

PARECER TÉCNICO Nº 987/2007

Processo nº: 01200.005154/1998-36

Requerente: Bayer S.A.

CNPJ: 18.459.628/0043-74

Endereço: Rua Verbo Divino, 1207 - Bloco B - 2º andar - Chácara Santo Antônio; São Paulo - SP; CEP: 04719-002

Assunto: Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado

Extrato Prévio: Comunicado nº 070/1999 publicado no D.O.U. de 06 de janeiro de 1999

Reunião: 102ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 16 de maio de 2007

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do pedido de Parecer Técnico para liberação comercial de milho tolerante ao herbicida glufosinato de amônio, geneticamente modificado, bem como de todas as progênies provenientes do evento de transformação T25 e suas derivadas de cruzamento de linhagens e populações não transgênicas de milho com as linhagens portadoras do evento T25, concluiu pelo seu DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico.

A Bayer S.A. solicitou à CTNBio Parecer Técnico para o livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, importação, liberação e descarte de milho tolerante ao herbicida glufosinato de amônio - Milho Liberty Link - evento T25. Foi inserido na planta o gene *pat*, responsável pela síntese da enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que catalisa a conversão de L-fosfinotricina (glufosinato de amônio) a produtos não tóxicos, inativando o ingrediente ativo e, deste modo, conferindo à planta a característica de tolerância ao herbicida. O gene *pat* é uma versão modificada do gene isolado da bactéria natural do solo, *Streptomyces viridochromogenes*, estirpe Tü 494, e foi inserido nas células vegetais por meio de incorporação direta de ADN em protoplastos de milho (eletroporação), através do plasmídeo vetor pUC/Ac. As seqüências iniciadoras desenhadas visando a identificação do evento que são apresentadas como informação confidencial no documento intitulado *Comunicações posteriores à submissão do relatório de biossegurança do evento T25* deverão ser colocadas à disposição do público. Por se tratar de liberação comercial, não há necessidade de manter a confidencialidade. A proteína PAT foi detectada em baixos níveis nos tecidos vegetais analisados e possui rápida degradação nos fluidos gástricos e intestinais, apresentando grande suscetibilidade à digestão e desnaturação térmica, sendo altamente improvável que possa ter algum efeito tóxico ou alergênico. A modificação genética introduzida no evento T25 não resultou em diferenças importantes de composição química relativa a nutrientes, estando dentro da faixa de variação normal entre as variedades convencionais. A espécie silvestre mais próxima do milho é o teosinte, encontrado no México e em alguns locais da América Central. Portanto, não há no Brasil espécies silvestres com que o milho possa cruzar. A coexistência entre cultivares de milhos convencionais (melhoradas ou crioulas) e cultivares transgênicos de milhos é possível do ponto de vista agrônomo. Ainda assim, a probabilidade de fixação do alelo contendo a seqüência gênica que

Secretaria Executiva da CTNBio

SPO - Área 05 - Quadra 03 Bloco B - Térreo - Salas 08 a 10

Brasília, DF - CEP: 70610-200

Fones: (55)(61) 3411 5516 - FAX: (55)(61) 3317-7475

confere tolerância ao glufosinato de amônio na população é muito reduzida na ausência de pressão de seleção. O milho é uma planta incapaz de sobreviver em condições naturais, quando não assistida tecnicamente. Não há, portanto, qualquer possibilidade de que o milho se transforme numa planta invasora ou daninha. Culturas geneticamente modificadas se comportam de modo semelhante às culturas convencionais correspondentes, não tendo sido detectadas, até o momento, grandes alterações nas estruturas das comunidades microbianas dos solos. Adicionalmente, o gene *pat* já existe no solo, uma vez que é oriundo de uma bactéria natural do solo, *S. viridochromogenes*. O glufosinato de amônio está registrado no Brasil, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no IBAMA, e com monografia aprovada pelo Ministério da Saúde, sendo comercializado no Brasil e em vários outros países. Assim, outras normas deverão ser observadas quando do registro do milho T25, como a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989 (Lei de Agrotóxicos), especialmente no que diz respeito aos limites aceitáveis para resíduos de herbicidas a serem estabelecidos pelos órgãos e entidades de registro e fiscalização. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas às normas para coexistência e ao plano de monitoramento pós-comercialização, a serem publicados pela CTNBio oportunamente. Assim sendo, a CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal.

PARECER TÉCNICO DA CTNBio

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Milho Liberty Link, Evento T25

Requerente: Bayer S.A.

Espécie: *Zea mays* – Milho

Característica Inserida: Tolerância ao herbicida Glufosinato de Amônio

Método de introdução da característica: transformação direta de protoplastos pelo processo de eletroporação.

Uso proposto: produção de silagem e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.

II. Informações Gerais

O gênero *Zea* pertence à família Gramineae e possui quatro espécies, sendo o milho *Zea mays* ssp. *mays* L., a espécie de maior importância econômica. O número de cromossomos em *Z. mays* é $2n = 20, 21, 22, 24$ ⁽⁵⁾. Há muito se sabe que o centro de origem de *Zea mays* ssp. *mays* compreende o México e a América Central ⁽¹²⁾. O milho é uma planta alógama e anual. A disseminação de genes pode ocorrer via polinização cruzada com uma planta sexualmente compatível ou plantas parentais

silvestres nas imediações. O milho é polinizado pelo vento e a disseminação do pólen é determinada pela velocidade e direção dos ventos. No entanto, a viabilidade do pólen de milho, em condições extremamente favoráveis, é de no máximo 24 horas. A espécie silvestre mais próxima ao milho é o teosinte, encontrado no México e em alguns locais da América Central, onde pode cruzar com o milho cultivado em campos de produção. O milho cultivado pode ser também cruzado com o gênero mais distante *Tripsacum*. Esse cruzamento, porém, ocorre com grande dificuldade e resulta em progênie macho-estéril.

O milho tem uma história de mais de oito mil anos nas Américas e é, atualmente, a espécie cultivada que atingiu o mais elevado grau de domesticação e só sobrevive na natureza quando cultivado pelo homem ⁽¹⁾.

De todas as plantas cultivadas, provavelmente é a que possui a maior variabilidade genética. Existem, hoje, identificadas cerca de 300 raças de milho e, dentro de cada raça, milhares de cultivares. Normalmente, a manutenção dessa variabilidade genética tem sido feita através do armazenamento individualizado, em bancos de germoplasma, com condições controladas de umidade e temperatura. Existem vários bancos de germoplasma de milho no Brasil e no mundo. A Embrapa possui dois bancos de germoplasma, um na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF, e outro na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG.

O milho é cultivado comercialmente em mais de 100 países, com uma produção total estimada em 705 milhões de toneladas/ano. Os maiores produtores mundiais de milho são: Estados Unidos, China, Brasil, México, França e Índia. O milho é utilizado principalmente para a produção de rações animais e alimentos processados e, recentemente, na produção de álcool combustível. O Brasil cultivou, na última safra, 12 milhões de hectares de milho. Enquanto a produtividade média nos EUA é de 9,0 e na Argentina de 7,0 toneladas/ha, a produtividade média no Brasil, foi de 3,5 toneladas/ha. Essa baixa produtividade da cultura do milho no Brasil não se deve à falta de tecnologia, mas ao fato de que uma parte significativa dos agricultores brasileiros que plantam milho não utiliza sementes melhoradas ou não tem acesso às tecnologias modernas de cultivo. Agricultores do Centro-Oeste brasileiro que utilizam tecnologia moderna e sementes de híbridos simples tropicais conseguem produtividade média semelhante à obtida por seus pares nos EUA, ou seja, 9,0 toneladas/ha.

O trabalho científico de melhoramento de milho ("era do milho híbrido") iniciou-se no Brasil por volta de 1930 no Instituto Agrônomo de Campinas - IAC e na Universidade Federal de Viçosa - UFV. Hoje, temos no Brasil dezenas de empresas nacionais e estrangeiras que colocaram à disposição, na safra 2006/2007, aproximadamente 275 diferentes tipos de cultivares de milho, melhorados e adaptados às condições tropicais do país. Isso é o resultado de mais de 50 anos de melhoramento genético de milho tropical que teve seu início com as chamadas raças de *milho crioulo*. Vale

ressaltar ainda que, nesse universo de 275 genótipos comerciais, temos desde variedades crioulas (milhos melhorados por pequenos agricultores, cujas sementes podem ser reusadas) a sementes de híbridos simples de última geração (para plantios de alta tecnologia, com potencial de produção acima de 12 toneladas/ha). Hoje, o Brasil desenvolve o maior, o mais eficiente e o mais tradicional programa de melhoramento de milho tropical do mundo.

O evento comercial Milho Liberty Link foi obtido pela transformação direta de protoplastos pelo processo de eletroporação. A tolerância ao herbicida glufosinato de amônio foi obtida pela introdução do gene que expressa a proteína PAT (Fosfinotricina N-acetyltransferase) isolada de *Streptomyces viridochromogenes* que, ao catalisar a acetilação da L-fosfinotricina (glufosinato de amônio), promove a inativação do componente ativo. Como consequência, plantas do referido evento de transformação são resistentes ao herbicida, permitindo seu emprego no controle de plantas invasoras.

No Brasil, várias liberações planejadas no meio ambiente, em caráter experimental, do milho T25, foram conduzidas após aprovação da CTNBio em regiões representativas da cultura do milho, compreendendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Goiás, Rio Grande do Sul e Bahia.

III. Descrição do OGM e proteínas expressas

O evento comercial Liberty Link foi obtido pela transformação direta de protoplastos da linhagem de milho He/89 através do uso de polietilenoglicol (PEG) com o plasmídeo pUC/Ac inteiro contendo os elementos gênicos de interesse. Os protoplastos transformados foram cultivados sob condições de seleção na presença do herbicida glufosinato de amônio, também conhecido com L-Fosfinotricina (PPT – Phosphinotricin) até originarem aglomerados celulares que foram posteriormente regenerados a plantas normais conforme protocolo estabelecido por Mórocz e colaboradores ⁽¹⁴⁾.

Os principais elementos que compõem o *cassete* de expressão contendo o gene *pat*, assim como os principais elementos presentes no plasmídeo pUC/Ac são:

- a. plasmídeo pUC18: plasmídeo de *Escherichia coli* com alto número de cópias, usado para clonagem de fragmentos de ADN;
- b. *ampR* – gene que confere resistência à ampicilina obtido de *E. coli* e que codifica β -Lactamase (*bla*), sendo expresso somente em bactérias, uma vez que está sob controle de promotor procariótico;
- c. Ori-pUC – origem de replicação (ColE1) do plasmídeo pUC18;
- d. P-35S – promotor do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor;

- e. *pat* – seqüência codificadora do gene *pat* de *S. viridochromogenes* modificado com códons preferenciais para plantas, uma vez que a seqüência original apresenta alto teor de G:C, atípico para plantas;
- f. T-35S – região terminadora não traduzida em proteína, obtida do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor.

Estudos moleculares do evento T25 apresentados no processo permitem visualizar a forma como uma cópia do inserto foi introduzida no genoma do milho LL. O gene *bla* que confere resistência à ampicilina está presente, mas foi fragmentado, tendo sua porção do nucleotídeo 6 ao 195 eliminada do evento. Os estudos também mostram que uma seqüência similar ao promotor 35S encontra-se ao final do inserto flanqueando a outra porção do gene *bla* presente no inserto, correspondente aos nucleotídeos 196 a 861. Também está presente no inserto a região de replicação (ColE1) do plasmídeo pUC18, assim como o *cassete* de expressão com a seqüência codificadora do gene *pat* com as regiões promotoras e terminadoras do transcrito 35S na conformação correta para expressão do gene *pat*, que foi introduzido no genoma do milho em cópia única por meio de incorporação direta pelo método da eletroporação.

Na caracterização do evento T25 também foram seqüenciadas as regiões de ADN genômico do milho que flanqueiam o local do inserto. Isso permitiu identificar que a região onde foi inserido apresenta alta similaridade com um dos alelos do gene da desidrogenase alcoólica do milho. Provavelmente, este alelo foi inativado, mas como este gene apresenta alto número de cópias no genoma da espécie⁽¹⁷⁾, a inserção dos elementos descritos acima não prejudicou, aparentemente, o desenvolvimento e as características agrônômicas das plantas. Nenhum dado molecular foi apresentado confirmando ou não a inativação da álcool-desidrogenase (gene bank acesso nº AF1223535). Entretanto, o evento T25 foi testado a campo e em contenção nos Estados Unidos e no Canadá e a comparação entre o evento T25 e plantas de milho híbrido não modificado geneticamente não identificou alterações nas características agrônômicas que estejam fora da faixa normal de variabilidade para características como produtividade, estatura de plantas, ciclo, susceptibilidade a doenças e pragas, componentes do rendimento e outras. Nas liberações planejadas no meio ambiente conduzidas no Brasil, também não foram observadas alterações nas características agrônômicas do milho T25 que estivessem fora dos padrões encontrados em híbridos e linhagens de milho não modificadas geneticamente. Assim, é possível assumir que a inserção do fragmento descrito acima no genoma do milho não alterou suas características fenotípicas normais.

O seqüenciamento das regiões genômicas do milho que flanqueiam o inserto também são importantes, pois, permitem identificar esse evento como único. Foram seqüenciados os flancos na região 5', 151pb, e na região 3', 121pb a partir do inserto. As seqüências iniciadoras desenhadas para identificar o evento e que são apresentadas como informação confidencial no documento

Comunicações posteriores à submissão do relatório de biossegurança do evento T25 estão à disposição do público.

O seqüenciamento de todo o inserto presente no evento T25 também permitiu identificar, na junção entre o fragmento maior do gene *bla* e a região com elementos similares ao promotor 35S, dois quadros de leitura abertos (ORF – *Open Reading Frame*): ORF-1, codificando 253 aminoácidos e ORF-2, codificando 109 aminoácidos. A requerente não descreve se estas ORF codificam alguma proteína de função conhecida. Também não foram apresentados dados confirmando ou não a expressão dessas proteínas hipotéticas no evento T25. Nas duas ORF, o códon de iniciação encontra-se dentro do fragmento similar ao promotor 35S e não dentro do fragmento do gene *bla*. Esta situação, assim como a presença incompleta de toda a seqüência do promotor 35S nessa região, provavelmente⁽¹⁶⁾ inviabilizaria a expressão das ORF 1 e 2.

A construção utilizada na transformação coloca o gene *bla* sob controle de um promotor procariótico, fazendo com que este gene seja expresso apenas em bactérias⁽¹⁰⁾. Mesmo estando o gene *bla* truncado no evento T25, foram conduzidos testes para identificar a presença da enzima β -lactamase e de transcritos. Não foram detectados atividade enzimática ou transcritos do gene *bla* em nenhuma das partes vegetativas e reprodutivas do milho Liberty Link.

A análise de expressão da proteína PAT foi feita em folhas, raízes, caules, grãos e pólen através de TLC, HPLC e ELISA. Não foi possível detectar a presença de atividade da proteína em grãos de pólen. Em sementes, raízes, folhas e caules a atividade detectada foi de 0.68, 5.36, 41.32 e 50.95 mU/mg, respectivamente. Considerando-se que o promotor utilizado é o constitutivo CaMV 35S, poder-se-ia esperar expressão de PAT em todos os tecidos em níveis semelhantes. Entretanto, já é conhecido que o promotor 35S, dependendo do tecido e do local de inserção no genoma da planta modificada geneticamente, pode apresentar variações na sua capacidade de ativação gênica^(9,10).

O número de insertos foi estimado através de *Southern Blots* feitos com cinco enzimas de restrição e confirmado como uma cópia por meio de testes de segregação na progênie de cruzamentos feitos entre plantas hemizigóticas e linhagens não modificadas geneticamente. Esses resultados indicaram que o gene *pat* é transmitido de forma estável entre gerações e comporta-se como um gene normal e dominante.

IV. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

A avaliação de segurança de alimentos derivados de matérias-primas geneticamente modificadas é baseada na análise de risco, metodologia científica que compreende as etapas de avaliação, gerenciamento e comunicação de risco. Na etapa de avaliação de risco é buscada a caracterização qualitativa e quantitativa dos potenciais efeitos adversos, tendo como balizador o conceito da equivalência substancial, para identificação de eventuais diferenças entre o novo alimento e o seu correspondente convencional.

Para avaliar a segurança de uma matéria-prima alimentar geneticamente modificada, ou sua equivalência ao alimento convencional, é recomendável que quatro elementos principais sejam analisados, mais notadamente: (1) a variedade parental, ou seja, a planta que deu origem à nova matéria-prima geneticamente modificada; (2) o processo de transformação, incluindo a caracterização da construção utilizada e do evento resultante; (3) o produto do gene inserido e o potencial de toxicidade e alergenidade e, finalmente; (4) a composição da nova variedade resultante da transformação genética. O conjunto de dados dessas análises deve permitir a identificação e caracterização dos potenciais efeitos adversos associados com o consumo da nova matéria-prima, subsidiando as etapas de gerenciamento e comunicação de risco.

De acordo com a requerente, o evento T25 deriva da transformação de células da linhagem He/89 de milho comum *Zea mays*, espécie caracterizada em profundidade e sobre a qual existe sólido histórico de segurança para consumo humano e animal. São relatadas informações sobre a identidade, origem e composição química, tendo sido anexada ao processo cópia de publicação que fornece abundância de dados relativos à sua composição, com destaque para as variações naturalmente observadas na presença de nutrientes ⁽²¹⁾.

A análise da composição química da variedade obtida por manipulação gênica, principalmente dos níveis de seus nutrientes e de eventuais compostos tóxicos naturalmente presentes, visa garantir que essa nova variedade seja tão nutritiva e segura quanto seu equivalente convencional. Desse modo, serve para confirmar que os efeitos intencionais da modificação não comprometeram sua segurança nem resultaram em efeitos não pretendidos. A introdução do *cassete* de expressão contendo o gene *pat*, assim como os outros elementos gênicos descritos anteriormente não alteraram a equivalência substancial do milho Liberty Link em relação aos padrões de qualidade e quantidade de metabólitos normalmente encontrados no milho. Os dados apresentados pela requerente são relativos à composição centesimal, aos perfis de aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas, além do teor de fitato, tanto para a variedade geneticamente modificada, com e sem o uso do glufosinato quanto para a variedade convencional, cultivada sob as mesmas condições e na mesma região durante um mesmo período. Inicialmente, foram apresentados resultados de análises conduzidas com plantas cultivadas no exterior em duas regiões. Posteriormente, em razão de questionamentos feitos por membros da CTNBio, foram apresentados dados relativos a plantas cultivadas no país em ambientes distintos, nos estados de Goiás e do Paraná. Essas análises de composição foram realizadas no país pelo Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo.

Em linhas gerais, para todos os parâmetros analisados, não houve diferença significativa entre a variedade geneticamente modificada e a convencional, ou as diferenças notadas estiveram dentro da variabilidade normalmente observada entre as variedades de milho convencional. De qualquer modo, as pequenas diferenças encontradas em relação ao evento T25 não afetam o valor nutricional

ou a segurança, pois foram similares àquelas normalmente observadas em outras variedades, ou sob distintas condições de cultivo. A esse respeito, cabe destacar que houve diferenças entre os resultados obtidos para os cultivos realizados em Goiás e no Paraná, mesmo para a variedade convencional sem, no entanto, resultar em diferença significativa desta para a variedade geneticamente modificada. Deste modo, fica claro que as condições ambientais foram mais determinantes para as diferenças na composição química do que a presença do gene *pat* no genoma do evento de transformação T25.

Quanto aos níveis de resíduos do glufosinato de amônio deixados na planta, tendo em vista seu uso durante o cultivo da variedade transgênica, estudos realizados no Brasil demonstraram não haver diferenças entre aqueles níveis encontrados na variedade parental quando comparados com a variedade transgênica (evento T25), quando o herbicida é aplicado conforme os padrões da legislação brasileira para a avaliação dos limites máximos de resíduos.

A proteína PAT é degradada pelo suco gástrico de animais e por suco gástrico artificial semelhante ao de seres humanos, perdendo suas características físico-químicas após exposição oral. Deste modo, não se espera que a proteína possa ser absorvida na íntegra e, portanto, é altamente improvável que a proteína possa produzir efeitos adversos ou tóxicos. Além disso, a atividade da proteína PAT nas diferentes partes do milho é baixa (da ordem de mU/mg de proteína).

Referências sobre toxicidade aguda foram descritas em documentos da *Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos e da *DG Health and Consumer Protection* da Comissão Européia indicando ausência de toxicidade. "O teste de toxicidade aguda oral da proteína PAT produzida em bactéria mostrou ausência de efeitos em uma dose de 2.500 mg/kg" ⁽¹⁹⁾. "A enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) não deve apresentar problemas de biossegurança. O nível quantitativo de PAT em grãos é muito baixo. Sua função enzimática é específica para um substrato que naturalmente não está presente em seres humanos, chamado fosfinotricina. Além disso, ela é degradada e inativada em fluido gástrico artificial humano contendo pepsina em pH 1,0-1,2. Portanto, é improvável que ela mantenha qualquer atividade enzimática *in vivo*. Além disso, nenhuma homologia entre a proteína PAT e toxinas conhecidas foi encontrada. A proteína PAT nativa (51% de pureza) foi avaliada para toxicidade aguda em camundongos, não sendo relatado nenhum efeito em doses de 5,0 g por kg de peso corporal" ⁽⁴⁾.

Não há relatos de que a proteína PAT tenha atividade alergênica. Análises de seqüência da proteína PAT demonstram que ela não apresenta sítios passíveis de glicosilação o que poderia, em tese, conferir alergenicidade à proteína. Entretanto, uma possível fonte de alergenicidade da proteína PAT seria a expressão da proteína em pólen, o que está demonstrado não ocorrer. A seqüência do gene *pat* e da proteína PAT foram comparadas com bancos de dados e verificou-se que não apresentam homologia significativa com outras seqüências de nucleotídeos e proteínas, com exceção de outros

genes de resistência a fosfotricina incluindo o gene *pat* de *S. viridochromogenes* e o gene *bar* de *S. hygrosopicus*.

V. Aspectos Ambientais

O milho é uma planta monóica: um único indivíduo contém flores masculinas e femininas localizadas separadamente. As plantas de milho são plantas de fecundação cruzada e largamente polinizadas com ajuda do vento, insetos, gravidade e outros. A introdução dos elementos gênicos anteriormente descritos não alterou as características reprodutivas da planta. Portanto, a probabilidade de fecundação cruzada entre plantas do evento T25 e outras plantas de milho é a mesma que ocorre entre híbridos e linhagens de milho não geneticamente modificadas.

O milho é a espécie que atingiu o mais elevado grau de domesticação entre as plantas cultivadas, tendo perdido suas características de sobrevivência na natureza como, por exemplo, a eliminação da degrana. Assim, o milho é uma planta incapaz de sobreviver em condições naturais, quando não assistida tecnicamente. Não há, portanto, qualquer possibilidade de que o milho se transforme numa planta invasora ou daninha.

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

Estudos sobre dispersão de pólen de milho têm sido conduzidos, sendo que alguns deles mostram que o pólen de milho pode deslocar-se a longas distâncias. Porém, a maioria do pólen liberado é depositada próximo à cultura, com taxa de translocação muito baixa fora da cultura fonte. O agente de polinização predominante no milho é o vento e a distância que o pólen viável pode percorrer depende dos padrões de vento, umidade e temperatura. Luna *et al.* ⁽¹¹⁾ avaliaram a distância de isolamento e o controle de pólen e demonstraram que a polinização cruzada ocorre em uma distância máxima de 200 m e nenhuma polinização cruzada aconteceu em distâncias iguais ou superiores a 300 metros em relação às fontes de pólen, em condição de não despendoamento. Os resultados indicam que a viabilidade do pólen é mantida por 2 h e que a polinização cruzada não foi observada em distâncias de 300 metros da fonte de pólen.

Sob ventos baixos a moderados, estimou-se que, comparando-se as concentrações a 1 m da cultura fonte, aproximadamente 2% de pólen são anotados a 60 m, 1,1% a 200 m e e 0,75-0,5% a 500 m de distância. A 10 m de um campo, em média o número de grãos de pólen por unidade de área é dez vezes menor que o observado a 1 m da borda. Portanto, se as distâncias estabelecidas de separação desenvolvidas para produção de semente de milho são observadas, espera-se que a transferência de pólen às variedades adjacentes seja minimizada, não devendo conter quaisquer materiais genéticos com tolerância ao herbicida. Mesmo na eventualidade de haver um escape

Secretaria Executiva da CTNBio

SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10

Brasília, DF – CEP: 70610-200

Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317-7475

gênico, a probabilidade de fixação do alelo contendo a seqüência gênica que confere tolerância ao glufosinato de amônio na população é muito reduzida na ausência de pressão de seleção.

Os impactos ecológicos secundários, que se referem aos efeitos no ambiente, especialmente nos ecossistemas do solo, são muito discutidos atualmente em virtude da complexidade do solo. Os organismos do solo são geralmente muito expostos ao contato com plantas geneticamente modificadas, tanto em contato direto como através da queda de folhas, exudatos radiculares ou mesmo decomposição das raízes. Pelos relatos na literatura, culturas geneticamente modificadas se comportam de modo semelhante às culturas convencionais correspondentes, não tendo sido detectadas, até o momento, alterações significativas nas estruturas das comunidades microbianas dos solos. Estudos de transferência de genes intactos de plantas para microrganismos demonstraram baixíssimas possibilidades de transferência, sugerindo que a probabilidade de ocorrência desse evento é, na prática, extremamente baixo. Não há evidências de que genes de plantas tenham sido alguma vez transferidos a bactérias nas condições naturais.⁴ Acresce que o gene *pat* já existe no solo, uma vez que é oriundo de uma bactéria natural de solo, *S. viridochromogenes*.

O glufosinato de amônio é um herbicida não sistêmico e não seletivo, utilizado, principalmente, no controle de plantas invasoras em pós-emergência, tanto de folhas largas como de folhas estreitas. Este herbicida está registrado no Brasil, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), e com monografia aprovada pelo Ministério da Saúde, sendo comercializado no Brasil e em vários outros países. Sua ampla utilização no mundo se deve ao fato de ser biodegradável, apresentar baixa atividade residual, com baixa toxicidade ao homem, aos animais e outros organismos da cadeia alimentar. É considerado persistente e móvel no solo, sendo que em solos arenosos até 80% pode ser lixiviado. Dependendo das condições de manejo, condições edafoclimáticas, atividade microbiana e outros fatores, o glufosinato de amônio possui meia-vida no solo que varia de 12 a 70 dias. Entretanto, já foram encontrados resíduos persistindo no solo em até 100 dias (16). Portanto, se utilizado fora das recomendações, o herbicida glufosinato de amônio tem potencial para contaminação de cursos d'água e lençóis freáticos ⁽¹⁸⁾ como qualquer outro herbicida utilizado em culturas geneticamente modificadas ou não. Ressalta-se, contudo, que outras normas deverão ser observadas quando do registro do milho T25, como a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989 (Lei de Agrotóxicos), especialmente no que diz respeito aos limites aceitáveis para resíduos de herbicidas a serem estabelecidos pelos órgãos e entidades de registro e fiscalização acima citados.

VI. Restrições ao uso de OGM e seus derivados:

Pareceres técnicos referentes ao desempenho agrônômico concluíram que há equivalência entre plantas transgênicas e convencionais. Assim, as informações indicam que as plantas transgênicas

não diferem fundamentalmente dos genótipos de milho não transformado, à exceção da tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Adicionalmente, não há evidência de reações adversas ao uso do milho Liberty Link. Por essa razão, não existem restrições ao uso deste milho ou de seus derivados seja para alimentação humana ou de animais.

O fluxo gênico vertical para variedades locais (chamados milhos crioulos) de polinização aberta é possível e apresenta o mesmo risco causado pelos genótipos comerciais disponíveis no mercado (80% do milho convencional plantado no Brasil provêm de sementes comerciais que passaram por um processo de melhoramento genético). A coexistência entre cultivares de milhos convencionais (melhorados ou crioulos) e cultivares transgênicos de milhos é possível do ponto de vista agrônômico (3, 13). Por essa razão, a CTNBio publicará oportunamente normas sobre coexistência do milho geneticamente modificado com variedades não modificadas.VII. Considerações sobre as particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização):

Pequenas variações de composição centesimal, não significativas, foram encontradas entre o milho plantado na região Sul (Paraná) e o plantado na região Centro Oeste (Goiás) que foram imputadas, não à presença do evento de transformação, mas às condições do ambiente. Portanto, não existem restrições para o uso deste milho pelo menos no que diz respeito ao Sul, Sudeste e Centro Oeste do país.

Os órgãos e entidades de registro e fiscalização, no âmbito de suas competências, estabelecerão limites aceitáveis de resíduos do herbicida glufosinato de amônio utilizado nas lavouras cultivadas com o milho T25.

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*". A CTNBio publicará oportunamente normas sobre coexistência do milho geneticamente modificado com variedades não modificadas.

VII. Conclusão

Considerando que o evento T25 deriva de linhagem He/89 de milho comum (*Zea mays*), espécie com sólido histórico de segurança para consumo humano e animal e que o gene introduzido, *pat*, não codifica proteína sabidamente tóxica ou alergênica, e resulta na enzima L-fosfinotricina-N-acetil transferase, com alta especificidade para o herbicida glufosinato de amônio.

Considerando que a construção gênica empregada na transformação resultou na inserção estável de uma cópia do gene *pat* e regiões regulatórias do vírus do mosaico da couve-flor no genoma do milho, além de uma seqüência truncada não-funcional do gene de resistência à ampicilina, resultando na expressão de PAT apenas, sem aparente prejuízo para a planta ou para o meio ambiente.

Considerando ainda que:

1. O milho é a espécie que atingiu o mais elevado grau de domesticação entre as plantas cultivadas, sendo incapaz de sobreviver na natureza sem intervenção humana.
2. A espécie silvestre mais próxima ao milho é o teosinte, encontrado no México e em alguns locais da América Central, onde pode cruzar com o milho cultivado em campos de produção. Portanto, não há no Brasil espécies silvestres com que o milho possa se intercruzar.
3. A proteína PAT possui rápida degradação nos fluidos gástricos e intestinais (7, 20).
4. A enzima PAT recombinante foi detectada em baixos níveis nos tecidos vegetais analisados e apresentou grande suscetibilidade à digestão e desnaturação térmica pelo processamento, sendo altamente improvável que ela possa ter algum efeito tóxico ou alergênico (7, 20).
5. Na natureza existem muitas proteínas similares a PAT sem que evidência alguma de efeito adverso ao homem, animais ou plantas tenha sido descrita e que o seu substrato é altamente específico não possuindo nenhuma seqüência de aminoácidos com homologia a toxinas ou alérgenos.
6. A modificação genética introduzida no evento T25 não resultou em diferenças importantes de composição química relativa a nutrientes, estando dentro da faixa de variação normal entre as variedades convencionais.
7. Os microorganismos *S. hygroscopicus* e *S. viridochromogenes* são bactérias saprófitas do solo, existindo muitas espécies do gênero *Streptomyces* similares a *S. hygroscopicus* e *S. viridochromogenes* e, entres estes, vários contendo os genes *pat* e *bar* ⁽²⁾.
8. A molécula de ADN é um componente natural dos alimentos, não apresentando nenhuma evidência que esta molécula possa ter efeito molecular adverso ao homem quando ingerido em alimentos em quantidades aceitáveis (nenhum efeito tóxico direto).
9. Não existe nenhuma evidência que genes intactos de plantas possam ser transferidos e funcionalmente integrados no genoma humano ou de outros mamíferos expostos a este ADN ou alimentos fabricados com estes elementos (6).
10. Plantas tolerantes ao glufosinato de amônio contendo a proteína PAT têm sido cultivadas largamente nos Estados Unidos e no Canadá há aproximadamente uma década sem nenhum registro de efeito adverso a alimentos do homem e de animais. Além disso, várias agências reguladoras de vários países já aprovaram estas plantas para uso humano e animal incluindo Austrália, Japão e União Européia.
11. A requerente respondeu a todos os questionamentos postulados na Instrução Normativa nº 20 da CTNBio.

12. Nenhum dos quesitos indica que este milho possa apresentar efeitos adversos na alimentação humana ou animal.
13. Após dez anos de uso em diversos países, não foi detectado nenhum problema para a saúde humana, animal ou ao meio ambiente que possa ser atribuído a milhos transgênicos. É necessário enfatizar que a falta de efeitos negativos resultantes do cultivo de plantas transgênicas de milho não quer dizer que eles não possam vir a acontecer. Risco zero e segurança absoluta não existem no mundo biológico, muito embora já exista um acúmulo de informações científicas confiáveis e um histórico seguro de uso de dez anos que nos permite afirmar que o milho T25 é tão seguro quanto as versões convencionais. Assim, a requerente fica condicionada a conduzir monitoramento de liberação pós-comercial nos termos a serem oportunamente estabelecidos pela CTNBio.
14. A coexistência entre cultivares de milhos convencionais (melhorados ou crioulos) e cultivares transgênicos de milhos é possível do ponto de vista agrônômico.
15. A probabilidade de fixação do alelo, contendo a seqüência gênica que confere tolerância ao glufosinato de amônio, na população é muito reduzida na ausência de pressão de seleção.
16. Não há necessidade da manutenção da confidencialidade em função da liberação comercial.

A CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas às normas para coexistência e ao plano de monitoramento pós-comercialização, a serem publicados pela CTNBio oportunamente.

VIII - Bibliografia

1. BAHIA FILHO, A.F.C.; GARCIA, J.C. 2000. Análise e avaliação do mercado brasileiro de sementes de milho. In: UDRY, C.V.; DUARTE, W.F. (Org.) Uma história brasileira do milho: o valor de recursos genéticos. Brasília: Paralelo 15, 167-172.
2. BARTSCH K.; TEBBE C.C. 1989. Initial steps in the degradation of phosphinothricin (glufosinate) by soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology 55: 711-716.
3. BROOKES, G.; BARFOOT, P.; MELÉ, E.; MESSEGUER, J.; BÉNÉTRIX, F. BLOC, D.; FOUPELLASSAR, X; FABIÉ, A.; POEYDOMENGE, C. 2004. Genetically modified maize: pollen movement and crop co-existence. Dorchester, UK: PG Economics, 20pp. (www.pgeconomics.co.uk/pdf/Maizepollen2004final.pdf)
4. EUROPEAN COMMISSION - Food Safety the Farm to the Fork. 1996. Opinion On The Potential For Adverse Health Effects From The Consumption Of Genetically Modified Maize (*Zea mays* L). (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm7/out02_en.html).
5. FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organisation. 2000. Grassland Index. *Zea mays* L. (<http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/agricult/aqp/agpc/doc/qbase/data/pf000342.htm>)
6. FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2000. Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plant Origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on

Foods Derived from Biotechnology, 29 May – 2 June 2000. World Health Organisation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland. 35pp.

(http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_june2000_en.pdf)

7. HEALTH CANADA. 1997. Glufosinate Ammonium Tolerant Corn (T14 and T25). Novel Food Information - Food Biotechnology. 4 pp. (http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/gmf-agm/32bg_agrevo-ct_agrevo_e.pdf).
8. HULL, R.; COVEY, S.N.; DALE, P. 2000. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. Microb. Ecol. In Health and Dis. 12:1-5.
9. KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. 1999. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. Trends in Plant Sci. 4: 340-347.
10. LEWIN, B. 2004. Genes VIII. New York: Oxford University Press, 1.ed. 1056pp.
11. LUNA, S.V.; FIGUEROA, J.M.; BALTAZAR, M.B.; GOMEZ, L.R.; TOWNSEND, R. E SCHOPER, J.B. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. Crop Sci. 41:1551-1557.
12. MANGELSDORF, P.C.; REEVES, R.G. 1938. The origin of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 24: 303-312.
13. MESSEGUER, J.; PEÑAS, G.; BALLESTER, J.; BAS, M.; SERRA, J.; SALVIA, J.; PALAUDELMÀS, M.; MELÉ, E. 2006. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. Plant Biotechnology Journal. 4:633-645.
14. MÓROCZ, S.; DONN, G.; NÉMETH, J.; DUDITS, D. 1990. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from highly embryogenic suspension culture. Theor. Appl. Genet. 80: 721-726.
15. PAULI, S.; ROTHNIE, H.M.; CHEN, G.; HE, X.; HOHN, T. 2004. The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. Journal of Virology 78: 12120-12128.
16. SMITH, A.E.; BELIK, M.B. 1989. Field persistence studies with the herbicide glufosinate-ammonium in Saskatchewan soils. J. Environ. Qual. 18: 475-479.
17. TIKHONOV, A.; SANMIGUEL, P.; NAKAJIMA, Y.; GORESTEIN, N.; BENNETZENAND, J.; AVRAMOVA, Z. 1999. Colinearity and its exceptions in orthologous adh regions of maize and sorghum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7409-7414.
18. US ENVIRONMENTAL PROTECT AGENCY – EPA. 1993. Office of pesticides and toxicity substances. Pesticide fact sheet. (<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1997/September/Day-10/bac.pdf>)
19. US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – 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. (www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1997/April/Day-11/p9373.htm)
20. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. 1995. Biotechnology Consultation - Note to file BNF Nº 000029. (<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/bnfm029.html>)
21. WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. 1987. Corn: chemistry and technology. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1.ed. 604pp.

Walter Colli
Presidente da CTNBio

Voto divergente

A relatora Dra. Lia Giraldo da Silva Augusto (Subcomissão Setorial Permanente Ambiental) emitiu parecer contrário a aprovação deste produto baseado em:

1. Inexistência de instrução normativa para liberação comercial;
2. Não cumprimento do princípio da precaução;
3. Faltam critérios de monitoramento de impacto ambiental de curto, médio e longo prazo para cultivares transgênicos.