



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES  
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio  
Coordenação Geral

**PARECER TÉCNICO Nº: 5500/2017**

**Processo:** 01200.000029/2015-92

**Data de Protocolo:** 06/01/2015

**Requerente:** Dow Agrosiences Industrial Ltda.

**CQB:** 107/99

**CNPJ:** 47.180.625/0001-46

**Endereço:** Av. Das Nações Unidas, 14.171 20 Andar - Parte Edif. Diamond Tower São Paulo/SP.

**Presidente da CIBio:** Luiz H. Telles

**Descrição do OGM:** Soja geneticamente modificada resistente a insetos e tolerante aos herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio (soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2).

**Classificação:** Classe de Risco I

**Resolução Normativa:** RN 05/2006

**Extrato Prévio:** 4392/2014, publicado em: 09/01/2015.

**Decisão:** DEFERIDO

**Reunião:** 204ª Reunião Ordinária ocorrida em 03/08/2017

### 1. Identificação do OGM

Designação do OGM: Soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2.

**Espécie:** *Glycine max* L. Merr.,

**Característica Inserida:** resistência a insetos e tolerância a herbicidas.

**Método de introdução da característica:** Soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 foi desenvolvida através de melhoramento genético clássico.

**Uso proposto:** uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas à soja geneticamente modificada resistente a insetos e tolerante aos herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio (DAS-44406-6 x DAS-81419-2) e suas progênies.

### 2. Proteínas Expressas:

- Cry1F – Confere resistência a insetos
- Cry1Ac – Confere resistência a insetos
- 2mEPSPS – Confere tolerância ao herbicida glifosato

- AAD12 - Confere tolerância ao herbicida 2,4-D
- PAT – Confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio

3. **Área de Restrição Ambiental:** 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”.

#### 4. **Fundamentação Técnica:**

A empresa Dow Agrosiences Industrial Ltda. solicita liberação comercial da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2, um evento combinado obtido por meio de cruzamentos clássicos, ou seja, a obtenção da nova variedade contendo múltiplos genes de espécies não compatíveis ocorreu por hibridização cruzada e seleção envolvendo doadores transgênicos. O OGM em questão é composto pelo evento DAS-44406-6, portador dos genes: (i) *aad-12 v1* que codifica a proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12), a qual confere à soja tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético); (ii) *2mepsps* que codifica a proteína 2mEPSPS, a qual confere tolerância ao herbicida glifosato; e (iii) *pat* que codifica a proteína PAT, a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. O outro evento simples, DAS-81419-2, é portador dos genes: (i) *cry1Ac* que codifica a proteína CRY1Ac, que confere resistência a lepidópteros praga; (ii) *cry1F v3* que codifica a proteína CRY1F, que também confere resistência a lepidópteros praga; e (iii) *pat v6* que codifica a proteína PAT, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (usado apenas como marcador de seleção).

O evento DAS-81419-2 foi liberado em 2013 no Japão (alimentação e cultivo). Em 2014 foi liberada comercialmente na Austrália (alimentação), Canadá (alimentação/ração/cultivo), Nova Zelândia (alimentação) e nos Estados Unidos (alimentação/ração/cultivo); Em 2015 foi liberada no México (alimentação) e Taiwan (alimentação). Em 2016, esta soja foi liberada comercialmente na Argentina (alimentação/ração/cultivo), Coreia do Sul (alimentação e ração animal) e no Brasil (CTNBio processo 01200.005009/2013-46). – Fonte: [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org).

A soja DAS-44406-6 foi liberada em 2013 na Austrália (alimentação), Canadá (alimentação/ração/cultivo), Nova Zelândia (alimentação), África do Sul (ração/cultivo); Em 2014 foi liberada no Japão (alimentação), México (alimentação), Coreia do Sul (ração), Taiwan (alimentação) e nos Estados Unidos (alimentação/ração/cultivo). Em 2015, esta soja foi liberada comercialmente na Argentina (alimentação/ração/cultivo) e no Brasil (CTNBio processo 01200.003948/2012- 75). E em 2016 foi liberada na Colômbia. – Fonte: [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org).

A soja **DAS-44406-6 x DAS-81419-2** foi liberada comercialmente em 2016 na Argentina (alimentação/ração/cultivo) e em Taiwan (alimentação). Em 9 de agosto de 2016 o pedido da empresa Dow Agrosience LCC de autorização para uso na alimentação e em ração, para importação e processamento da soja **GM DAS-81419-2 x DAS-44406-6** foi aceito pela EFSA (European Food Safety Authority). – Fonte: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=416>.

#### **Caracterização Molecular do Evento:**

A soja DAS-44406-6 foi desenvolvida através de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* a partir da soja convencional variedade Maverick. A soja DAS-44406-6 apresenta, integrada ao seu genoma, o inserto de T-DNA originado do plasmídeo pDAB8264, o qual contém os genes *2mepsps*, *aad-12* e *pat*. Tais genes codificam, respectivamente, as proteínas AAD-12, 2mEPSPS e PAT que conferem à soja DAS-44406-6 a tolerância aos herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, respectivamente.

O gene *aad-12*, é uma versão sintética do gene da ariloxialcanoato dioxigenase, originário da bactéria *Delftia acidovorans*. Este gene passou por um processo de otimização para melhorar a expressão em plantas. *D. acidovorans*, designada *Pseudomonas acidovorans* antes de 1987 e classificada como *Comamonas acidovorans* de 1987 a 1999, é uma bactéria estritamente aeróbica, gram-negativa, que ocorre no solo, em água corrente, em tratamento de esgoto e presente em espécimes clínicas. *D. acidovorans* pode ser usada para a transformação de ácido ferúlico em vanilina e outros metabólitos de sabor. Essa forma tradicional de utilização confirma o histórico de uso de *D. acidovorans* na indústria de processamento de alimentos. Esse processo foi patenteado nos Estados Unidos em julho de 1992 pela Kraft General Foods. *D. acidovorans*, como muitas outras bactérias de solo, é capaz de usar herbicida como fontes de carbono para se desenvolver, garantindo a esse microrganismo uma vantagem competitiva nessas condições.

A enzima AAD-12 é uma dioxigenase dependente de a-cetoglutarato que degrada o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), através da catálise de conversão de 2,4-D em 2,4-Diclorofenol (DCP), um composto sem atividade herbicida. A enzima AAD-12 também degrada herbicidas fenoxiacetato aquirais tais como MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético) e herbicidas piridiloxiacetato tais como triclopir e fluroxipir em seus fenóis inativos correspondentes.

Para se obter uma maior expressão de genes heterólogos em plantas, os pesquisadores da Dow AgroSciences modificaram a sequência codificadora dos genes doadores originais de forma que eles pudessem se expressar mais eficientemente em células vegetais. A versão otimizada do gene *aad-12* foi produzida modificando-se a proporção dos nucleotídeos G+C a um nível semelhante ao que ocorre em DNA de plantas visando melhorar a expressão desse gene em células vegetais. Essa modificação busca a utilização de códons mais frequentes em plantas, sem alterar a sequência proteica, favorecendo a utilização dos RNAs transportadores que ocorrem em plantas e, por consequência, otimizando a expressão gênica. As sequências de DNA do gene *aad-12* nativo e do gene *aad-12* otimizado apresentam 79,7% de identidade.

O gene *2mepsps* codifica uma enzima do tipo 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). A sequência codificadora do gene *2mepsps* foi originalmente isolada de milho (*Zea mays*) e fusionada a sequência codificadora de um peptídeo de trânsito para o cloroplasto, na porção N-terminal. O peptídeo de trânsito foi otimizado utilizando os peptídeos da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) de milho e girassol.

O gene *2mepsps* (também conhecido como *dmmg*, mEPSPS) foi introduzido em milho como fonte de tolerância ao glifosato no evento GA21 (identificado na OECD como MON-00021-9) e tem sido aprovado por agências de regulamentação de vários países, sendo considerado seguro para utilização em alimentos e rações e para o meio ambiente (USDA, 1997). Esse gene também foi empregado no algodão GlyTol™ (identificado na OECD como BCS-GH002-5), cujo evento foi aprovado pelo USDA APHIS em 2009 (USDA, 2009). Ele está presente também no evento de soja FG-72 (identificado na OECD como MST-FG072-3) que está atualmente em revisão por agência regulatória nos EUA (USDA APHIS como processo 09-328-01p). O gene *2mepsps* codifica a proteína 2mEPSPS que é uma versão da proteína EPSPS insensível ao herbicida glifosato, proporcionando assim tolerância ao glifosato em plantas.

### **Caracterização do OGM:**

A soja DAS-81419-2 foi desenvolvida através de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* a partir da soja convencional variedade Maverick. A soja DAS-81419-2 apresenta, integrada ao seu genoma, o inserto de T-DNA originado do plasmídeo pDAB9582, o qual contém os genes *cry1F*, *cry1Ac* e *pat*. Tais genes codificam, respectivamente, as proteínas CRY1F, CRY1Ac e PAT. As proteínas CRY1F e CRY1Ac proporcionam à soja DAS-81419-2 resistência a insetos enquanto a proteína PAT confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. A soja DAS-81419-2, à semelhança da soja convencional, não exhibe tendência a proliferar-se como erva daninha e não é invasiva em ecossistemas naturais. Nenhuma vantagem competitiva será proporcionada pelos genes *cry1Ac*, *cry1F* e *pat* introduzidos na soja DAS-81419-2, quando comparado à soja convencional. A soja DAS-81419-2 sofreu transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA101, utilizando o plasmídeo pDAB9582.

As proteínas CRY1F e CRY1Ac são originárias de *B. Thuringiensis*, uma bactéria gram positiva de solo, bastante comum, capaz de produzir esporos. Quando se encontra em condições de limitação de recursos esta bactéria esporula, produzindo cristais proteicos. As proteínas presentes nestes cristais são chamadas de endotoxinas CRY e vêm sendo utilizadas na agricultura por décadas como bioinseticidas contra grupos específicos de insetos.

As análises de Southern Blot para caracterização molecular confirmaram que uma única cópia dos eventos DAS-44406-6 e DAS-81419-2 está integrada no genoma da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2. Além disso, os eventos DAS-44406-6 e DAS-81419-2 apresentam uma cópia única de cada um dos elementos genéticos dos cassetes de expressão dos genes *aad-12*, *pat*, *2mepsps*, *cry1Ac* e *cry1F*. A integridade dos eventos DAS-44406-6 e DAS-81419-2 foi demonstrada em três gerações diferentes de cruzamentos, confirmando a estabilidade genética durante os procedimentos de melhoramento clássico de plantas. As análises de Southern Blot também confirmaram a ausência de sequências indesejadas de DNA, como as do plasmídeo original, na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2.

Foi conduzida análise por *Southern blot* foi conduzida na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 usando sondas específicas para os elementos genéticos *2mepsps*, *aad-12*, *cry1F*, *cry1Ac* e *pat*. Todos os padrões de hibridização gerados por cada sonda para a soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 foram idênticos àqueles dos eventos individuais correspondentes. Os resultados indicam que as estruturas dos insertos DAS-44406-6 e DAS-81419-2 na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não foram afetadas pela combinação dos eventos individuais através de cruzamento e manejo convencionais.

As observações ao longo das primeiras 5 gerações da soja DAS-44406-6 indicaram que a inserção dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* não produziram alterações na morfologia das plantas hospedeiras, e em características agronômicas, reprodutivas e na composição química e nutricional dos grãos e da forragem, indicando ausência de interações dos genes exógenos introduzidos e os genes endógenos do genoma receptor. Ao longo do trabalho de coleta de dados para demonstrar que a soja DAS-44406-6 é segura para a saúde humana, animal e para o meio ambiente, várias características das plantas geneticamente modificadas foram analisadas comparativamente à soja isolinha convencional. Nestas pesquisas um número grande de genes responsáveis por diversas características acaba sendo indiretamente avaliado, dando oportunidade para se detectar interações entre os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* e os genes da soja hospedeira. Entretanto, nenhuma alteração nas características estudadas foi observada nas várias gerações avaliadas.

Estudos realizados nos EUA e no Brasil envolveram a análise de caracteres fenotípicos, agronômicos, de composição de nutrientes, do efeito da soja DAS-44406-6 em características químicas e físicas do solo, da degradabilidade da matéria orgânica das plantas no solo e do efeito das plantas geneticamente modificadas no estado nutricional das plantas. Em todos esses estudos não foi detectado nenhuma diferença significativa entre a soja DAS-44406-6 e seu controle convencional de mesmo *background* genético, que poderia indicar a ocorrência de interações dos genes inseridos na soja DAS-44406-6 e demais genes do genoma com surgimento de efeitos pleiotrópicos e epistáticos detectáveis.

A soja DAS-81419-2 expressa as proteínas cristalizadas sintéticas com atividade inseticida CRY1Ac e CRY1F proveniente da bactéria que ocorre naturalmente no solo, *Bacillus thuringiensis*. As proteínas CRY1Ac e CRY1F protege a planta da soja Bt contra vários lepidópteros praga. Além disso, a soja DAS-81419-2 expressa o gene *pat* oriundo da bactéria de solo *Streptomyces viridochromogenes* que codifica a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT). A proteína PAT confere tolerância ao herbicida glufosinato e foi utilizada única e exclusivamente como um marcador de seleção durante o desenvolvimento da soja DAS-81419-2. Os transgenes contendo as proteínas de expressão CRY1Ac, CRY1F e PAT foram introduzidos na soja DAS-81419-2 através de transformação mediada por *Agrobacterium*.

As proteínas CRY1F, CRY1Ac e PAT não compartilham similaridades estruturais ou imunológicas significativas com sequências de aminoácidos de alérgenos ou de gliadinas conhecidas, portanto é muito baixa a probabilidade de que as proteínas CRY1F, CRY1Ac e PAT tenham reação imunológica cruzada com epítopos alergênicos). As sequências de aminoácidos dessa proteína não estão associadas à toxicidade ou alergenicidade, segundo os resultados da pesquisa no BLASTp. Conclui-se que as proteínas CRY1F, CRY1Ac e PAT não contêm sequência de aminoácidos com similaridades à sequências de proteínas tóxicas ou alergênicas a humanos e/ou animais.

Os resultados de expressão das proteínas AAD-12, 2mEPSs, PAT, CRY1Ac, CRY1F e PAT na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2, comparados com a expressão nos eventos simples, DAS-44406-6 e DAS-81419-2, mostram que os valores das proteínas nos vários tecidos da planta são correspondentes nos dois tipos de soja. Esses resultados corroboram com dados semelhantes obtidos para características fenotípicas, agronômicas, reprodutivas (item 2, Anexo IV do dossiê) e composicional (item 3, Anexo III do dossiê), indicando ausência de interação gênica na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 obtida por meio de cruzamento clássico dos eventos individuais em programa de melhoramento genético.

Foram realizados estudos de composição química e nutricional de forragem e grãos de soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 comparativamente semelhante ao cultivar convencional. Foram quantificados os teores de proteínas, fibras, minerais, aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, antinutrientes, isoflavonóides, etc. Os resultados comprovaram que a soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não difere da soja convencional em sua composição química e nutricional, exceto pela presença e expressão dos genes *aad-12*, *pat*, *2mepsps* que conferem tolerância aos herbicidas 2,4-D, glufosinato de amônio e glifosato, respectivamente, e dos genes *cry1Ac* e *cry1F*, que conferem resistência a lepidópteros praga.

As informações das características da planta geneticamente modificada coletadas durante os testes de campo, bem como das análises laboratoriais apresentadas no dossiê apresentado pela empresa confirmam os dados obtidos em várias regiões dos Estados Unidos e várias regiões do Brasil, como Goiás, Minas Gerais e São Paulo, comprovando que o cultivo e o consumo da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 é tão seguro ao meio ambiente e à saúde humana e animal quanto à soja convencional.

### Aspectos relacionados ao meio ambiente

As plantas de soja não apresentam polinização cruzada significativa, não possuem ancestrais selvagens no Brasil e não se comportam como plantas daninhas.

Não é esperada transferência horizontal dos genes *aad-12*, *2mepsps*, *cry1Ac*, *cry1F* e *pat* para a microbiota de solo, uma vez que não existe qualquer mecanismo conhecido ou demonstrado definitiva de que o DNA possa se transferir de plantas para microrganismos. Mesmo que uma transferência fosse feita, os genes *aad-12*, *2mepsps*, *cry1Ac*, *cry1F* e *pat* presentes na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não trariam nenhum risco à saúde dos organismos não alvo ou ao meio ambiente, com base nos dados de segurança apresentados nesta petição. Dessa forma, nenhum risco ao meio ambiente é esperado pelo cultivo da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2.

Não existe qualquer mecanismo conhecido ou demonstrado definitiva que o DNA possa se transferir de plantas para microrganismos. Mesmo que uma transferência pudesse ocorrer, os genes *aad-12*, *2mepsps*, *pat*, *cry1Ac* e *cry1F* presentes no evento DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não trariam nenhum risco à saúde das plantas ou ao meio ambiente, com base nos dados de segurança apresentados no Relatório de Biossegurança apresentado pela empresa. Ainda assim, por solicitação desta sub-comissão da CTNBio, a empresa enviou estudo de avaliação do efeito do cultivo da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2, da soja DAS-44406-6 e da soja DAS-81419-2 na comunidade de microrganismos do solo em diferentes localidades representativas do cultivo de soja no Brasil. Para melhor estimativa do efeito os experimentos foram realizados em regiões de clima e de solo distintas, em Unidades Operativas localizadas em Cascavel/PR, Restinga Seca/RS e Lucas do Rio Verde/MT. A metodologia usada para detectar possíveis efeitos de plantas geneticamente modificadas, ou seja, para detectar primariamente diferenças entre a soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 e a soja convencional na comunidade microbiana do solo, foram de análises de contagem de bactérias e fungos em placas, avaliação de biomassa de carbono, avaliação do número provável de amonificantes e celulolíticos e análises da enzima  $\beta$ -glicosidase e fosfatase ácida. O tratamento estatístico através da análise de variância (ANOVA) mostrou que o efeito da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 é similar ao efeito da soja convencional/comercial na comunidade de microrganismos do solo.

Não se espera hibridação introgressiva da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 com espécies no Brasil, uma vez que não existe no país qualquer espécie nativa, silvestre ou feral que possa inter cruzar com *Glycine max*. As únicas espécies silvestres que poderiam cruzar com a soja cultivada são do gênero *Glycine*, porém não ocorrem naturalmente no Brasil. Não há também nenhum centro de diversidade genética ou centro de origem da soja no Brasil.

No Brasil foram realizados estudos para verificar o impacto da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 nos principais grupos de artrópodes não alvo que podem ocorrer na cultura da soja. Para tanto, usou-se amostragem com armadilhas, com inspeção visual e com avaliação da mesofauna do solo. Os resultados mostraram que é possível afirmar que o evento DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não causa impacto negativo nas comunidades de artrópodes não alvo associados à cultura da soja.

Extensivos estudos comparativos da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 com sua correspondente convencional, para avaliação de caracteres agrônômicos, botânicos, reprodutivos, estudo composicional e impacto em organismos não alvo, com germoplasma avaliado em condições de clima temperado, tropical e subtropical, da América do Norte e Brasil, demonstram a similaridade dos dois produtos. Desta forma, através dos resultados desses estudos pode-se concluir que o evento DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não produz alterações significativas nas características botânicas, agrônômicas e composição nutricional das plantas que possam diferenciá-lo de seu correspondente convencional.

Pode-se, portanto, inferir que os possíveis efeitos da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 em organismos indicadores relevantes, simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores nos ecossistemas

onde se pretende cultivar o OGM não serão distintos dos efeitos que podem ocorrer com o cultivo de soja convencional.

Levando em consideração todos os resultados apresentados pela DOW AgroSciences dos eventos isolados e estaqueados num mesmo dossiê, que a soja DAS-44406-6 já foi aprovada por esta subcomissão em 2015 e a DAS-81419-2 foi aprovada por esta subcomissão em 2016, e mais ainda, considerando que a CTNBio avaliou os eventos isoladamente e emitiu parecer favorável à sua Liberação Comercial;

### **Aspectos relacionados à saúde humana e animal**

A soja tem uma ampla gama de usos, desde seu consumo direto por humanos e animais, como processado na forma de ingredientes alimentícios e como fonte de carboidrato e de proteína para fins industriais variados. Compreende uma excelente fonte de proteína e considera-se que aproximadamente 60 % de todos os produtos alimentícios contém derivados de soja.

A tosta e a moagem da torta de soja produzem o farelo, que é usado basicamente como suplemento rico em proteínas para a criação de gado, suínos e aves. A torta em si é o que permanece após a extração do óleo com solventes. Já o óleo de soja pode ser usado em saladas, na cozinha e para o preparo de frituras, além de ser matéria prima na produção de maionese, margarina, tintas de caneta, biodiesel, etc.

As análises de composição nutricional da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2, bem como de seus eventos singulares, em comparação com a soja convencional, mostram semelhanças entre os dois produtos com relação ao teor de proteínas, fibras, carboidratos, óleos, cinzas, minerais, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, metabólitos, antinutrientes e isoflavonas. A presença dos genes *cry1Ac* e *cry1F*, que conferem resistência aos lepidópteros praga, e dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat*, que conferem tolerância aos herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, respectivamente, não causa alterações na composição nutricional do OGM, além daquelas que podem ser causadas por fatores bióticos e abióticos na lavoura da soja convencional. Nenhuma homologia significativa foi observada entre as proteínas *CRY1F*, *CRY1Ac*, *AAD-12*, *2mEPSPS* e *PAT* com relação às proteínas conhecidas como alergênicas ou tóxicas.

Os níveis de antinutrientes e metabólitos secundários (lecitina, ácido fítico, rafinose, estaquiase e inibidor de tripsina) quando quantificados nas amostras de soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 foram estatisticamente semelhantes ( $P < 0,05$ ) à soja convencional com variação observada ocorrendo dentro de intervalos padrões relatados em literatura.

A proteína AAD-12: Análises por bioinformática não identificaram homologia significativa entre a sequência de aminoácidos da proteína AAD-12 e proteínas conhecidas por seu efeito alergênico, usando o critério de identidade de 8 ou mais aminoácidos contíguos ou superior a 35 % de identidade em trechos com 80 aminoácidos com alérgenos conhecidos. Da mesma maneira, a proteína AAD-12 não apresenta homologia significativa entre sua sequência de aminoácidos e sequências de proteínas conhecidas por seu efeito tóxico. A homologia dos aminoácidos foi analisada usando o método global de busca por similaridade no banco de dados não-redundante GenBank. A proteína AAD-12 é rapidamente digerida para valores abaixo dos níveis de detecção quando submetidas a fluidos gástricos simulados.

Testes de toxicidade aguda com ratos mostraram não haver mortalidade ou sinais clínicos em ratos CD-1 após administração oral da proteína AAD-12 na concentração de 2.000 mg de proteína por Kg de peso corporal. O estudo de exposição de humanos e animais à dieta contendo a proteína AAD-12 demonstrou uma ampla margem de exposição (MOE), indicando não haver qualquer preocupação com relação a efeitos adversos causados pela exposição à proteína através do consumo da soja DAS-44406-6.

Níveis de expressão da proteína AAD-12 em tecidos de plantas de soja DAS-44406-6 foram usados de forma conservadora nos dados de consumo alimentar humano de soja para estimar a exposição alimentar. A avaliação da exposição dietária revela grandes margens de valor de exposição (MOE) para a proteína AAD-12 na soja DAS-44406-6, indicando risco insignificante para efeitos adversos da exposição alimentar aguda.

O nível de expressão da proteína AAD-12 pela soja DAS-44406-6 foi medido através do teste ELISA específico, em vários tecidos e em vários estádios de desenvolvimento da soja (Maldonado, 2011a). Os dados

de expressão foram determinados em ensaios conduzidos em várias localidades dentro das regiões produtoras de soja nos Estados Unidos. A expressão da proteína foi analisada em tecidos de folha nos estádios V5 e V10-12, de raiz, em forragem, e em amostras de grãos de soja DAS-44406-6 sem tratamento com herbicida e tratada com os herbicidas 2,4-D, glufosinato e glifosato. Os resultados mostraram baixo nível de expressão da proteína AAD-12, com valores de expressão semelhantes em todos os tratamentos, independentemente da presença do herbicida, indicando um baixo risco de exposição aos seres humanos. Apenas a expressão da proteína no grão de soja é aplicável para consideração na dieta humana.

Rações para alimentação animal foram formuladas através do uso tradicional definido pela agência EPA e as estimativas de consumo são superdimensionadas, considerando 100 % de substituição do ingrediente à base de soja convencional por soja DAS-44406-6. A presença da proteína AAD-12 em tecidos de soja não deverá causar impacto nas quantidades de soja normalmente usadas na formulação das rações, uma vez que foi comprovada a equivalência da composição nutricional da soja DAS-44406-6 e da soja convencional.

As proteínas CRY1Ac e CRY1F - As análises por bioinformática não revelam qualquer homologia significativa entre a sequência de aminoácidos das proteínas CRY1Ac e CRY1F, e proteínas conhecidas com efeito tóxico ou alergênico. As proteínas CRY1Ac e CRY1F são rapidamente hidrolisadas em fluidos gástricos simulados, sendo inativadas após a exposição ao processamento térmico. Não há evidências de toxicidade aguda em ratos na dose de 2.000 mg/Kg de peso vivo. A análise de glicosilação não revelou ligações covalentes detectáveis entre carboidratos na proteína CRY1Ac e CRY1F expressa pela soja DAS-81419-2.

A proteína PAT - A proteína PAT (fosfinotricina acetiltransferase) é enzimaticamente ativa, mas tem uma alta especificidade para um substrato que não existe nem na planta de soja nem nas dietas animais e humanas, onde possa reagir. O gene *pat* foi obtido originalmente da cepa Tu494 da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*, a qual não possui potencial tóxico ou patogênico conhecido. O gene *pat* é utilizado há muito tempo como marcador seletivo para transformação vegetal, com registro de uso seguro de plantas portadoras deste gene, em vários países.

A proteína PAT produzida pela soja DAS-44406-6 é similar à produzida em outras plantas cultivadas transgênicas, já aprovadas para cultivo comercial (USDA 1996, USDA 2001, USDA 2004, USDA 2005).

Através de análises in silício, foi demonstrado que a proteína PAT não apresenta similaridade significativa de sequência com nenhuma proteína alergênica conhecida. Esta enzima assemelha-se apenas a outras acetiltransferases devido a seu domínio funcional, grupo este de enzimas sem evidências de estar relacionado à alergenicidade ou efeitos adversos a saúde humana e animal. Além disso, buscas em bancos de dados e ensaios bioquímicos determinaram que esta enzima não é modificada por glicosilação. Ensaio com fluidos digestivos mostraram que a proteína PAT é rapidamente digerida. Apenas alguns segundos foram suficientes para que extratos de enzimas digestivas (pepsina e pancreatina) digerirem completamente a proteína PAT.

A proteína PAT não apresenta riscos potenciais para a saúde humana segundo estudos de toxicidade oral aguda e de digestibilidade *in vitro*. A proteína PAT foi digerida a níveis não detectáveis dentro de 5 segundos posteriores à introdução em fluido gástrico simulado que continha pepsina, minimizando o potencial da proteína de ser absorvida pela mucosa intestinal ao ser consumida. Outros trabalhos já demonstraram que a proteína PAT é rapidamente desnaturada pelo calor ou por pH ácido.

Em estudo de toxicidade oral aguda, realizado por Brooks (2000), ratos foram alimentados com 6.000 mg/Kg de material de ensaio que continha aproximadamente 500 mg de proteína PAT/Kg de peso vivo. Não se registrou observações clínicas relacionadas com o tratamento.

A proteína 2mEPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase) é produzida na planta proporcionando tolerância ao herbicida glifosato. O gene *2mepsps* foi introduzido em milho como fonte de tolerância ao glifosato no evento GA21 e tem sido aprovado por agências de regulamentação de vários países, sendo considerado seguro para alimentos e rações e para o meio ambiente (identificado na OECD como MON-00021-9). O mesmo gene tem sido utilizado no algodão GlyTol™ (identificado na OECD como BCS-GH002-5), cujo evento encontra-se aprovado comercialmente no Brasil desde dezembro de 2010.

Análises por bioinformática não revelaram qualquer homologia significativa entre a sequência de aminoácidos da proteína 2mEPSPS e proteínas conhecidas por seu efeito tóxico ou alergênico. Nenhuma

homologia significativa foi identificada quando a sequência de aminoácidos da proteína 2mEPSPS foi comparada com alérgenos conhecidos através do programa FARRP (*Food Allergy Research Resource Program*) na versão 12.00 do *Allergen Database* (atualizada em fevereiro de 2012), usando o critério de identidade de 8 ou mais aminoácidos contíguos ou superior a 35 % de identidade em trechos com 80 aminoácidos com alérgenos conhecidos. Os resultados das comparações de sequências entre a proteína 2mEPSPS expressa na soja DAS-44406-6 e as proteínas do banco de dados confirmaram a inexistência de similaridade entre essa proteína e qualquer outra proteína considerada tóxica a humanos e/ou animais.

A proteína 2mEPSPS é rapidamente hidrolisada em fluidos gástricos simulados. Testes de toxicidade aguda com ratos mostraram não haver mortalidade ou sinais clínicos em ratos CD-1 após administração oral da proteína 2mEPSPS na concentração de 5.000 mg de proteína por Kg de peso corporal. A análise de glicosilação não revelou ligações covalentes detectáveis entre carboidratos na proteína 2mEPSPS expressa pela soja DAS-44406-6.

Da análise das informações apresentadas pelo proponente conclui-se que a soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não produz toxinas ou metabólitos que causem qualquer efeito adverso ao consumidor, animal ou humano diferente do que aqueles causados pela soja convencional. A equivalência substancial da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 comparativamente à soja convencional e a rápida desnaturação e degradação das proteínas AAD-12, 2mEPSPS, CRY1F, CRY1Ac e PAT durante o processamento garantem a segurança do consumo da soja GM e/ou dos produtos dele derivado.

Análises de composição nutricional da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 em comparação com a soja convencional mostram semelhança entre os dois produtos com relação ao teor de proteínas, fibras, carboidratos, óleos, cinzas, minerais, ácidos graxos, aminoácidos e vitaminas. Os níveis de antinutrientes e metabólitos secundários (lecitina, ácido fítico, rafinose, estaquiase e inibidor de tripsina) quando quantificados nas amostras de soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 foram estatisticamente semelhantes ( $P < 0,05$ ) a soja convencional com variação observada dentro de intervalos padrões relatados em literatura.

O potencial de toxicidade da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 foi avaliado em ratos alimentados por 90 dias com de farelo de soja transgênica e não transgênica. Os ratos machos e fêmeas alimentados com dietas formuladas com 10% ou 20% de farelo de soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não apresentaram efeitos associados com o tratamento transgênico em sinais clínicos, observações oftalmológicas, testes funcionais, atividades motoras, peso corpóreo / ganho de peso corpóreo, consumo alimentar, hematologia, tempo de protrombina, química clínica, uranálises, peso de órgãos e exames histopatológicos, quando comparados aos ratos machos e fêmeas alimentados com dietas contendo concentrações equivalentes de farelo de soja da isolinha (controle não transgênico). Nas condições deste estudo, a soja com o evento combinado DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não causou efeitos adversos em ratos machos ou fêmeas por, no mínimo, 90 dias da administração dietética, quando comparado aos ratos alimentados com dietas com 20% de soja isolinha ou com as sojas comerciais não transgênicas usadas como controle.

**Área de Restrição Ambiental:** 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”.

### **Parecer:**

Considerando que:

1. O evento DAS-44406-6 x DAS-81419-2 foi bem caracterizado molecularmente, tendo sido atestada a manutenção da integridade das construções gênicas herdadas dos respectivos parentais durante o processo de melhoramento genético clássico;
2. Não há indícios de interação entre as vias metabólicas em que atuam as proteínas *aad-12*, *2mepsps*, *pat*, *cry1Ac* e *cry1F*;
3. Não foram identificados efeitos pleiotrópicos ou epistáticos nos eventos parentais e no evento conjunto;
4. A expressão das proteínas *aad-12*, *2mepsps*, *pat*, *cry1Ac* e *cry1F* na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não é significativamente diferente da expressão observada nos eventos parentais separadamente;
5. Não há indícios de que as proteínas expressas possam causar alergia ou intoxicação em humanos e animais;

6. As avaliações agronômicas e de eficácia da soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 indicaram que a combinação destes eventos por métodos de melhoramento genético clássico (cruzamentos sexuais) não levou à expressão de qualquer outra característica diferente da esperada de resistência a insetos lepidópteros e tolerância aos herbicidas;
7. Não foram evidenciadas alterações morfológicas e fisiológicas na soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 que possam conferir vantagens adaptativas;
8. As demais análises de risco realizadas por países que já avaliaram a soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 e os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas no que tange a eventos combinados, concluiu:
9. Que o pedido atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança da saúde humana, animal, das plantas e do meio ambiente e concluiu que a soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 é substancialmente equivalente a soja convencional e não impõe riscos as plantas e ao meio ambiente.

## **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 soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 é tão segura quanto seu equivalente convencional. 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 soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 é substancialmente equivalente a soja convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, a CTNBio concluiu que a soja DAS-44406-6 x DAS-81419-2 não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à da soja 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.

**Data:** 03/08/2017

**Edivaldo Domingues Velini**

**Presidente da CTNBio**

Assessor Técnico

Orlando Cardoso

### Referências Bibliográficas:

- Borém, A. (1999). Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.10, p.101-107, 1999.
- Brooks, K.J., Yano, B.L., (2001). CryIac-(synpro) microbial protein: Acute oral toxicity study in CD-1 mice. Study ID 011126. Dow AgroSciences LLC.
- Calgene, Inc. (1993). Food additive petition for the APH(3') II as a processing aid FDA Docket Number: 93F-0232.
- Connor, A. J.; Glare, T. R.; Nap, J. P. (2003) The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal* 33:19-46. Cranston, H.J., Kern, A.J., Hackett, J.L., Miller, E.K., Maxwell, B.D., Dyer, W.E., 2001. Dicamba resistance in kochia. *Weed Science* 49, 164-170.
- EPA. (1995). Plant pesticide inert ingredient fosfotricina acetiltransferase (PAT) and the genetic material necessary for its production (plasmid vector pCIBP3064) in corn; tolerance exemption. *Fed. Reg.*; 60, 158, pp. 42450-42453.
- FDA. (1994). Food and Drug Administration, Secondary Direct Food Additives Permitted in food for Human Consumption; Food Additives Permitted in Feed and Drinking Water of Animals Aminoglycoside 3' - phosphotransferase II. *Federal Register* 59:26700-26711, 1994.
- Herman, R.A., Gao, Y., (2001). Thermolability of cry Iac(synpro ) delta-endotoxin. GH-C 5281. Dow AgroSciences LLC.
- Herouet, C.; Esdaile, D. J.; Mallyon, B. A.; Debruyne, E.; Schulz, A.; Currier, T.; Hendrickx, K.; van der Klis, R-J.; Rouan, D. (2005). Safety evaluation of the fosfotricina acetiltransferase proteins encoded by pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41: 134-139.
- Korjagin, V.A., (2001). *In vitro* simulated gastric fluid digestibility study of microbially derived cryIac (synpro). Study ID 010026. Dow AgroSciences LLC.
- Korjagin, V.A., (2002). *In vitro* simulated gastric fluid digestibility study of microbially derived cryIF (synpro). Study ID 040097. Dow AgroSciences LLC.
- Korjagin, V.A., (2004). *In vitro* simulated gastric fluid digestibility study of microbially derived PAT. Study ID 040097. Dow AgroSciences LLC.
- Labuda, I.M., Goers, S.K., Koen, K.A., (1992). Bioconversion process for the production of vanillin. U.S. Patent No. 5,128,253.
- Lebrun, M., Leroux, B., Sailland, A., (1996). Chimeric gene for the transformation of plants. U.S. Patent No. 5,510,471.
- Lebrun, M., Sailland, A., Freyssinet, M., Degryse, E., (2003). Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. U.S. Patent No. 6,566,587.

**Mao, et al, (2017). A 52-week safety study in cynomolgus macaques for genetically modified rice expressing Cry1Ab/1Ac protein. [Food Chem Toxicol.](#) 2016 Sep;95:1-11. doi: 10.1016/j.fct.2016.06.015**

Miyasaka, S. & Medina, J. C. (1981). A soja no Brasil. Campinas: Editora ITAL. 1062p.

Müller, R.H., Jorks, S., Kleinstauber, S., Babel, W., (1999). Comamonas acidovorans strain MC1: A new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. Microbiological Research 154, 241-246.

Prins, T. W. & Zadoks, J. C. (1994). Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a literature review. Euphytica 76:133-138. 1994.

Rao, S.R., Ravishankar, G.A., (2000). Vanilla flavour: Production by conventional and biotechnological routes. Journal of the Science of Food and Agriculture 80, 289-304.

Redenbaugh, K.; Hiatt, W.; Martineau, B.; Linfrman, J. & Emlay, D. (1994). Aminoglycoside 3'phosphotransferase II (aph (3')II): review of its safety and use the production of genetically engineered plants. Food Biotechnology 8 137-165, 1994

Romeis, J.; Meissle, M; Bigler, F. (2006). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nature Biotechnology. 24(1): 63-71.

Schlüter, K.; Futterer, J. & Potrykus, I. (1995). "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs - if *et al* - at an extremely low frequency. Bio/Technology 13:1094-1098. (1995).

Schlutter, T.H.; Potting, R.P.J.; Denholm, I.; Poppy, G.M. (1995). Parasitoid behaviour and *Bt* plants.

Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin E, R., (2006). Food biotechnology. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton, FL.

Tamaoka, J., Ha, D.M., Komagata, K., (1987). Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* marcus and talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. Nov. And *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 37, 52-59.

.Toms, A., Wood, J.M., (1970). The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. Biochemistry 9, 337-343.

USDA, (1997). Availability of determination of nonregulated status for genetically engineered corn line. Federal Register 62 (234): 64350-64351. [www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs2/97\\_09901p\\_com.pdf](http://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs2/97_09901p_com.pdf).

USDA, (2009). Determination of nonregulated status for cotton genetically engineered for glyphosate herbicide tolerance. Federal Register 74 (98): 23987-23988. <http://edocket.access.gpo.gov/2009/E9-11972.htm>.

Verneti, F. J. (1983). Soja - planta, clima, pragas, moléstias e invasoras - vol I, genética e melhoramento - vol. II. Campinas: Fundação Cargill, 990p.

Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., Sly, L.I., (1999). Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and

Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 567-576.

Westendorf, A., Benndorf, D., Müller, R.H., Babel, W., (2002). The two enantiospecific dichlorprop/alpha-ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1: Protein and sequence data of rdpa and sdpa. Microbiological Research 157, 317-322.

Westendorf, A., Müller, R.H., Babel, W., (2003). Purification and characterisation of the enantiospecific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides. Acta Biotechnologica 23, 3-17.

WHO - World Health Organization. (1993). "Health Aspects of Marker Genes in Genetically Modified Plants." Report of the WHO *Workshop* held in Copenhagen, Denmark on September 1993.

WHO. (1993). Health Aspects of Marker Genes ins Genetically Modidied Plants. World Health Organization Food Safety, Geneva, Switzerland, 32 pp. 1993.

Wright, T. R.; Lira, J. M.; Merlo, D. J., Hopkins, N. (2005). Dow AgroSciences LLC. Novel Herbicide Resistance Genes. U.S. Patent Application Publication # WO/2005/107437.

Wright, T.R., Shan, G., Walsh, T.A., Lira, J.M., Cui, C., Song, P., Zhuang, M., Arnold, N.L., Lin, G., Yau, K., Russell, S.M., Cicchillo, R.M., Peterson, M.A., Simpson, D.M., Zhou, N., Ponsamuel, J., Zhang, Z., (2010). Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 20240-20245.

## Deliberação

A CTNBio decidiu por 16 (dezesseis votos favoráveis pela aprovação e três votos contrários: Dr. João Dagoberto dos Santos (Especialista Suplente em Agricultura Familiar); Dr. Isaque Medeiros Siqueira (Representante Suplente do Ministério do Meio Ambiente) e Dr. Mohamed Ezz El-Din Mostafa Habib (Especialista Titular em Meio Ambiente)



Documento assinado eletronicamente por **Edivaldo Domingues Velini, Pesquisador**, em 07/09/2017, às 18:25, conforme art. 3º, III, "b", das Portarias MC nº 89/2014 e MCTIC nº 34/2016.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **2154001** e o código CRC **23E33A62**.