogen c/o Dow AgroSciences LCC. Indianapolis, IN. 1999.
- Masoero, F., Moschini, M., Rossi, F., Prandini, A., and Pietri. Al. 1999. **Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A9b) grown in northern Italy.** *Maydica* v. 44, p. 205-209, 1999.
- Mayes, M. Supplement to MRID 45041503: **Evaluation of the dietary effect(s) on honeybee development using bacterially expressed Bt Cry1F delta-endotoxin and pollen from maize expressing Bt Cry1F delta-endotoxin.** Report number: GH-C 5172, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC. Indianapolis, IN. 2001a.

- Mayes, M. Supplement to MRID 45020109: **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: A dietary toxicity study with green lacewing larvae.** Report number: GH-C 5168, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC. Indianapolis, IN. 2001b.
- Mayes, M. Supplement to MRID 45020106: **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: An acute toxicity study with the earthworm in an artificial soil substrate.** Report number: GH-C 5171, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC. Indianapolis, IN. 2001c.
- Mayes, M. Supplement to MRID 45020111: **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: A dietary toxicity study with parasitic Hymenoptera.** Report number: GH-C 5170, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC. Indianapolis, IN. 2001d.
- Mayes, M. Supplement to MRID 45020110: **CRY1F *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* delta endotoxin: A dietary toxicity study with the ladybird beetle.** Report number: GH-C 5169, an unpublished technical report by Dow AgroSciences LLC. Indianapolis, IN. 2001e.
- McClintock, J.T., Schaffer, C.R., Sjoblad, R.D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Pestic. Sci.**, n.45, p. 95-105, 1995.
- McGloughin, M. Ten reasons why biotechnology will be important to the Developing World. **AgBioForum**, v. 2, n. 3-4, p.163-174, 1999.
- McWhorter, E. Bt Cotton: Management Prevention pays off. **Cotton Farming**, p.14-15, June, 1998.
- Merritt, C.R. The commercialization of transgenic crops – the Bt experience. In: Biotechnology in crop protection: **Facts and fallacies**. 1998 BCPC Symposium Proceedings, n. 71, p. 79-86. 1998.
- Meyer, T. **Comparison of amino acid sequence similarity of Cry1F and PAT proteins to known allergen proteins.** Report number PHI99-013, an unpublished technical report by Pioneer Hi-Bred International, Inc. 1999.
- Morandin, L. A.; Winston, M. L. Effects of novel pesticides on bumble bees (*Hymenoptera*: *Apidae*) colony health and foraging ability. **Environmental Entomology**, v.32, n.3, p.555-563, 2003.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L., Rice, L. G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. **Plant Disease**, n. 83, p. 130-138. 1999.
- Naranjo, S. E. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* Cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1193-1210, 2005a.
- Naranjo, S.E.; Head, G.; Dively, G.P. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: Introduction. **Environmental Entomology**, v.34, p.1178-1180, 2005.
- Narva, K.; Zeph, L.; Jayne, S. **Product characterization data for *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* Cry1F insect control protein as expressed in maize.** An unpublished technical report by Mycogen c/o Dow AgroSciences LCC. Indianapolis, IN. 1998.

- Obrycki, J.J.; Losey, J.E.; Taylor, O.R.; Jesse, L.C.H. Transgenic insecticidal corn: Beyond toxicity to ecological complexity. **Bioscience**, v.51, n.5, p.353-361, 2001.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter (Identificación de secuencias de DNA requeridas para la actividad del promotor 35S del virus mosaico de la coliflor). **Nature**, v. 313, p. 810-812.
- OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. **Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology**, No. 11. 1999.
- Pietrzak, M., Shillito, R., Hohn, T., Potrykus, I. Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. **Nucleic Acids Research** 14, p. 5857-5868, 1986.
- Processos aprovados pela CTNBio. Concluídos: 01200.000200/2002-49, 01200.002223/2004-50, 01200.004778/2004-36, 01200.007232/2006-07, e em andamento: 01200.005981/2002-68, 01200.000440/2005-96, 01200.006293/2004-87, 01200.003401/2005-41, 01200.003378/2005-94, 01200.003983/2005-65, 01200.003381/2005-16, 01200.004173/2005-26, 01200.003379/2005-39 e 01200.006969/2005-13).
- Raynor, G.S., Ogden, E.C. and Hayes, J.V. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. **Agronomy J.**, v. 64, p. 420-427. 1972.
- Salvador R.J. Maize. In: **The Encyclopedia of Mexico: History, Culture and Society** (Vol. 2). Werner, M.S. (ed). Fitzroy Dearborn Publishers, Chicago, Illinois. 1997.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., and Dean, D. H. 1998 *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Reviews**. Sept., 1998. p. 775-806.
- Schuler, T.H.; Potting, R.P.J.; Denholm, I.; Poppy, G.M. Parasitoid behaviour and Bt plants. **Nature**, v.400, p.855, 1999.
- SCP. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding submission for placing on the market of glufosinate tolerant corns (*Zea mays*) transformation event T25 by the AgrEvo Company ((Notification C/F/95/12/07). 1998.
- Seagraves, M.P.; MacPherson, R.M. Residual Susceptibility of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) to Four Agricultural Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.96, p.645-648, 2003
- Shaw, R.H. Climatic requirement. In: **Corn and Corn Improvement**. Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, pp. 591-623. 1988.
- Sims, S. R.; Martin, J. W. Effect of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins CryIA(b), CryIA(c), CryIIA, and CryIIIA on *Folsomia candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collembola). **Pedobiologia**, v.41, p.412-416, 1997.
- Siqueira, H. A. A; Moellenbeck, D.; Spencer, T; & Siegfried, B. D. Cross-Resistance of CryIAb-Selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins. **J. Econ. Entomol.**, v. 97, n. 3, p. 1049-1057, 2004.

- Smith, J.S.C., M.M. Goodman, C.W. Stuber. Relationships between maize and teosinte of Mexico and Guatemala: numerical analysis of allozyme data. **Economic Botany**, v. 39, p.12-24. 1985.
- Souza, G.D.; Kuhar, G. Silva, W.J.; Guimarães, F.B. **Relatório de Biossegurança do Milho Herculex I, evento TC1507**. Processo CTNBio nº 01200.007232/2006-07 submetido em 17 de Dezembro de 2006. Brasília, DF. 2006
- Stauffer, C.; Zeph, L. **Compositional analysis of maize MPS hybrid line 1507**. Report number PHI98-012, an unpublished technical report by Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2000.
- Torres, J. B.; Ruberson, J. R. Canopy and ground-dwelling predatory arthropods in commercial *Bt* and non-*Bt* cotton fields: patterns and mechanisms. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1242-1256, 2005.
- USDA. Availability of determination of no regulated status for genetically engineered corn. **Fed. Reg.**, v. 60, n. 134, p. 36095-36096. 1995.
- Van Wert, S. L. **Petition for determination of nonregulated status: glufosinate resistant corn transformation events T14 and T25**. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC, 1994.
- Walbot, V.; Messing, J. Molecular genetics of corn. In: **Corn and Corn Improvement**. Sprague, G.F. and Dudley, J.W. (eds). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, p. 389-429. 1998.
- Watson, S.A. Corn: Amazing Maize. General Properties. pp. 3-29. **In: CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture**, Vol. II: Part 1 Plant Products. I.A. Wolff (ed). CRC Press, Inc., Florida. 1982.
- Watson, S.A. Structure and Composition. pp. 53-82. **In: Corn: Chemistry and Technology**, S.A. Watson and P.E. Ransted (eds). American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota. 1987.
- Watson, S.A. Corn marketing, processing and utilization. pp 881-940. **In: Corn and Corn Improvement**, Third Edition. Sprague, G.F. and J.W. Dudley, (eds) American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc. Madison, WI. 1988.
- Wehrmann, A., A. Van Vliet, C. Opsomer, J. Botterman, A. Schulz. The similarities of bar and pat genes products make them equally applicable for plant engineers. **Nature Biotechnology**, n. 14, p.1274-1278. 1996.
- White, P.J. and Pollak, L.M. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition, and Nutritive Values. **Cereal Foods World**, n. 40, p. 756-762.1995.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Pühler, A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. **Gene**, n. 70, p. 25-37. 1988.
- Wolt, J.D.; Conlan, C. A. And Majima, K. An ecological risk assessment of Cry1F maize pollen impact to pale grass blue butterfly. **Environ. Biosafety Res.** n. 4, p. 243-251. 2005.

Wych, R.D.. *Production of hybrid seed corn. pp 565-608. In: Corn and Corn Improvement* (Producción de maíz de semilla híbrida. Pp 565-608., Third Edition. Sprague, G.F. and J.W. Dudley, (eds) American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc. Madison, WI. 1988.

Zeph, L. **Nutritional equivalence of Bt Cry1F maize – Poultry feeding study.** Study number PHI-99-010, an unpublished report by Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2000.