

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

Parecer Técnico: 6658/2019

Processo: 01250.014497/2019-82

Assunto: Liberação comercial de Cana-de-açúcar geneticamente modificada.

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

Data de Protocolo: 28/03/2019

CQB: 006/96

CNPJ: 06.981.381/0002-02

Classificação: Classe de Risco I

Extrato Prévio: 6443/2019 de 03/04/2019.

Reunião: 226ª Reunião Ordinária ocorrida em 03/10/2019

Decisão: Deferido

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de cana-de-açúcar geneticamente modificada, evento CTC93209-4, concluiu pelo seu DEFERIMENTO.

O evento CTC93209-4 é um evento adicional de cana-de-açúcar geneticamente modificada desenvolvido pelo CTC para expressar uma proteína da classe Cry1A com o objetivo de controlar a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). O CTC desenvolveu o evento CTB141175/01-A (background genético da cultivar CTC20) e o evento CTC91087-6 (background genético da cultivar CTC9001) com essa mesma finalidade. O evento CTC93209-4 foi modificado geneticamente para expressar a proteína Cry1Ac, que confere resistência a *Diatraea saccharalis*, e a proteína NptII, empregada como marcador de seleção. A variedade comercial CTC20BT (evento CTB141175/01-A) expressa as proteínas Cry1Ab e NptII e foi liberada comercialmente pela CTNBio em 08 de junho de 2017 (Extrato de Parecer Técnico N° 5.483/2017). A variedade comercial CTC9001BT (evento CTC91087-6) expressa as proteínas Cry1Ac e PAT (bar) e foi liberada comercialmente pela CTNBio em 17 de dezembro de 2018 (Extrato de Parecer Técnico N° 6.235/2018).

Atualmente o Brasil é o líder mundial na produção da cana-de-açúcar (*Saccharum × officinarum*), sendo responsável pela produção de 615,8

milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2018/19 (CONAB, 2018), destinados principalmente à produção de açúcar e etanol que, somados à produção de bioeletricidade, representam cerca de 2% de todo PIB nacional e mais de 30% do PIB agrícola. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae), é a principal praga da cultura e responsável por perdas da ordem de mais de R\$ 5 bilhões por ano.

O CTC desenvolveu o evento de cana-de-açúcar geneticamente modificado CTC93209-4 com o objetivo de fornecer aos produtores de cana-de-açúcar brasileiros uma cultivar que possui o background genético da cultivar CTC9003 e que expresse a proteína Cry1Ac de forma a ser resistente à *Diatraea saccharalis*. Adicionalmente, o evento CTC93209-4 expressa ainda a proteína NptII, utilizada nos passos iniciais de transformação genética como marcador de seleção. A proteína Cry1Ac (68,7kDa) possui sequência de aminoácidos 100% idêntica a sequências encontradas em outros eventos geneticamente modificados de milho e soja já aprovados globalmente e com amplo histórico de uso seguro. Similarmente, a proteína NptII (29,2 kDa) apresenta 99,7% de identidade de aminoácidos com proteínas NptII expressa por eventos comerciais de algodão e milho e 100% idêntica ao evento CTB141175/01-A de cana-de-açúcar.

O CTC comprovou a resistência a insetos presentes no evento CTC93209-4 por meio da condução ensaios de eficácia com inoculação massiva de larvas de *Diatraea saccharalis*. O evento demonstrou resistência à *D. saccharalis* quando comparado à variedade parental CTC9003 em quatro localidades representativas da área de cultivo da CTC9003, a saber, Piracicaba, Barrinha e Valparaíso (SP) e Quirinópolis (GO). Esta resistência ao ataque da broca-da-cana foi verificada tanto pela menor intensidade de infestação (I.I.%), medida pelo número de colmos que apresentaram danos pelo inseto, quanto pela diminuição do tamanho das áreas brocadas (%Dano). Tanto a razão entre I.I.% quanto a razão de %Dano do evento CTC93209-4 em relação ao controle convencional CTC9003 foi superior a 98% em todas as localidades testadas.

O DNA integrado no genoma do evento CTC93209-4 foi extensivamente caracterizado utilizando várias metodologias. O número de cópias dos genes heterólogos foi previamente estimado por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os resultados indicaram que dois insertos íntegros de T-DNA foram integrados no genoma do evento e que não houve integração de sequências referentes ao esqueleto (backbone) do plasmídeo utilizado na transformação. Análises de Southern blot utilizando sondas homólogas às sequências do gene cry1Ac e do gene nptII corroboraram as evidências de integração de duas cópias dos genes cry1Ac e nptII e ausência de integração parcial de elementos do T-DNA em outros sítios do genoma do evento CTC93209-4. Adicionalmente, foram realizados ensaios de Southern blot com

quatro sondas sobrepostas desenhadas para cobrir toda a extensão do backbone do plasmídeo utilizado na transformação. Esses ensaios também não detectaram qualquer integração de backbone no genoma do evento CTC93209-4.

O grau de estabilidade genotípica do evento CTC93209-4 também foi verificado via metodologia de Southern blot comprovando que os dois insertos de T-DNA se mantiveram estáveis ao longo de quatro gerações de propagação vegetativa representando os diferentes ciclos da cultura (cana-planta e cana-socas). Esse resultado confirma que o T-DNA se fixou no genoma do evento CTC93209-4 uma vez que o sistema de propagação vegetativo da cana-de-açúcar utilizado nos plantios comerciais não permite a segregação genética.

Finalmente, o sequenciamento completo do T-DNA e das regiões flanqueadoras foi realizado utilizando metodologia de sequenciamento por captura (Illumina MiSeq®). Os resultados desse ensaio foram posteriormente confirmados utilizando primers de PCR complementares às regiões flanqueadoras e sequências internas dos insertos. Esses primers permitiram amplificar completamente as duas inserções de T-DNA e suas regiões flanqueadoras em fragmentos de DNA que foram posteriormente sequenciados via metodologia Sanger e alinhados para criar a sequência final consenso e o mapa de ambas integrações. Uma análise de bioinformática abrangente foi realizada com os dados de sequenciamento das inserções presentes no evento CTC93209-4 (T-DNAs e regiões flanqueadoras) descartando a possibilidade de ocorrência de efeitos não desejados tais como a expressão de proteínas com homologia a alérgenos ou toxinas.

Não existem relatos de interação entre as proteínas Cry1Ac e NptII a despeito dos vários eventos já aprovados que expressam essas proteínas isoladas ou conjuntamente. Tampouco existem relatos de que essas proteínas apresentem efeitos pleiotrópicos ou epistáticos. Uma caracterização fenotípica detalhada do evento CTC93209-4 foi realizada com o objetivo de verificar sua equivalência com variedades comerciais de cana-de-açúcar e com a cultivar parental CTC9003. A caracterização fenotípica foi realizada em áreas representativas da área de cultivo da cultivar parental, no estado de São Paulo (Barrinha, Piracicaba e Valparaíso), Goiás (Quirinópolis) e Bahia (Juazeiro). Foram avaliados o estágio vegetativo, resistência a estresses bióticos/abióticos, número de perfilhos, altura da planta, peso da parcela, diâmetro do colmo, brix%, florescimento. Não foi observada nenhuma diferença entre o evento CTC93209-4 e os controles convencionais que pudesse ser atribuída a um hipotético efeito de epistasia entre os genes ou de pleiotropia dos genes em outras características que não às de “resistência a insetos da ordem Lepidoptera” e à de “resistência a antibióticos do tipo aminoglicosídeos”. Dessa forma, não foram encontradas evidências de que o

evento CTC93209-4 apresente efeitos pleiotrópicos ou epistáticos. Baseando-se nas características fenotípicas avaliadas foi também possível concluir que existe equivalência substancial entre o evento CTC93209-4 e a variedade parental .

Identificação do OGM

Designação do OGM: Cana-de-açúcar geneticamente modificada para resistência a insetos, evento CTC93209-4

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

Característica Inserida: Resistência a insetos da ordem Lepidoptera.

Classificação de risco do OGM: Classe de risco 1

Método de introdução da característica: O evento CTC93209-4 foi obtido por meio de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com um fragmento de DNA (T-DNA) contendo os cassetes de expressão dos genes *cryIAc* e *nptII*.

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

Fundamentação Técnica:

Trata-se da solicitação do Centro de Tecnologia Canavieira sobre a Proposta de Liberação Comercial de Cana-de-Açúcar Geneticamente Modificada, Evento CTC93209-4, aprovado pela CIBio da empresa e, elaborado de acordo com a Resolução Normativa nº 05 da CTNBio, de 13 de março de 2008. A solicitação é para a liberação comercial da cana-de-açúcar evento CTC93209-4, seus derivados e progênies.

A cana-de-açúcar geneticamente modificado CTC93209-4 possui o background genético da cultivar CTC9003 e expressa a proteína *CryIAc* constitutivamente de forma a ser resistente à *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Crambidae). Esta espécie é popularmente conhecida como broca comum, broca-da-cana ou apenas broca.

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

moniliforme e *Colletotrichum falcatum*, resultando em deterioração fisiológica, microbiológica e tecnológica da cana.

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

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

A proteína Cry1Ac foi isolada de *Bacillus thuringiensis*. O evento CTC93209-4 expressa ainda a proteína *NptII* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase tipo II (*NptII*), originária do transposon Tn5 de *Escherichia coli*. A enzima *NptII* confere resistência a antibióticos do tipo aminoglicosídeos como a canamicina e a geneticina, utilizado como marcador de seleção no processo de transformação.

Descrição do OGM e Proteínas Expressas:

O evento CTC93209-4 foi obtido por meio de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com um fragmento de DNA (T-DNA) contendo os cassetes de expressão dos genes *cry1Ac* e *nptII*. O vetor pCTC523 foi utilizado como base para clonagem e multiplicação do T-DNA contendo os cassetes alvo e de seleção que foram inseridos no evento CTC93209-4.

Este vetor foi sintetizado com a finalidade única de permitir a clonagem de regiões nucleotídicas de interesse e garantir a transferência do T-DNA para o genoma da cana-de-açúcar. O DNA integrado no genoma do evento CTC93209-4 foi caracterizado utilizando várias metodologias. O número de cópias dos genes heterólogos foi previamente estimado por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os resultados indicaram que um uma cópia do inserto contendo uma única cópia de ambos os genes *cry1Ac* e *nptII* foi integrados no genoma do evento e, que não houve integração de sequências referentes ao esqueleto (backbone) do plasmídeo utilizado na transformação. As análises de *Southern blot* utilizando sondas

homólogas às sequências do gene *cryIAc* e do gene *nptII* corroboraram as evidências de integração de duas cópias dos genes *cryIAc* e *nptII* e ausência de integração parcial de elementos do T-DNA em outros sítios do genoma do evento CTC93209-4. Adicionalmente, foram realizados ensaios de *Southern blot* com quatro sondas sobrepostas desenhadas para cobrir toda a extensão do *backbone* do plasmídeo utilizado na transformação. Esses ensaios também não detectaram qualquer integração de *backbone* no genoma do evento CTC93209-4.

O grau de estabilidade genotípica do evento CTC93209-4 também foi verificado via metodologia de *Southern blot* que comprovou que os dois insertos de T-DNA se mantiveram estáveis ao longo de quatro gerações de propagação vegetativa representando os diferentes ciclos da cultura (cana-planta e cana-socas). Esse resultado corrobora o fato de que o T-DNA se fixa no genoma da cana-de-açúcar uma vez que o sistema de propagação vegetativo da cultura utilizado nos plantios comerciais não permite a segregação genética.

Finalmente, o sequenciamento completo do T-DNA e das regiões flanqueadoras foi realizado utilizando metodologia de sequenciamento por captura. Os resultados desse ensaio foram posteriormente confirmados utilizando *primers* de PCR complementares às regiões flanqueadoras e sequências internas dos insertos. Esses *primers* permitiram amplificar completamente as duas inserções de T-DNA e suas regiões flanqueadoras em fragmentos de DNA que foram posteriormente sequenciados via metodologia *Sanger* e alinhados para criar a sequência final consenso e o mapa de ambas integrações. Uma análise de bioinformática abrangente foi realizada com os dados de sequenciamento das inserções presentes no evento CTC93209-4 (T-DNAs e regiões flanqueadoras) descartando a possibilidade de ocorrência de efeitos não desejados tais como a expressão de proteínas com homologia a alérgenos ou toxinas.

Resumidamente, os dados de *Southern blot*, qPCR e sequenciamento de DNA indicam que o evento CTC93209-4 contém dois insertos íntegros de T-DNA que codifica as proteínas *CryIAc* e *nptII* e não contém qualquer sequência referente ao *backbone* do vetor utilizado na transformação genética. Os dados também confirmam que essa inserção de T-DNA é estável ao longo de quatro gerações de propagação vegetativa.

Não existe relatos de interação entre as proteínas *CryIAc* e *nptII* a despeito dos vários eventos que expressam essas proteínas isoladas ou conjuntamente. Tampouco existem relatos de que essas proteínas apresentem efeitos pleiotrópicos ou epistáticos. Para avaliar a expressão dos genes *cryIAc* e *nptII* via ELISA foram estudados diferentes tecidos de cana-de-açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura, basicamente, os níveis de

expressão da proteína Cry1Ac nas folhas do evento CTC93209-4 permanecem altos ao longo de todo o ciclo de cultivo, garantindo resistência a *Diatraea saccharalis*. Os níveis de expressão das proteínas Cry1Ac e *nptII* em colmos do evento CTC93209-4 são muito baixos.

Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais:

Uma análise detalha da expressão das proteínas *Cry1Ac* e *nptII* em folhas, colmos e raízes do evento CTC93209-4 foi realizada. Foram colhidas amostras de folhas aos 100, 200 e 300 dias após o plantio (DAP) para monitorar a expressão das proteínas ao longo de um ciclo típico de cultivo de cana-planta. Além disso, foi monitorada a expressão das proteínas heterólogas em ciclo de cana-planta (60 e 120 Dias Após Plantio - DAP) e cana-soca (60 e 120 Dias Após Corte - DAC). Também foram coletadas amostras de colmos e raízes aos 330 DAP para medir a concentração dessas proteínas no momento usual de colheita da cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos para folha, colmo e raízes indicam que o evento CTC93209-4 apresenta níveis de expressão da proteína *Cry1Ac* muito maiores que a expressão de *nptII*. Por exemplo, em folhas, a expressão média de *Cry1Ac* ao longo de um ano de cultivo (100, 200 e 300 DAP) variou de 19,9 a 30,9 ug/g peso fresco enquanto que a expressão média de *nptII*, nas mesmas condições, variou de 0,15 a 0,20 ug/g peso fresco. O efeito do corte da cana-de-açúcar sobre os níveis de expressão das proteínas heterólogas em folhas do evento CTC93209-4 também foi avaliado. As concentrações médias de *Cry1Ac* foram 29,5 e 27,3 ug/g peso fresco (60 e 120 DAP) e 9,3 e 18,8 ug/g peso fresco (60 e 120 Dias Após o Corte - DAC). Os níveis de expressão de *NptII* foram 0,11 e 0,16 ug/g peso fresco (60 e 120 DAP) e 0,12 e 0,16 ug/g peso fresco (60 e 120 DAC).

Os resultados de expressão em diferentes tecidos indicam que o evento CTC93209-4 apresenta maior concentração de *Cry1Ac* em folhas que em colmos ou raízes ao final do ciclo de cultivo (330 DAP). A expressão da proteína *Cry1Ac* foi maior em folhas (33,4 ug/g peso fresco) e menor em colmo (5,3 ug/g peso fresco) e raízes (6,8 ug/g peso fresco). A média da expressão de *NptII* foi baixa em todos os tecidos: 0,14 ug/g peso fresco (folhas), 0,08 ug/g peso fresco (colmo) e 0,03 (raízes). Concluindo, os níveis de expressão das proteínas *Cry1Ac* e *NptII* no evento CTC93209-4 foi caracterizado em diferentes tempos, tecidos e locais de plantio representativos do cultivo da cultivar CTC9003 no Brasil. Os níveis de expressão da proteína *Cry1Ac* nas folhas do evento CTC93209-4 permanecem altos ao longo de todo o ciclo de cultivo, garantindo resistência a *Diatraea saccharalis*. Os níveis de expressão das proteínas *Cry1Ac* e *nptII* em colmos do evento CTC93209-4 são muito baixos e, portanto, a exposição alimentar via consumo do caldo, ou produtos derivados, às proteínas heterólogas será mínima.

A caracterização detalhada das proteínas heterólogas confirmou que o evento CTC93209-4 expressa as proteínas de tamanho esperado *CryIAc* (68.7 KDa) e *nptII* (29.2 KDa). Análises de sequenciamento e bioinformática da construção genética e das sequências inseridas no evento CTC93209-4, bem como *Western blot* e sequenciamento das proteínas expressas, demonstraram que as proteínas heterólogas expressas pelo evento CTC93209-4 apresentam alta homologia às sequências de aminoácidos de proteínas presentes em eventos comerciais. Os experimentos foram localizados em áreas representativas da área de cultivo da cultivar parental CTC9003, no estado de São Paulo (Barrinha, Piracicaba e Valparaíso), Goiás (Quirinópolis) e Bahia (Juazeiro).

A segurança alimentar humana e animal do evento CTC93209-4 foi realizada seguindo as recomendações da Resolução Normativa N° 05 da CTNBio e do WHO Codex Alimentarius Guidance (2003) e considerou a biologia da cana-de-açúcar, seus usos tradicionais, os usos pretendidos do evento CTC93209-4, a natureza dos genes inseridos, os organismos doadores e as proteínas heterólogas produzidas. Dessa forma, foram analisados os fenótipos e a composição nutricional do evento CTC93209-4, de acordo com as orientações da OECD (2011), incluindo as possíveis presenças de toxinas, alérgenos e substâncias antinutricionais, sobre a segurança alimentar humana e animal do evento CTC93209-4. Adicionalmente, as potenciais propriedades tóxicas ou alergênicas das proteínas *CryIAc* e *nptII* e do processamento da cana-de-açúcar na segurança alimentar humana e animal do evento CTC93209-4 também foram avaliadas.

Os estudos de composição nutricional, conduzidos de acordo com as recomendações da OECD (2011) demonstraram que o evento CTC93209-4 possui equivalência nutricional com a cultivar parental CTC9003 uma vez que não foram detectadas diferenças significativas de acordo com os parâmetros avaliados: sacarose, proteína, fibra (bruta, FDN e FDA), lipídeos, cinzas e umidade. Estudos demonstraram que o processamento e o refino da cana-de-açúcar resultam na perda completa do DNA e proteínas heterólogas para níveis não detectáveis pelas metodologias atualmente disponíveis. Estudos com o açúcar derivado do evento CTC91087-6 confirmaram a ausência de DNA específico do evento e a ausência das proteínas *CryIAc* e *nptII* no produto final.

O gene *cryIAc* produz uma δ -endotoxina que é naturalmente encontrada na bactéria não-patogênica *Bacillus thuringiensis* que vem sendo empregada em produtos bio-inseticidas empregados na agricultura orgânica. A proteína *CryIAc* é tóxica para insetos lepidópteros, incluindo a broca da cana-de-açúcar, devido a uma interação específica com receptores presentes no intestino do inseto. Quando esta interação específica proteína-receptor ocorre, há uma ruptura da função e integridade do intestino que leva à toxicidade e

consequente morte do inseto. Esses receptores da proteína *CryIAc* são encontrados apenas no intestino de insetos da ordem Lepidoptera, conferindo a especificidade deste efeito tóxico, confirmada por estudos extensivos sobre a inocuidade desta proteína em outros insetos e animais. A proteína *nptII* uma enzima que codifica para a neomicina fosfotransferase II de 265 aminoácidos (29,2 kDa) que foi utilizada como marcador seletivo. Culturas derivadas da biotecnologia, contendo as proteínas *CryIAc* e *NptII* apresentam atualmente um amplo histórico de uso seguro, em vários países, tendo obtido pelo menos 43 e 122 aprovações regulatórias, respectivamente.

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

A alergenicidade dessas proteínas também foi avaliada. A análise de bioinformática atualizada apresentada demonstrou que as proteínas *CryIAc* e *nptII* não têm homologia com alérgenos conhecidos. Além disso, estudos publicados com as proteínas purificadas demonstraram que ambas proteínas são rapidamente degradadas em Fluido Gástrico Simulado (SGF) e Fluido Intestinal Simulado (SIF) e, que as proteínas são desnaturadas por aquecimento. Baseados no longo histórico de uso seguro das proteínas *CryIAc* e *nptII* na agricultura e na alimentação, e na homologia direta das proteínas expressas no evento CTC93209-4 com as proteínas *CryIAc* e *nptII* estudadas e aprovadas em eventos comerciais, bem como, estudos prévios, as principais agências regulatórias do mundo concluíram que essas proteínas não são tóxicas, tampouco alergênicas.

O consumo das proteínas heterólogas devido à ingestão do evento CTC93209-4 e produtos derivados em qualquer situação será muito menor que os valores de NOAEL estimados para ambas as proteínas, levando a margens de segurança extremamente elevadas. A exposição alimentar humana pode se dar via consumo direto (colmos de cana-de-açúcar ou caldo de cana) ou via produtos alimentares processados tais como açúcar e melaço. Considerando que o evento CTC93209-4 expressa aproximadamente 5,3 ug de *CryIAc* e 0,08 ug de PAT *nptII* por grama de peso fresco de colmo, é possível calcular a quantidade de cana-de-açúcar necessária para atingir a NOAEL de cada proteína. Especificamente, um brasileiro com peso de 60 kg teria que consumir aproximadamente 56,6 e 3.750 toneladas de cana-de-açúcar para

atingir o NOAEL das proteínas *CryIAc* e *nptII*, respectivamente. Baseando-se nesta análise e no fato de que a cana-de-açúcar não produz toxinas ou composto anti-nutrientes (OECD, 2011) é possível concluir que o consumo alimentar humano de derivados não processados do evento CTC93209-4 (cana-de-açúcar in natura e caldo de cana) é seguro.

No Brasil, também há o uso de cana-de-açúcar para forragem de gado na época seca. A segurança das proteínas *CryIAc* e *nptII* presentes no evento CTC93209-4 foi avaliada para este uso. Assim como no cenário de exposição alimentar humana a derivados de cana in natura descrito acima, a quantidade de forragem necessária para exceder os valores estimados de NOAEL são extremamente altos. Por exemplo, uma vaca com peso corporal de 200 kg e os mesmos valores de NOAEL (5.000 mg / kg pc) e de níveis de expressão de *CryIAc* e *NptII* em colmo (5,3 ug de *CryIAc* e 0,08 ug *NptII* por grama de peso fresco de colmo), a quantidade de colmo consumida necessária para atingir o nível NOAEL para *CryIAc* em bovinos seria de 189 toneladas/dia. Da mesma forma, a quantidade de consumo de colmo necessária para alcançar o NOAEL de *NptII* seria de 12.500 toneladas/dia. Como resultado desta avaliação, concluímos que o consumo de forragem de cana-de-açúcar CTC93209-4 é seguro.

Aspectos Ambientais:

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

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

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

No Brasil, existem três espécies nativas que foram recentemente reclassificadas como pertencentes ao gênero *Saccharum* (anteriormente *Eryanthus*): *S. villosum*, *S. angustifolium* e *S. asperum*. Não é esperado que tais espécies tenham capacidade de hibridização com as cultivares modernas de cana-de-açúcar devido a não coincidência de centros de origem e, por consequência, devido às diferenças nas histórias evolutivas. A cana-de-açúcar é propagada comercialmente por meio de reprodução vegetativa através do plantio de colmos segmentados e, consequente, brotação de suas gemas laterais. O florescimento, apesar de ser essencial para programas de melhoramento genético, é prejudicial à produtividade da cultura, uma vez que a sacarose, ao invés de ser armazenada no colmo, é consumida durante a formação das panículas, resultando em um fenômeno conhecido como isoporização.

O evento CTC93209-4 não apresentou alteração da capacidade de reprodução assexuada em relação a cultivar parental CTC91003, avaliada por meio da germinação e vigor de Mudas Pré-Brotadas (MPB) em casa de vegetação. Não houve indução ambiental do florescimento do evento CTC93209-4, da cultivar CTC9003 e das referências comerciais nos experimentos conduzidos para realizar a caracterização fenotípica do evento CTC93209-4 no período avaliado. Esses resultados confirmam a recalcitrância ao florescimento da cultivar CTC9003 e do evento CTC93209-4 e que o florescimento da cana-de-

açúcar ocorre apenas esporadicamente em anos que apresentam condições ambientais favoráveis. O fato de a cana-de-açúcar apresentar restrições quanto a sua reprodução sexuada e só ser propagada comercialmente via propagação assexuada faz com que a cana-de-açúcar não apresente populações espontâneas no meio ambiente brasileiro, não sendo uma espécie invasiva. De fato, a cana-de-açúcar só é encontrada associada a atividades humanas. Os resultados apresentados demonstram que o evento CTC93209-4 não difere da cultivar CTC9003 em relação à sua taxa de biodegradabilidade de seus restos culturais, à capacidade de adicionar ou remover substâncias ao solo, tampouco com sua capacidade de influenciar a microbiota do solo.

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

Além da comprovação da eficácia do evento CTC93209-4 sobre o inseto alvo da tecnologia, *Diatraea saccharalis*, também foi avaliado o possível efeito do evento CTC93209-4 sobre outras pragas secundárias da cultura da cana-de-açúcar pertencentes a ordem Lepidoptera e que, portanto, poderiam ser potencialmente afetados pela expressão da proteína *CryIAc*. Foram avaliados as seguintes espécies: lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), *Helicoverpa armigera* e *Elasmopalpus lignosellus*. Os resultados indicam que o evento CTC93209-4 possui efeitos potenciais no controle de *Elasmopalpus lignosellus*. Por outro lado, mesmo em condições ótimas de inoculação artificial, o evento CTC93209-4 não apresentou efeitos sobre o desenvolvimento *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*, indicando que o evento CTC93209-4 não terá a capacidade de controlar tais insetos nas condições reais de cultivo da cana-de-açúcar. Conclui-se que nem todos lepidópteros possuem os mecanismos de suscetibilidade à proteína *CryIAc* e, por consequência, nem todas as pragas lepidópteras de cana-de-açúcar serão afetadas pelo cultivo do evento CTC93209-4.

A avaliação do impacto do cultivo do evento CTC93209-4 sobre a comunidade de artrópodes não-alvo visitantes nas áreas de cultivo da cana-de-açúcar foi realizada por meio da instalação de armadilhas de coletas instaladas em experimentos realizados em localidades representativas da área de plantio da cultivar CTC9003: Piracicaba-SP, Barrinha-SP, Valparaíso-SP, Quirinópolis-GO e Camamú-BA. Foram feitas coletas em armadilhas e análise da abundância geral dos organismos não-alvo coletados durante o desenvolvimento da cultura em quatro momentos distintos. Na análise de

organismos não-alvo foram realizadas 42, 234 e 241 comparações pelo Teste t ($p \leq 0,05$) entre o evento CTC93209-4 e a variedade parental CTC9003 para o número de organismos não-alvo coletados em Armadilhas de Formigas, Armadilha de Solo e Armadilha Adesiva, respectivamente. Os dados sugerem que a presença das proteínas *CryIAc* e/ou *NptII* em folhas, colmos ou raízes não interfere significativamente na abundância e visitação de organismos não-alvo do evento CTC93209-4 em comparação à variedade controle CTC9003.

Parecer Final:

Considerando que:

1. A cana-de-açúcar é classificada como uma cultura semi-perene de ciclos longos e, após a colheita do primeiro ano de cultivo (cana-planta), pode permanecer no campo por vários ciclos de cultivo anuais (cana-soca);
2. A cana-de-açúcar é propagada vegetativamente ou seja, que não apresenta sementes verdadeiras que possam ser estocadas em condições de contenção (ex. câmara-fria). Como consequência, o material propagativo precisa ser mantido vegetando no campo.
3. Considerando que a introdução dos genes heterólogos não sugere que o risco para o consumo humano e animal do produto tenha sido aumentado;
4. A CTNBio solicitou ao requerente relação de todos os pedidos de Liberação Planejada no Meio Ambiente já protocolados com o evento para o qual estão solicitando Liberação Comercial e que a solicitação foi atendida;
5. Todos os ensaios de biossegurança que subsidiaram o pedido de liberação comercial do evento CTC93209-4, submetido à CTNBio, foram encerrados e, na oportunidade, apresentaram todos os relatórios finais dos referidos ensaios.

Conclusão

Diante do exposto e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas é possível concluir que a cana-de-açúcar geneticamente modifica, evento CTC93209-4, é tão segura quanto seus equivalentes convencionais. No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que a cana-de-açúcar geneticamente modifica, evento CTC93209-4, é substancialmente equivalente à cana-de-açúcar convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, a CTNBio concluiu que a cana-de-açúcar

geneticamente modificada, evento CTC93209-4, não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à cana-de-açúcar convencional.

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 ao disposto na Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; resultados de liberações planejadas no meio ambiente e textos relacionados. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros, bem como as análises já realizadas em outros países pelos respectivos órgãos de regulamentação de organismos geneticamente modificados.

Restrições ao uso do OGM e seus derivados:

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”.

Monitoramento

Com relação ao plano de monitoramento pós-liberação comercial a CTNBio determina que sejam seguidas as instruções e executadas as ações técnicas de monitoramento constante na Resolução Normativa 09 da CTNBio de 02 de dezembro de 2011.

Data: 17/10/2019

Maria Sueli Soares Felipe

Presidente da CTNBio

Bibliografia

ALMEIDA, L.C. Broca da cana causa prejuízos milionários. 2016. Disponível em: <http://www.canalbioenergia.com.br/artigoprejuizos-bilionarios-causados-pela-broca-da-cana/>. Acessado em 25/06/2019.

AUSTRALIAN GOVERNMENT (2011). The Biology of the *Saccharum* spp. (Sugarcane). Disponível em [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/biologysugarcane-toc/\\$FILE/biologysugarcane11.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/biologysugarcane-toc/$FILE/biologysugarcane11.pdf). Acessado em 25/06/2019.

CERA - CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT, ILSI RESEARCH FOUNDATION (2011). A review of the environmental safety of the Cry1Ac protein. Environmental biosafety research, v. 10, n. 2, p. 27-49. Disponível em: <https://www.ebr-journal.org/articles/ebr/pdf/2011/02/ebr120002-s.pdf>

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

CONAB (2018) Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. Safra 2018/19, N. 3 - Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-71 dezembro 2018. ISSN 2318-7921. Disponível em: https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/23678_459b56cfa84b956c7de6561d4fedc5eb

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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