



COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 117/2022/SEI-CTNBio - Membros

PARECER TÉCNICO: 7897/2022

Processo: 01245.014790/2021-33

Data de Protocolo: 31/08/2021

Assunto: Liberação Comercial de Milho geneticamente modificado, evento 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21.

Requerente: CIBio Syngenta Seeds LTDA.

CQB: 001/96

Endereço: BR 452 Km 142 Uberlândia/MG.

Título: liberação comercial do milho (*Zea mays* L.), do produto combinado Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21.

Extrato Prévio: 7895/2021

Decisão: Deferido

Reunião: 248ª Reunião Ordinária ocorrida em 03/02/2022

Identificação do OGM

Designação do OGM: Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21.

Espécie: *Zea mays* L.

Característica Inserida: resistência a insetos e tolerância a herbicidas.

Método de introdução da característica: O Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo os eventos individuais 32721, Bt112, MIR1623, e GA214.

Uso proposto: cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte deste OGM, suas combinações possíveis e seus derivados, bem como suas progênes.

Resumo da Fundamentação Técnica:

A CIBio da Syngenta Seeds Ltda, detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) nº 001/96, solicita a liberação comercial do milho (*Zea mays* L.) geneticamente modificado, denominado Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, desenvolvido através de melhoramento genético clássico do cruzamento entre linhagens contendo os eventos de transformação individuais Milho 3272, Milho Bt11, Milho MIR162, e Milho GA21, que expressam os genes da alfa-amilase termoestável (amy797E) e da fosfomanose isomerase (pmi) (Milho 3272), cry1Ab e pat (Milho Bt11), vip3Aa20 e pmi (Milho MIR162), e mepsps (Milho GA21), todos já avaliados e aprovados previamente pela CTNBio para uso comercial no Brasil, seja com eventos individuais ou em diversos produtos combinados, desde o ano de 2008.

O objetivo da combinação destes eventos de transformação individuais é dar mais uma opção de manejo da cultura do milho ao agricultor, através da resistência a insetos lepidópteros, proporcionada pelos eventos Bt11 e MIR162, com a tolerância aos herbicidas glifosato (Milho GA21) e glufosinato de amônio (Milho Bt11) aliadas à característica de aumento da qualidade do produto (milho 3272), cuja a característica inserida (alfa amilase termoestável) agrega valor ao grão do milho a ser destinado, por exemplo, à produção de etanol de milho.

As informações referentes a Avaliação de Biossegurança à Saúde Humana, Animal e ambiental, para os eventos de transformação individuais que compõem o produto combinado Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21 foram previamente apresentados à CTNBio para suas respectivas análises de risco. O produto Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21 não apresentou outras modificações genéticas, além da introgressão destes eventos nas linhagens de milho, por meio de melhoramento genético clássico.

As avaliações foram feitas respectivamente para Milho 3272, processo CTNBio nº 01200.702462/2016-47, Parecer Técnico nº 5.226/2016;

Milho Bt11, processo CTNBio nº 01200.002109/2000-04, Parecer Técnico nº 1.255/2008;

Milho MIR162, processo CTNBio nº 01200.007493/2007-08, Parecer Técnico nº 2.042/2009;

Milho GA21, processo CTNBio nº 01200.000062/2006-21, Parecer Técnico nº 1.597/2008.

As análises do produto da expressão das proteínas expressas pelos eventos individuais que formam o produto combinado 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, com as respectivas avaliações do potencial de toxicidade como também de alergenicidade foram apresentadas.

No produto combinado, Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, nenhuma das proteínas compartilha via metabólica, têm diferentes modos de ação e são sintetizadas pela planta de forma independente. A proteína AMY797E produz a proteína alfa-amilase termoestável AMY797E e PMI uma fosfomanose isomerase que atua como marcador de seleção no processo de transformação, não compartilhando de vias metabólicas similares e sem histórico de alergenicidade e/ou toxicidade. As proteínas mEPSPS e PAT conferem tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio, respectivamente. São enzimas distintas com modos de ação específicos que atuam em distintas vias metabólicas da planta e em compartimentos celulares diferentes ambas com histórico de uso seguro. As proteínas inseticidas Cry1Ab e Vip3Aa20 conferem tolerância a insetos Lepidópteros, utilizando mecanismos de ação e receptores diferentes conforme relatado em estudos específicos de interações, também com histórico de uso seguro, seja em plantas geneticamente modificadas, como pela utilização em inseticidas biológicos. Existem também evidências e histórico de uso seguro das proteínas AMY797E, PMI, Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20 e mEPSPS em uma variedade de produtos combinados, de maior ou menor ordem, que expressam essas proteínas simultaneamente, e mostraram-se seguras a saúde humana e animal.

Transformação genética

O milho para aumento da qualidade do produto, resistência a insetos e tolerância à herbicidas, denominado aqui de Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo os eventos de transformação individuais 3272, Bt11, MIR162, e GA21, que expressam os genes da alfa-amilase termoestável (amy797E) e da fosfomanose isomerase (pmi) (Milho 3272), cry1Ab e pat (Milho Bt11), vip3Aa20 e pmi (Milho MIR162), e mepsps (Milho GA21), todos já avaliados e aprovados previamente pela CTNBio para uso comercial no Brasil, seja com eventos individuais ou em diversos produtos combinados, desde o ano de 2008 (Tabela 1), e informações sobre seus eventos de transformação são bastante conhecidas.

O Milho 3272 foi desenvolvido por meio de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, pela inserção do gene sintético amy797E, cuja expressão produz a proteína alfa-amilase termoestável AMY797E. O gene amy797E é um gene quimérico derivado de sequências de três genes de alfa-amilase originários de três microrganismos hipertermófilos da ordem archaea Thermococcales. Este gene quimérico de alfa-amilase foi montado a partir de sequências parentais utilizando-se a tecnologia GeneReassembly™ (Diversa Corporation, San Diego, CA), com o seu códon usage ajustado para milho, e foi selecionado pelas propriedades de termo estabilidade da proteína de amilase codificada, necessárias

durante a fase de liquefação do amido no processamento dos grãos de milho, como por exemplo, na produção de etanol.

O Milho 3272 também expressa o gene *pmi* obtido da bactéria *Escherichia coli* cepa K-12 que codifica a enzima fosfomanose isomerase que interconverte manose-6-fosfato/frutose-6-fosfato permitindo à bactéria utilizar manose como fonte de carbono. Este gene, introduzido em plantas, impede a depleção de fosfato sequestrado como manose-6-fosfato acumulada quando se adiciona manose ao meio de cultura, sendo um marcador versátil e seguro para identificar células transformadas de plantas, permitindo a seleção de células vegetais que o expressam em meio contendo manose como substrato.

O Milho Bt11 foi geneticamente modificado pela inserção dos genes *cry1Ab* e o gene *pat*. O milho geneticamente modificado Bt11 foi obtido pela transferência direta de DNA em protoplastos da linhagem H8540 de milho, derivados de células embriogênicas em cultura em suspensão, tratadas com enzimas para degradação da parede celular. Contém o gene sintético *cry1Ab*, proveniente de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, que codifica a proteína inseticida *Cry1Ab*, que dá ao Milho Bt11 a resistência a insetos lepidópteros praga e o gene *pat*, derivado do microorganismo de solo *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, que codifica a enzima fosfinotricina N-acetiltransferase (PAT).

A Syngenta Seeds Ltda., desenvolveu o milho geneticamente modificado, designado Milho MIR162, para oferecer um genótipo de milho resistente a insetos da classe dos Lepidópteros. Para tanto a empresa inseriu no genoma de milho o gene *Vip3Aa19* que é uma proteína de *Bacillus thuringiensis* que é tóxica à insetos lepidópteros praga, por exemplo como os da espécie *Spodoptera frugiperda*. A transformação foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em embriões imaturos de milho. Entre as sequências foi inserido um cassete com os genes *vip3Aa19* e *pmi*, o promotor da poliubiquitina de milho (*ZmUbi1NT*) e 35S do CMV e região 3' de poliadenilação de nopalina sintase. Análise por Southern blot e sequenciamento revelaram que o T-DNA contém: I - uma cópia simples de *vip3Aa19*; II - duas cópias do promotor de *ZmUbi1NT*; III - uma cópia de NOS como terminador; e IV - nenhuma sequência do plasmídeo pNOV1300. Análise da sequência demonstrou duas modificações na sequência original do gene *Vip3Aa19* uma silenciosa e outra que teve como consequência a substituição de um aminoácido na sequência original da *Vip3Aa19*. Por esta razão a sequência que foi inserida no milho foi denominada *Vip3Aa20*. A transferência do T-DNA não interrompeu nenhum gene no genoma do milho e nenhuma nova ORF foi criada pela inserção. Os genes inseridos segregam de maneira mendeliana e estável em gerações sucessivas, que foram objeto de análise. O Milho MIR162 também expressa o gene *pmi* obtido da bactéria *Escherichia coli* cepa K-12 que codifica a enzima fosfomanose isomerase que interconverte manose-6-fosfato/frutose-6-fosfato permitindo à bactéria utilizar manose como fonte de carbono. Este gene, introduzido em plantas, impede a depleção de fosfato sequestrado como manose-6-fosfato acumulada quando se adiciona manose ao meio de cultura, sendo um marcador versátil e seguro para identificar células transformadas de plantas permitindo a seleção de células vegetais que o expressam em meio contendo manose como substrato. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada portando o plasmídeo pNOV1300 com dois cassetes de expressão: um deles tem o promotor *ZmUbi1nt* de milho, a região codificante otimizada do peptídeo *vip3Aa* de *Bacillus thuringiensis*, seguida da região que contém o íntron 9 da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho (para aumentar a expressão gênica), finalizando com a região terminadora 3'UTR 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CMV). O segundo cassete de expressão foi composto pelo *ZmUbi1nt* de milho, a região codificante composta pelo gene *pmi* de *E. coli* que codifica a proteína fosfomanose isomerase (PMI), seguido da região 3'UTR do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens*. O genoma do milho transgênico foi analisado por "Southern blot" usando DNA total digerido com diversas enzimas de restrição e sondas correspondentes a quatro regiões das construções usadas confirmando a presença de uma cópia de cada cassete em seu genoma.

O Milho GA21 contém o gene *mepsps* que expressa a enzima modificada Sintase 5-Enolpiruvil Shikimato-3-Fosfato (mEPSPS). A EPSPS é uma enzima chave no processo do ácido shikímico, envolvido na biossíntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), encontrada naturalmente em plantas, fungos e bactérias, e ausente nos animais. A EPSPS é altamente sensível aos herbicidas contendo glifosato como ingrediente ativo. O Milho GA21 foi produzido via bombardeamento com micro projeteis de uma suspensão de células de cultura, utilizando-se o plasmídeo pDPG434, derivado do vetor pSK, o qual é comumente utilizado em biologia molecular e é derivado do vetor pUC19. Os elementos destinados a inserção do gene de interesse estão contidos dentro do fragmento de restrição *NotI*, contendo o cassete de expressão usado para a geração do evento GA21. O Milho GA21 contém o promotor da actina 1 de arroz, o gene *mepsps* (gene modificado da EPSPS de milho), que codifica a proteína mEPSPS e confere tolerância ao herbicida

glifosato, o terminador NOS, responsável pela terminação da transcrição, e sequências OTP, responsáveis por dirigir a proteína mEPSPS ao cloroplasto. A construção gênica utilizada para inserir o gene mepsps em milho resultou na inserção estável de uma cópia funcional desse gene, a qual proporcionou tolerância das plantas ao herbicida glifosato.

Avaliação das proteínas expressas

Para avaliar os níveis de expressão das proteínas AMY797E e PMI no Milho 3272, foram realizados estudos a campo, e as concentrações das proteínas foram determinadas por ELISA em vários tecidos vegetais e na planta inteira em cinco estádios de crescimento (cartucho, antese, enchimento do grão, maturidade da semente e senescência) no Milho 3272 e no híbrido não geneticamente modificado, com mesmo *background* genético. Como esperado, níveis relativamente elevados da proteína AMY797E foram medidos em grãos do Milho 3272. Os níveis médios de AMY797E em grãos do híbrido avaliado em todas as fases variou de 838 ± 225 µg/g (peso úmido) (1004 ± 322 µg/g em peso seco) para 1627 ± 338 µg/g (peso úmido) (3365 ± 780 µg/g em peso seco). Além de grãos, os níveis da proteína AMY797E foram medidos em raízes, folhas, pólen e em plantas inteiras em cinco estágios de desenvolvimento. A expressão da proteína PMI se dá por um promotor constitutivo e foi detectada na maior parte da planta e tecidos analisados, com exceção de algumas amostras de plantas na senescência. Níveis de PMI foram geralmente semelhantes para o milho avaliado em cada ponto de tempo, para cada tipo de tecido, com os mais altos níveis sendo detectados no pólen: 8,0 - 8,5 (µg/g de peso fresco) e 17,0 – 18,2 (µg/g em peso seco).

A toxidez potencial a mamíferos de ambas as proteínas foi avaliada pela execução de estudos de toxidez oral em ratos. Nenhuma toxidez foi observada em doses muito altas (1.511 mg de proteína/kg de peso corporal para AMY797E e 2.000 mg de proteína/kg de peso corporal para PMI). Ambas as proteínas AMY797E e PMI, portanto, são consideradas atóxicas.

Uma rigorosa avaliação do potencial de alergenicidade da proteína AMY797E e da proteína PMI foi conduzida, utilizando uma abordagem de peso-da-evidência. As proteínas AMY797E e PMI não são derivadas de organismo fonte conhecido como produtor de proteínas alergênicas. Nenhuma similaridade significativa de sequência de aminoácidos de AMY797E ou PMI com sequências de proteínas alergênicas putativas ou conhecidas foi identificada. Tanto AMY797E como PMI foram rapidamente degradadas em fluido gástrico simulado (SGF) de mamíferos e foram inativadas. Baseando-se nessa evidência, tanto AMY797E como PMI foram consideradas improváveis de serem alimentos alergênicos, mais ainda, o potencial de exposição de mamíferos a essas proteínas é mínimo, devido aos seus baixos níveis de expressão nos tecidos do milho. .

Para Cry1Ab, os níveis de expressão mais elevados foram observados em folhas, com 27 a 33 ng/g de tecido fresco. Níveis 5 a 10 vezes mais baixos foram observados em tecidos da palha, colmo e grãos. Para PAT, a quantidade descrita em folhas é da ordem de 44 ng/g de tecido fresco, metade deste valor foi encontrada em pendões e 10 vezes menos em estilo estigmas, nenhuma diferença foi apontada como sendo estranha a cultura do milho. Não foram apontados efeitos alergênicos ou tóxicos provenientes de plantas e grãos geneticamente modificados do Milho Bt11. As proteínas geneticamente modificadas são degradadas, pelos sucos gástricos e por bactérias presentes no trato gastrointestinal de seres humanos e animais. Em virtude da maior proteção das plantas ao ataque de insetos e, em particular, das espigas do Milho Bt11, há menos toxinas de origem fúngica nos grãos, reduzindo a possibilidade de intoxicações de seres humanos e animais. Nenhuma mudança biológica significativa, não intencional, ocorreu na composição ou no valor nutritivo do grão e da forragem do Milho Bt11, como consequência da expressão dos genes cry1Ab e pat. Portanto, concluiu-se que o Milho Bt11 é substancialmente equivalente ao respectivo híbrido isogênico não geneticamente modificado.

A ingestão das proteínas inseticidas, como a Cry1Ab por lepidópteros praga, como a *Spodoptera frugiperda*, com aparelho digestivo alcalino promoverá a sua morte pela interação da proteína com receptores de superfície celular das células intestinais desses insetos, promovendo a abertura de poros e a invasão de microrganismos do trato intestinal. Assim, a morte dos insetos é decorrente do desequilíbrio osmótico promovido pela toxina e pela septicemia decorrente da invasão por microrganismos da flora intestinal. Não foram observadas diferenças significativas entre as populações de organismos não alvo, quando comparadas plantas Bt11 com sua linhagem isogênica não modificada geneticamente. Os híbridos Bt11 foram eficientes para controle dos lepidópteros praga avaliados, bem como superiores para os parâmetros agrônômicos de

rendimento de grãos e grãos ardidos. Para os demais parâmetros agrônômicos avaliados (estatura de plantas, altura de inserção da espigas, data de florescimento masculino e feminino, nota para doenças, porcentagem de plantas eretas, tipo de grão, cor de grão), os híbridos Bt11 apresentaram desempenho estatisticamente igual aos respectivos híbridos isogênicos não GM, confirmando a equivalência de desempenho agrônômico entre os híbridos Bt11 e os isogênicos não GM em condições de cultivo da cultura no Brasil.

As proteínas expressas decorrentes da modificação genética do Milho MIR162, a Vip3Aa20 e a fosfomanose isomerase (PMI), foram avaliadas por ELISA. A Vip variou de 4,34 µg/g de peso seco (PS) na folha no momento da senescência a 184,05 µg/g PS em estilos e estigmas. No grão, que é a principal parte destinada a consumo humano e animal, o máximo observado foi 61,33 µg/g de peso seco. Já a os níveis da proteína PMI foram muito mais reduzidos, atingindo um máximo de 7,06 µg/g de peso seco, em folhas no estágio da antese.

Nos estudos realizados, não foram apontados efeitos alergênicos ou tóxicos para as proteínas inseridas no Milho MIR162. As proteínas geneticamente modificadas não são similares a alérgenos conhecidos, quando comparadas aos bancos de dados destas referidas proteínas, como também são degradadas em poucos segundos tanto no estudo com fluido gástrico simulado (SGF) como no estudo de fluido intestinal simulado (SIF) ou mesmo no estudo de reatividade a temperaturas elevadas. O Milho MIR162 é substancialmente equivalente ao milho não geneticamente modificado, como verificado no estudo de equivalência substancial do grão e da forragem do milho.

Os estudos de biossegurança, performance agrônômica e resistência a insetos e efeitos em organismos não alvo foram efetuados no campo, (liberação planejada no meio ambiente) em aproximadamente 17 ensaios no Brasil, inúmeros testes nos EUA e cerca de 10 liberações na Argentina. Esta inserção não teve qualquer efeito de alterar o comportamento potencial do milho transformado de se tornar mais invasivo do que híbridos convencionais não geneticamente modificados, conforme comprovado por sucessivos ensaios de campo em que os milhos GM foram comparados com milhos convencionais. O fluxo gênico horizontal entre o milho MIR 162 e outras espécies, mesmo aquelas muito relacionadas, tem probabilidade praticamente nula de ocorrer, pois espécies silvestres relacionadas com o milho não ocorrem naturalmente no Brasil. Não foram observadas diferenças significativas entre as populações de organismos não alvo, quando comparado o cultivo de Milho MIR162 e o milho não geneticamente modificado. O Milho MIR162 é eficiente para controle dos lepidópteros praga avaliados, e se comporta de maneira similar ao milho não geneticamente modificado quanto aos parâmetros agrônômicos avaliados (estatura de plantas, altura de inserção da espigas, data de florescimento masculino e feminino, nota para doenças, porcentagem de plantas eretas, tipo de grão, cor de grão), apresentando desempenho estatisticamente igual aos respectivos híbridos não geneticamente modificados em condições de cultivo da cultura no Brasil.

Concentrações quantificáveis da proteína mEPSPS foram detectadas na maior parte dos tecidos de plantas derivadas do evento GA21. Nenhuma das sequências introduzidas no evento GA21 ou de seus doadores são conhecidas como patogênicas para os seres humanos ou animais. As proteínas EPSPS são ubíquas na natureza e estão naturalmente presentes em alimentos derivados de fontes vegetais e microbianas presentes na dieta normal de humanos e animais. Foram realizadas análises de equivalência substancial de diversos componentes nutricionais do grão de milho. Tais análises indicaram que os níveis de componentes mensurados não haviam mudado além da variação natural no milho. Nenhum padrão consistente emergiu que sugerisse que mudanças biologicamente significativas na composição ou valor nutritivo do grão ou forragem ocorreram em consequência da transformação ou expressão do gene *mepsps*. A análise de aminoácidos da proteína mEPSPS não apresenta homologia com proteínas tóxicas para mamíferos e não se julga que apresente potencial tóxico para humanos. A ausência de toxicidade também foi comprovada com estudos em animais empregando-se altas doses de proteína purificada. A enzima mEPSPS expressa no Milho GA21 não possui características típicas de alérgenos conhecidos. Não há regiões de homologia quando a sequência introduzida é comparada com sequências de alérgenos conhecidos. Além disso, a enzima mEPSPS é rapidamente degradada por hidrólise ácida e enzimática quando exposta a fluidos que se assemelham aos fluidos gástricos (SGF) ou intestinais (SIF). Assim, o Milho GA21 tem um comportamento ambiental semelhante ao milho comum. A possibilidade do gene *mepsps* da planta transgênica passar para outros organismos é praticamente nula. O gene *epsps* é comum a plantas, fungos e microrganismos, ocorre abundantemente na natureza, não resultando em risco significativo para a microbiota do solo. Adicionalmente, não há evidências de que genes de plantas tenham sido transferidos a bactérias nas condições naturais.

Avaliação da segurança humana e animal

Baseado nas avaliações de biossegurança à saúde humana, animal e ambiental dos eventos individuais, já avaliados e aprovados para comercialização previamente pela CTNBio;

Nos preceitos da World Health Organization - WHO (WHO, 1995), que através de seus guias de avaliação de segurança, publicados há mais de 20 anos, que reconhecem que quando duas plantas geneticamente modificadas, substancialmente equivalentes às variedades convencionais são cruzadas por melhoramento genético clássico, é esperado que o produto resultante desse cruzamento seja substancialmente equivalente aos eventos individuais; Na interpretação do Codex Alimentarius Commission (CODEX, 2009), que em seus princípios e guias de avaliação aplicados aos eventos individuais, considera há bastante tempo que uma vez que se tenha concluído pela segurança desses eventos, o cruzamento deles por melhoramento genético clássico poderia ser usado para introgressão desses eventos geneticamente modificados em cultivares comerciais, sem a necessidade de avaliações de segurança adicionais; E conforme relatado anteriormente o Milho 3272, o Milho Bt11, o milho MIR162 e o Milho GA21 possuem histórico de uso seguro, são substancialmente equivalentes aos seus híbridos não geneticamente modificados e estão aprovados para comercialização pela CTNBio no Brasil, e baseando-se nos dados aqui apresentados, das Avaliação de Biossegurança para Humanos e Animais e na Avaliação de Biossegurança ao Meio Ambiente dos eventos de transformação individuais que fazem parte do produto combinado Milho 3272 x BT11 MIR162 x GA21, conclui-se que o produto combinado, através de melhoramento genético clássico, não apresenta riscos significativos sobre a saúde humana, animal ou ao meio ambiente. Qualquer dano, se houvesse, seria reduzido e com probabilidade de ocorrência desprezível, ou seja, um risco negligenciável.

Na interpretação do Codex Alimentarius Commission (CODEX, 2009), que em seus princípios e guias de avaliação aplicados aos eventos individuais, considera há bastante tempo que uma vez que se tenha concluído pela segurança desses eventos, o cruzamento deles por melhoramento genético clássico poderia ser usado para introgressão desses eventos geneticamente modificados em cultivares comerciais, sem a necessidade de avaliações de segurança adicionais; E conforme relatado anteriormente o Milho 3272, o Milho Bt11, o milho MIR162 e o Milho GA21 possuem histórico de uso seguro, são substancialmente equivalentes aos seus híbridos não geneticamente modificados e estão aprovados para comercialização pela CTNBio no Brasil, e baseando-se nos dados aqui apresentados, das Avaliação de Biossegurança para Humanos e Animais e na Avaliação de Biossegurança ao Meio Ambiente dos eventos de transformação individuais que fazem parte do produto combinado Milho 3272 x BT11 MIR162 x GA21, conclui-se que o produto combinado, através de melhoramento genético clássico, não apresenta riscos significativos sobre a saúde humana, animal ou ao meio ambiente. Qualquer dano, se houvesse, seria reduzido e com probabilidade de ocorrência desprezível, ou seja, um risco negligenciável.

Avaliação ambiental

Uma grande quantidade de informações foi gerada em experimentos a campo utilizando os eventos individuais que compõem o produto combinado Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, todos já foram avaliados e aprovados pela CTNBio, que cancelou as avaliações de Biossegurança ao meio ambiente de cada um destes eventos, que hoje são cultivados no Brasil e em outros países do mundo, há mais de 20 anos.

Os dados gerados para estes eventos foram apresentados e aprovados pela CTNBio nos respectivos “Relatórios de Biossegurança Alimentar e Ambiental” de cada um dos eventos individuais que compõem o produto combinado Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, a saber:

a) Milho 3272, Parecer Técnico CTNBio nº 5.226/2016

b) Milho Bt11, Parecer técnico CTNBio nº 1.255/2008

c) Milho MIR162, Parecer Técnico CTNBio nº 2.042/2009 d) Milho GA21, Parecer Técnico CTNBio nº 1.597/2008

A avaliação de risco ao meio ambiente de uma nova cultivar geneticamente modificada, geralmente utiliza um conjunto de parâmetros para determinar se há ou não um impacto ao meio ambiente, quando do cultivo da nova cultivar com o novo transgene. Tais parâmetros geralmente são: 1-performace agrônômica e características fenotípicas; 2-potencial da nova cultivar GM se tornar uma planta daninha; 3-fluxo gênico para

espécies parentais locais; 4-impactos quanto a degradabilidade da planta GM no solo; 5-impactos em organismos não alvo; 6- histórico de uso seguro dos eventos/proteínas.

1-A expressão dos genes amy797E, pmi, cry1Ab, pat, vip3Aa20, e mepsps dos eventos de transformação individuais que compõem o produto combinado Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, foram avaliadas quanto o seu impacto na performance agrônômica e características fenotípicas quanto a: produção por ha, estágio de crescimento, estande inicial, germinação e vigor da semente, contagem inicial de estande, dias até 50% de liberação de pólen, altura de espiga, altura de planta, contagem final de estande, plantas acamadas pelo colmo, plantas acamadas pela raiz, dias até a maturidade, reação as principais doenças do milho, interações ambientais (danos causados por artrópodes), e não foi detectada nenhuma diferença biológica significativa entre os híbridos de milho GM quando comparadas ao híbridos não geneticamente modificados. Esses dados foram coletados no Brasil, nos Estados Unidos e Argentina, em experimentos a campo em várias regiões representativas para a cultura do milho destes países, nos respectivos anos-safras em que os estudos dos eventos individuais foram realizados e todas estas informações foram previamente submetidas, analisadas e aprovadas pela CTNBio.

2- A possibilidade dos milhos geneticamente modificados se tornarem uma espécie daninha, bem como o cruzamento dos milhos 3272, Bt11, MIR162 e GA21 com outras plantas de milho, originar uma planta daninha é desprezível, visto que os genes inseridos nestes respectivos milhos, não geraram nenhuma vantagem competitiva, conforme comprovado nos respectivos estudos de performance agrônômica e avaliação fenotípica de cada milho, apresentados à CTNBio. Também, devido as características biológicas da espécie e ao fato de que o milho não sobrevive bem sem a intervenção humana. Assim, o Milho 3272, Milho Bt11, Milho MIR162 e Milho GA21 ou mesmo os produtos combinados contendo estes, tem um comportamento ambiental semelhante ao milho não geneticamente modificado.

3-Fluxo gênico: a dispersão de sementes de milho é facilmente controlada, uma vez que a domesticação do milho eliminou os mecanismos ancestrais de dispersão de sementes, que estão cobertas por palha, e o movimento de pólen é o único meio efetivo de escape de genes de plantas de milho. O fluxo gênico entre milho geneticamente modificado e outras espécies, mesmo aquelas muito relacionadas, tem probabilidade praticamente nula de ocorrer, pois espécies silvestres relacionadas com o milho não ocorrem naturalmente no Brasil. A coexistência entre cultivares de milhos convencionais (melhoradas ou crioulas) e cultivares geneticamente modificadas de milho é possível do ponto de vista agrônômico, devendo-se, para isso, observar o disposto na Resolução Normativa nº 4 da CTNBio, (2007), que trata da coexistência entre os diversos tipos de cultivo do milho.

4- A degradação de diferentes resíduos das culturas é resultado das condições locais e regionais tais como, clima, tipo de solo, vegetação, fauna e microrganismos decompositores. No estudo de equivalência substancial para cada evento individual, apresentado à CTNBio, ficou comprovado que não houve alterações biologicamente significativas ocorridas na composição, devido ao resultado não intencional do processo de transformação dos milhos 3272, Bt11, MIR162 e GA21. Por conta disto, pode-se afirmar que as características inseridas no Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, não alteram a biodegradabilidade da planta contendo estes eventos, em comparação com o seu parental, não geneticamente modificado.

5-Não foram observadas diferenças significativas entre as populações de organismos não alvo, quando comparadas plantas contendo os eventos BT11, MIR162 e GA21, nos produtos combinados, que contém proteínas inseticidas, Milho Bt11 x MIR162 x GA21 (Parecer Técnico de aprovação pela CTNBio Nº2.722/2010) e Milho Bt11 x MIR162 x MON89034 x GA21 (Parecer Técnico de aprovação pela CTNBio Nº 5.412/2017), com suas linhagens isogênicas não geneticamente modificadas. Como a proteína AMY797E (Milho 3272) não é uma proteína inseticida, com histórico de uso seguro de mais de 10 anos de cultivo nos EUA e as enzimas alfa amilases são ubíquas na natureza, não se faz necessário, estudos de efeito em organismos não alvo.

6-Como todas as proteínas dos eventos de transformação individuais 3272 (AMY797E, PMI), Bt11 (Cry1Ab e PAT), MIR162 (Vip3Aa20 e PMI), e GA21 (mEPSPS), juntas no produto combinado, Milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21, são de origem de microrganismos ou plantas, possuem histórico de uso seguro, seja em cultivares contendo os eventos individuais ou eventos combinados (ISAAA, 2021), estão presentes na natureza normalmente, não causam riscos à humanos, animais e ao meio ambiente, não são esperados riscos

significativos para a microbiota do solo, pelo cultivo do produto combinado (NIELSEN et al., 1998; SIQUEIRA et al., 2004).

Por fim, pode-se concluir que as características introduzidas nos eventos individuais quando comparadas ao milho não geneticamente modificado, não alteram o seu fenótipo e também não causam impacto, ao meio ambiente, e como já estudado por Steiner et al (2013), a combinação de milhos geneticamente modificados, em produtos combinados, não insere nenhuma nova característica fenotípica ou mesmo impacto ao meio ambiente. Estes dados e estudos corroboram o que vem sendo observado ao longo do cultivo comercial, a mais de 20 anos, de híbridos contendo os eventos individuais ou produtos combinados contendo os milhos 3272, Bt11, MIR162 e GA21, no Brasil e no mundo (ISAAA, 2021). Qualquer dano, se houvesse, seria reduzido e com probabilidade de ocorrência desprezível, ou seja, um risco negligenciável.

Parecer Final

Considerando que as normas da CTNBio estão baseadas em critérios técnicos internacionalmente aceitos, que a avaliação de biossegurança do milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21 conclui sobre sua similaridade ao milho convencional quanto à biossegurança ao meio ambiente e à saúde humana e animal e que plantas com subcombinações contendo menor número de eventos não apresentem riscos, diferentes daqueles já avaliados no processo que aprovou o evento combinado com os cinco transgenes, a CTNBio deliberou pelo DEFERIMENTO.

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 inclusão de subcombinações referentes ao evento geneticamente modificado 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21 no processo de liberação comercial é segura. Os dados apresentados na solicitação majoritária do milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21 atendem às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e permitem concluir que as subcombinações do milho 3272 x Bt11 x MIR162 x GA21 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, pode-se concluir que as subcombinações geneticamente modificadas não são potencialmente causadoras de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à do milho convencional.

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*”.

No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, Bem como o disposto na Resolução Normativa 20 que alterou o Art. 4 da Resolução Normativa 05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e as legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, sendo que esta atividade não apresenta impactos significativos ao meio ambiente.

Monitoramento pós Liberação comercial:

A CTNBio não identificou risco não negligenciável, dessa forma a empresa está isenta do plano de monitoramento pós-liberação comercial, conforme determina o Art. 18, parágrafo primeiro da RN32 da CTNBio.

Data: 04/02/2022

(assinado eletronicamente)
Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso
Presidente da CTNBio

Documento assinado eletronicamente por **Paulo Augusto Vianna Barroso, Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**, em 08/02/2022, às 11:09 (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 **9379314** e o código CRC **88D59D44**.

Referência: Processo nº 01245.014790/2021-33

SEI-CTNBio - Membros nº 9379314