



**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA  
PARECER TÉCNICO Nº 896/2021/SEI-CTNBio - Membros**

**PARECER TÉCNICO: 7501/2021**

**Processo:** 01245.006846/2021-86

**Data de Protocolo:** 19/04/2021

**Assunto:** Liberação Comercial de milho geneticamente modificado.

**Requerente:** Corteva Agriscience do Brasil Ltda.

**CQB:** 013/97

**CNPJ:** 01245.006846/2021-86

**Endereço:** SCN, Q. 4, Bl. B, Ed. Varig, sala 1230, Brasília/DF

**Título:** Liberação comercial do evento de milho DP-ØØ4114-3 e seus derivados para uso na alimentação humana e animal.

**Extrato Prévio:** 7656/2021

**Decisão:** Deferido

**Reunião:** 242ª Reunião ordinária ocorrida em 10/06/2021

**Identificação do OGM**

**Designação do OGM:** milho DP-ØØ4114-3 (doravante chamado de DP4114)

**Espécie:** *Zea mays*

**Características Inseridas:** resistência a determinados lepidópteros e coleópteros praga e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

**Método de introdução da característica:** transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando uma única construção genética para a introdução dos genes *cry1F*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e *pat*.

**Uso proposto:** alimentação humana e animal, incluindo as finalidades de manipulação, processamento, comercialização, transporte, importação, exportação, armazenamento, consumo e descarte.

**A identificação do evento:**

O milho DP4114 (Identificador Único OECD DP-ØØ4114-3) confere resistência a insetos praga e tolerância a herbicidas contendo o ingrediente ativo glufosinato de amônio e foi obtido por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando uma única construção genética para a introdução dos genes *cry1F* (versão truncada), *cry34Ab1*, *cry35Ab1* e o gene da fosfinotricina acetiltransferase – *pat* (otimizado para expressão em plantas).

**Genes introduzidos:**

- gene *cry1F*, isolado de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, expressa a proteína Cry1F que confere resistência a determinados lepidópteros praga; - presente e já aprovada no milho DAS-01507;

- os genes *cry34Ab1* e *cry35Ab1*, ambos isolados de *Bacillus thuringiensis*, expressam as proteínas Cry34Ab1 e Cry35Ab1 que juntas constituem uma proteína cristal com atividade inseticida que confere resistência a determinados insetos praga da ordem Coleoptera - presente e já aprovada no milho DAS-59122-7;

- o gene *pat*, isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, expressa a proteína PAT, a qual confere tolerância a herbicidas contendo o ingrediente ativo glufosinato de amônio - presente e já aprovada no milho DAS-01507 (milho 1507) e DAS-59122-7 (milho 59122).

Os genes são aqueles presentes no milho TC1507 x DAS-59122-7, obtido por cruzamento dos milhos TC1507 com DAS-59122-7 por melhoramento genético clássico e com solicitação de parecer para liberação comercial deferido pela CTNBio no Parecer Técnico 3674/2013. O milho DP4114 já foi aprovado para alimentação humano e animal em diversos países como Estados unidos (2013), Canadá (2013), China (2018), União Européia (2019), Japão (2015), onde foi submetido a avaliações de riscos pelas respectivas agências regulatórias. .

### **Vetor utilizado:**

Os genes foram introduzidos usando como vetor o plasmídeo PHP27118, contendo quatro cassetes representando (i) a versão truncada do gene *cry1F* sob controle do promotor do gene da ubiquitina 1 de milho (*ubiZM1*), resultando na expressão constitutiva da proteína Cry1F no milho. O terminador para o gene *cry1F* é a região terminadora da fase de leitura aberta 25 (ORF25) de *A. tumefaciens* pTi15955; (ii) o gene *cry34Ab1* controlado por uma segunda cópia do promotor *ubiZM1* de milho com região 5' UTR e íntron. O terminador para o gene *cry34Ab1* é a região terminadora do gene inibidor da proteinase II de *Solanum tuberosum* (batata) (terminador *pinII*); (iii) o gene *cry35Ab1* controlado pelo promotor da peroxidase de *Triticum aestivum* (trigo) (promotor da peroxidase TA) e pela sequência líder. O terminador para o gene *cry35Ab1* é uma segunda cópia do terminador *pinII*; e finalmente (iv) uma versão do gene da fosfinotricina *N*- acetiltransferase (*pat*) controlado pelas regiões promotoras e terminadoras do transcrito 35S do Vírus do Mosaico da Couve-Flor (CaMV).

### **Caracterização molecular:**

As análises de *Southern blot* de DNA genômico de milho DP4114 digerido com *Bcl* I usando sondas específicas para cada um dos elementos genéticos dentro do T-DNA PHP27118 foram consistentes com a integração de uma única cópia do T-DNA dentro do genoma de milho DP4114. As análises de *Southern blot* de DNA genômico digerido com *Bcl* I obtido a partir de quatro gerações de milho DP4114 (T2, T3, BC3F1\*3 e BC3F2\*2) demonstraram a falta de integração de quaisquer sequências derivadas do plasmídeo PHP27118 espinha dorsal. Uma deleção de 29 pb na extremidade da Borda Direita e uma deleção de 24 pb na extremidade da Borda Esquerda foi encontrada no T-DNA inserido no milho DP4114, o que não é incomum para eventos de transformação mediados por *Agrobacterium*. Além disso, na extremidade 5' da inserção, a posição 1-24 pb da inserção consiste em 15 pb da sequência de T-DNA e 9 pb da sequência *cry1F*. Toda a sequência restante está intacta e idêntica à do plasmídeo PHP27118. As regiões de fronteira genômica 5' e 3' da inserção de milho DP4114 foram verificadas como sendo de origem de milho por amplificação por PCR e sequenciamento das regiões de fronteira genômica de milho DP4114 e plantas de milho controle. O solicitante alega que os estudos conduzidos demonstram que os genes introduzidos segregam de acordo com a herança de Mendeliana, são herdados de forma estável em várias gerações e foram integrados em um único ponto de inserção

### **Conclusão:**

Não houve diferenças estatísticas na composição de nutrientes entre o milho DP4114 e o milho controle, exceto para cinzas, fósforo, potássio e ácido eicosenóico (C20:1); no entanto, todos os pontos de dados individuais para esses quatro analitos estavam dentro dos respectivos intervalos de tolerância. Considerando a equivalência composicional entre o milho DP4114 e o milho convencional, concluiu-se que o milho DP4114 é comparável a isolinha e aos híbridos de milho de referência;

Uma avaliação bioinformática da sequência da proteína Cry1F para potencial reatividade cruzada com alérgenos conhecidos ou putativos foi conduzida de acordo com as diretrizes relevantes. Duas pesquisas separadas para cada sequência de proteína (Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT) foram realizadas usando o banco de dados Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) 2020 (janeiro de 2020) disponível em <http://comparedatabase.org>. Os resultados da pesquisa das sequências de proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT contra o banco de dados COMPARE de sequências de alérgenos conhecidas e putativas não encontraram alinhamentos que tivessem um comprimento de 80 ou mais com uma identidade de sequência de  $\geq 35\%$ . Nenhuma correspondência contígua de 8 resíduos entre a sequência da proteína Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 ou PAT e as sequências do alérgeno foi identificada na segunda pesquisa. Coletivamente, esses dados indicam que nenhuma preocupação com a alergenicidade surgiu da avaliação de bioinformática das proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 ou PAT;

O milho DP4114 foi avaliado examinando o potencial alergênico do milho como cultura e avaliando o potencial alergênico e tóxico das proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT. As proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT foram avaliadas anteriormente para os milhos 1507 e 59122 e foram determinadas como improváveis de serem alérgenos ou toxinas potenciais para humanos e animais. As avaliações anteriores dessas proteínas incluíram análises de bioinformática, estudos de digestibilidade e estudos de toxicidade aguda de proteínas e são relevantes para a avaliação do milho DP4114. As análises de bioinformática atualizadas apoiam as conclusões originais de que as proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT provavelmente não são alérgenos ou toxinas. Esses dados suportam a conclusão de que as proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT no milho DP4114 são, portanto, seguras e este milho está apto para ser utilizado em alimentos e rações;

A toxicidade potencial das proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT foi avaliada por comparação da sequência de cada proteína com as sequências em um banco de dados de toxinas interno. Nenhum alinhamento com um valor  $E \leq 10^{-4}$  foi retornado entre a sequência de proteína Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT e qualquer sequência de proteína no banco de dados de toxinas interno. Portanto, nenhuma preocupação com a toxicidade surgiu das avaliações de bioinformática das proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT;

Os resultados das avaliações de estabilidade ao calor denotam que as proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT são instáveis em altas temperaturas e que as proteínas Cry1F, Cry34Ab1, Cry35Ab1 e PAT serão inativadas por muitos dos processos envolvidos no processamento de alimentos ou animais. Ressalta-se que a proteína PAT pode ser completamente inativada pelo calor após 10 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$  ou temperaturas mais altas, apesar do fato de que a proteína não ser degradada;

A digestibilidade da proteína Cry1F foi investigada por meio de experimentos de digestão que mediram sua degradação em fluido gástrico simulado (SGF). A proteína Cry1F não foi detectável após 15 segundos em SGF, conforme demonstrado pelas análises de SDS-PAGE e de *Western blot*. Os ensaios de SGF na proteína Cry34Ab1 ou Cry35Ab1 resultaram em um valor DT90 (ou tempo até 90% de digestão) de menos de 7 minutos e menos de 5 minutos, respectivamente. Esses resultados são consistentes com outras proteínas *Bt Cry*, que se tornam indetectáveis em ou menos de 7 minutos de exposição ao SGF. A literatura já mostrou que a proteína PAT se degrada a níveis não detectáveis dentro de 5 segundos após a digestão em SGF contendo pepsina;

As proteínas expressas no milho DP4114 não apresentaram evidências de alergenicidade ou toxicidade, conforme já mostrado em estudos anteriores. A segurança e a equivalência nutricional do grão de milho DP4114 foram avaliadas por meio de um estudo de toxicidade oral com ratos que consistiu em 90 dias de alimentação com doses repetidas. O estudo foi conduzido de acordo com diretrizes aceitas internacionalmente (US-EPA, 1998). Não foram observadas diferenças toxicologicamente significativas relacionadas ao consumo de dieta contendo o milho DP4114 em nenhum dos parâmetros avaliados. Estes resultados suportam a conclusão de que o milho DP4114 é tão seguro e nutritivo quanto o milho não transgênico, isolinha controle;

#### **Parecer:**

A avaliação de biossegurança do milho geneticamente modificado resistente a determinados lepidópteros e coleópteros praga e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, evento DP-ØØ4114-3, conclui sobre sua

similaridade aos eventos individuais quanto à biossegurança ao meio ambiente e à saúde humana e animal. Na avaliação, 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.

Face ao exposto, no âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, bem como os critérios internacionalmente aceitos para avaliação de segurança de alimentos e matérias primas geneticamente modificadas, considero que os dados de biossegurança do evento DP-004114-3 atendem às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal. Assim, atendidas as condições descritas no processo e neste parecer técnico, essa atividade **não é potencialmente causadora** de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana e animal.

### Monitoramento

A CTNBio não identificou risco não negligenciável, estando a empresa isenta do plano de monitoramento pós-liberação comercial, conforme determina o parágrafo 2, do artigo 9o da Resolução Normativa 24 da CTNBio. Caso eventual risco não negligenciável resulte da liberação comercial do OGM, a empresa deverá comunicar à CTNBio no prazo de 30 dias úteis após a identificação do fato, conforme determina o parágrafo 4 do artigo 9o da Resolução Normativa 24 da CTNBio.

Data: 10/06/2021

(assinado eletronicamente)  
**Paulo Augusto Vianna Barroso**  
Presidente da CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Augusto Vianna Barroso, Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**, em 24/06/2021, às 07:46 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **7694564** e o código CRC **55DCED41**.