

**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA****PARECER TÉCNICO Nº 1552/2023/SEI-CTNBio - Membros****PARECER RELATOR 8762/2023**

Processo: 01245.009196/2023-92

Data de Protocolo: 08/05/2023

Assunto: Liberação Comercial da soja MON 94637

Requerente: A Monsanto do Brasil Ltda

CQB: 03/96

Classificação: Classe de Risco I

Extrato Prévio: 8894/2023

Decisão: DEFERIDO

Reunião: 266a. Reunião ordinária ocorrida em 09/11/2023

I - Identificação do OGM

Designação do OGM: Soja geneticamente modificada resistente a insetos

Espécie: *Glycine max*

Característica Inserida: resistência a insetos

Classificação de risco do OGM: Classe de risco 1

Método de introdução da característica: transformação mediada por *Agrobacterium*

Uso proposto: liberação no meio ambiente, uso na alimentação humana e animal, seu uso comercial, e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e quaisquer progênies dele derivadas

II. Informações Gerais

A soja resistente a insetos MON 94637 contém os genes cry1A.2 e cry1B.2 de *Bacillus thuringiensis*, os quais codificam as proteínas inseticidas Cry1A.2 e Cry1B.2 que conferem proteção contra danos alimentares causados por insetos lepidópteros na cultura da soja. A soja MON 94637 se encontra em fase de avaliação por outras agências regulatórias nos Estados Unidos desde dezembro de 2022, bem como no Canadá e no Japão, desde abril de 2023.

A soja MON 94637 foi produzida pela metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium* utilizando o plasmídeo PV-GMIR527237. Este plasmídeo tem aproximadamente 26,6 kb e contém dois DNAs de transferência (T-DNA), cada qual delimitado pelas regiões de extremidade direita e esquerda. O T-DNA I contém os cassetes de expressão Cry1A.2 e Cry1B.2 e o T-DNA II contém os cassetes de expressão *splA* e *aadA*.

A caracterização da inserção do DNA na soja MON 94637 foi realizada usando uma combinação de sequenciamento, reação em cadeia da polimerase (PCR) e bioinformática. Os resultados desta caracterização demonstraram que a soja MON 94637 possui apenas uma cópia do T-DNA I pretendido, a qual contém os cassetes de expressão Cry1A.2 e Cry1B.2 que são herdados de forma estável ao longo de várias gerações e segregados de acordo com os princípios das Leis de Mendel.

Uma avaliação dos potenciais impactos da soja MON 94637 em organismos não alvo foi realizada como parte da avaliação de risco ambiental. Características fenotípicas e agrônomicas, bem como interações ambientais, como respostas de plantas a estresses abióticos, doenças e artrópodes-praga foram avaliadas no Brasil durante a safra 2021/2022. A abundância de organismos não alvo também foi avaliada.

As informações bioquímicas e os dados experimentais gerados com a soja MON 94637 incluíram modo de ação, caracterização molecular, avaliação da segurança das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2, composição nutricional, avaliação de interações ambientais e avaliação agrônômica e fenotípica. Tomados em conjunto, esses dados suportam a conclusão de que a soja MON 94637 não possui mecanismo plausível para causar efeitos adversos sobre os organismos não alvo, nem representa um risco adicional para organismos benéficos para a agricultura em comparação com a soja convencional.

Genes introduzidos e respectivos organismos de origem:

O plasmídeo PV-GMIR527237 tem aproximadamente 26,6 kb e contém dois T-DNAs separados, cada um delimitado pelas regiões da extremidade direita e esquerda e sequências da matriz do plasmídeo. O primeiro T-DNA, designado T-DNA I, contém os cassetes de expressão *cry1A.2* e *cry1B.2*.

A) Gene *cry1A.2*

O gene *cry1A.2* na soja MON 94637 codifica a proteína Cry1A.2 de 135 kDa que consiste em um único polipeptídeo de 1189 aminoácidos. A sequência codificadora *cry1A.2* consiste na sequência codificadora do Domínio I da proteína Cry1Ah, Domínio II e Domínio C-terminal da proteína Cry1Ac e Domínio III da proteína Cry1Ac de várias subespécies da bactéria do solo *B. thuringiensis*. A expressão da proteína Cry1A.2 confere proteção contra lepidópteros-praga na soja MON 94637.

B) Gene *cry1B.2*

O gene *cry1B.2* na soja MON 94637 codifica a proteína Cry1B.2 de 135 kDa que consiste em um único polipeptídeo de 1187 aminoácidos. A sequência codificadora *cry1B.2* consiste na sequência codificadora dos Domínios I e II da proteína Cry1Be, Domínio III da proteína Cry1Ka e do Domínio C-terminal da proteína Cry1Ab de várias subespécies da bactéria do solo *B. thuringiensis*. A expressão da proteína Cry1B.2 confere proteção contra lepidópteros-praga na soja MON 94637.

A proteína Cry1A.2 na soja MON 94637 é uma proteína que compreende um único polipeptídeo de 1189 aminoácidos com massa molecular aparente de aproximadamente 135 kDa. Como outras proteínas Cry, a Cry1A.2 é sintetizada primeiro como uma prototoxina que, após exposição ao intestino médio do organismo alvo, é clivada por enzimas digestivas para produzir uma proteína ativada de aproximadamente 60 kDa (Bravo et al., 2007). A Cry1A.2 é uma proteína quimérica que contém domínios derivados de proteínas Cry1 do tipo selvagem das subclasses Cry1A e Cry1C, especificamente, Domínio I da proteína Cry1Ah, do Domínio II e do Domínio de protoxina C-terminal da proteína Cry1Ac e do Domínio III da proteína Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*. Todos os domínios são 100% idênticos aos domínios da proteína de origem.

A proteína Cry1A.2 foi projetada utilizando uma estratégia de troca de domínios para alcançar altos níveis de atividade contra lepidópteros-praga alvo. A troca de domínios é um mecanismo bem conhecido na natureza, resultando em diversidades de proteínas Cry em atividade funcional que foram amplamente descritas na literatura (de Maagd et al., 2001; de Maagd et al., 2003). Ao utilizar ferramentas moleculares modernas, uma

estratégia de troca de domínios foi usada anteriormente com sucesso para alterar os domínios funcionais das proteínas Cry1 com o objetivo de desenvolver biopesticidas microbianos com especificidade aprimorada para lepidópteros-praga.

A proteína Cry1B.2 na soja MON 94637 é uma proteína que compreende um único polipeptídeo de 1187 aminoácidos, com massa molecular aparente de aproximadamente 135 kDa. Como outras proteínas Cry, ela é sintetizada primeiro como uma prototoxina que, após exposição ao intestino médio de organismos alvo, é clivada por enzimas digestivas para produzir uma proteína ativada de aproximadamente 60 kDa (Bravo et al., 2007). A proteína Cry1B.2 é uma proteína quimérica que contém domínios derivados de proteínas Cry1 do tipo selvagem das subclasses Cry1A, Cry1B e Cry1K, especificamente, Domínios I e II da proteína Cry1Be, do Domínio III da proteína Cry1Ka2 e do Domínio de prototoxina C-terminal da proteína Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*. Todos os domínios são 100% idênticos aos domínios da proteína de origem. As proteínas Cry1A, Cry1C, Cry1B e Cry1K são de uma família de proteínas inseticidas derivadas de várias subespécies da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* que tem sido amplamente utilizada na formulação de biopesticidas comerciais.

O cassete de expressão *cry1A.2* é regulado pelo promotor *ubq10-At1* de *Arabidopsis thaliana* e pela região 3' UTR *Zfp-Mt1* de *Medicago truncatula*. O cassete de expressão *cry1B.2* é regulado pelo promotor *Cab-Cm1* de *Cucumis melo* (melão) e pela região 3' UTR *Lox-Mt1* de *Medicago truncatula*.

O segundo T-DNA, designado T-DNA II, contém os cassetes de expressão *splA* e *aadA*.

C) Gene *splA* - Quando o gene *splA* é expresso durante o desenvolvimento do embrião, ele interfere no metabolismo da sacarose, levando a um fenótipo de semente enrugada reconhecível que fornece uma demonstração visual de que o T-DNA II está presente (Piper et al., 1999).

D) Gene *aadA* - A expressão do gene *aadA* fornece resistência a antibióticos e é um segundo método para selecionar os transformantes portadores do T-DNA II.

O cassete de expressão *splA* é regulado pelo promotor *Usp* de *Vicia faba* (fava) e pela região 3' UTR nos de *Agrobacterium tumefaciens*. O cassete de expressão *aadA* é regulado pelo enhancer FMV do vírus do mosaico da figueira, promotor *EF-1α* de *A. thaliana*, sequência alvo CTP2 de *A. thaliana* e região 3' UTR E9 de *Pisum sativum* (ervilha).

Além disso, o plasmídeo PV-GMIR527237 contém duas origens de replicação para sua manutenção em bactérias (*ori-pRi*, *ori-pBR322*), um gene marcador de seleção bacteriano (*nptII*) controlado por um promotor do operon do RNA ribossômico de *A. tumefaciens* que conduz a transcrição em células vegetais, uma porção não funcional do gene marcador de seleção bacteriano *ble1* e uma sequência codificadora da proteína repressora do iniciador (ROP) para a manutenção do número de cópias do plasmídeo em *Escherichia coli*.

Durante a transformação, ambos os T-DNAs foram inserido.s no genoma da soja. Após a transformação, métodos de segregação, separação e seleção foram usados para isolar as plantas que continham apenas o T-DNA I com os cassetes de expressão *cry1A.2* e *cry1B.2* e que não continham o T-DNA II com os genes marcadores de seleção *splA* e *aadA* e/ou sequências da matriz do plasmídeo.

Após co-cultura com a cepa AB30 de *Agrobacterium* portadora do plasmídeo, os explantes de meristema foram colocados em meio de seleção contendo espectinomicina para seleção dos eventos geneticamente modificados e carbenicilina, cefotaxima e timentin para inibir o supercrescimento de *Agrobacterium*. As plantas transgênicas putativas (R0) com características fenotípicas normais foram separadas e selecionadas usando ensaio de número de cópias e análise de ligação. Eventos que passaram nos critérios de avanço (como uma única cópia da inserção do T-DNA I não ligada aos marcadores de seleção (T-DNA II), ausência da matriz do plasmídeo, inserção que não ocorreu em regiões repetitivas ou sequências de genes) foram selecionados e transferidos para o solo para crescimento e posterior avaliação.

Como é típico de um processo de produção e seleção de eventos comerciais, centenas de diferentes eventos de transformação (regenerantes) foram gerados em laboratório usando o vetor PV-GMIR527237. Após cuidadosa seleção e avaliação desses eventos em laboratório, casa de vegetação e campo, a soja MON 94637 foi selecionada como o principal evento com base na sua eficácia superior, características agrônômicas, fenotípicas e moleculares. Estudos com a soja MON 94637 foram realizados para melhor caracterizar a

inserção genética e os produtos expressos, além de estabelecer a segurança alimentar e o risco ambiental inalterado em comparação com a soja comercial.

Caracterização molecular e estabilidade do inserto no organismo receptor

Os DNAs genômicos da soja MON 94637 e da soja controle convencional foram sequenciados usando a metodologia de sequenciamento de próxima geração (do inglês, *Next Generation Sequencing* - NGS), que produz um grupo de leituras de sequência curtas e distribuídas ao acaso e que recobrem o genoma de maneira completa. Utilizando essas sequências genômicas, a ferramenta de bioinformática foi usada para identificar todas as leituras de sequências que foram significativamente similares ao plasmídeo de transformação. Essas leituras capturadas foram então mapeadas e analisadas para determinar a presença/ausência de sequências da matriz do plasmídeo de transformação ou do T-DNA II, identificar junções do inserto e determinar o número de insertos e cópias. Produtos de PCR sobrepostos foram também produzidos recobrando qualquer inserto e seus loci selvagens. Esses produtos de PCR sobrepostos foram sequenciados para fornecer uma caracterização detalhada do DNA inserido e do local de inserção.

Os dados da caracterização da modificação genética na soja MON 94637 demonstram que uma única cópia do T-DNA I foi integrada de forma estável em um único locus do seu genoma e que nenhuma sequência da matriz do plasmídeo PV-GMIR527237 ou sequências do T-DNA II estão presentes na soja MON 94637.

A organização genômica no local da inserção na soja MON 94637 foi avaliada comparando as sequências que flanqueiam a inserção do T-DNA I na soja MON 94637 com a sequência do local da inserção na soja convencional. Esta análise identificou uma deleção de 14 pb que provavelmente ocorreu durante a integração do T-DNA I. O restante das sequências de DNA genômico de soja avaliadas que flanqueiam a inserção na soja MON 94637 são idênticos ao controle convencional. Os resultados indicaram que nenhum elemento endógeno foi interrompido no local de inserção e que o T-DNA I está localizado no cromossomo 19 do genoma da soja MON 94637.

Durante o desenvolvimento das linhagens da soja MON 94637, os dados de segregação genotípica foram registrados para avaliar a herança e a estabilidade do T-DNA I usando análise de qui-quadrado (χ^2) ao longo de várias gerações. O valor de χ^2 nas gerações F2, F3 e F4 não indicou nenhuma diferença significativa entre as razões de segregação observadas e esperadas do T-DNA I. Esses resultados apoiam a conclusão de que o T-DNA I reside em um único locus dentro do genoma da soja e é herdado de acordo com os princípios de herança mendeliana. Esses resultados também são consistentes com os dados de caracterização molecular que indicam que a soja MON 94637 contém uma única cópia intacta do T-DNA I inserida em um único locus no genoma da soja.

III - Avaliação de segurança alimentar

Os níveis de expressão das proteínas na soja MON 94637 foram usados para avaliar a exposição às proteínas introduzidas por meio da ingestão de alimentos ou rações para alimentação animal e a potencial exposição ambiental. Os níveis de expressão das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 foram determinados usando um ensaio imunoenzimático ELISA nos seguintes tecidos: flores, forragem, folhas, raízes e grãos. Os tecidos da soja MON 94637 foram coletados de quatro parcelas replicadas durante a safra 2021 em cinco locais nos Estados Unidos (Clinton County, Illinois, Warren County, Illinois, Ingham County, Michigan, York County, Nebraska e Miami County, Ohio).

O nível médio da proteína Cry1A.2 na soja MON 94637 em todos os locais foi mais alto em flores a 260 $\mu\text{g/g}$ de massa seca (ms) e o mais baixo em raízes a 9,8 $\mu\text{g/g}$ ms. O nível médio de proteína Cry1A.2 nos grãos da soja MON 94637 foi de 24 $\mu\text{g/g}$ ms. O nível médio de proteína Cry1B.2 na soja MON 94637 em todos os locais foi mais alto em folhas a 590 $\mu\text{g/g}$ ms e o mais baixo em raízes a <LOQ. O nível médio de proteína Cry1B.2 no grão da soja MON 94637 foi de 12 $\mu\text{g/g}$ ms.

Comparações quanto a composição química e nutricional:

Um estudo foi realizado com o objetivo de comparar a composição da soja MON 94637 com a composição da soja controle convencional com *background* genético igual (Klusmeyer et al., 2022). As amostras de grãos

e forragem foram colhidas da soja MON 94637 e da soja controle convencional cultivadas em cinco locais nos Estados Unidos (Clinton County, Illinois; Warren County, Illinois; Ingham County, Michigan; York County, Nebraska e Miami County, Ohio) durante a safra 2021. Os ensaios de campo foram plantados em um delineamento experimental de blocos casualizados com quatro repetições por local. A soja MON 94637 e a soja controle convencional foram cultivadas em condições agronômicas de campo típicas para cada uma das diferentes regiões de cultivo.

A comparação estatística entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional foi baseada nos dados de composição combinados entre os cinco locais (análise combinada). As diferenças significativas foram identificadas ao nível de 5% de significância ($\alpha = 0,05$). É importante ressaltar que uma diferença significativa entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional não necessariamente implica em relevância biológica da perspectiva de segurança alimentar.

No total, 66 componentes diferentes foram analisados. Desses, 11 componentes tiveram mais de 50% das observações abaixo do limite de quantificação do ensaio (LOQ) e foram excluídos da análise estatística. Os valores de umidade para grãos e forragem foram quantificados para a conversão dos componentes em massa seca (ms), mas não foram analisados estatisticamente. Portanto, 53 componentes das amostras de grãos e forragens foram avaliados estatisticamente usando um método de análise de variância de modelo misto.

Dos 53 componentes avaliados estatisticamente, 48 não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional. Um total de 3 componentes (ácido palmitoleico, ácido heptadecanoico e ácido behênico) nos grãos e 2 componentes (proteína e carboidratos por cálculo) na forragem mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional. Para esses componentes, a diferença média nos valores dos componentes entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional foi menor do que o intervalo dos valores da soja controle convencional. Além disso, os valores médios dos componentes da soja MON 94637 estavam dentro do intervalo dos valores observados na literatura e/ou AFSI CCDB (AFSI Crop Composition Database).

Esses resultados apoiam a conclusão geral de que a soja MON 94637 não foi o maior contribuinte para a variação nos níveis dos componentes analisados em grãos ou forragem e confirmaram a equivalência composicional a soja MON 94637 e a soja controle convencional nos níveis desses componentes. As diferenças significativas observadas não foram composicionalmente significativas do ponto de vista da segurança alimentar.

Potencial de toxicidade e alergenicidade das novas proteínas expressas

O grão colhido é o tecido mais relevante analisado para uma avaliação de alergenicidade, pois os alimentos derivados do grão da soja podem ser consumidos diretamente. O nível médio de proteína Cry1A.2 em grãos da soja MON 94637 é de 24 $\mu\text{g/g}$ ms. A porcentagem média de massa seca da proteína total em grãos da soja MON 94637 é de 39,25% (ou 392.500 $\mu\text{g/g}$). A porcentagem da proteína Cry1A.2 nos grãos da soja MON 94637 é de 61,15 ppm de proteína total do grão.

O nível médio de proteína Cry1B.2 em grãos da soja MON 94637 é de 12 $\mu\text{g/g}$ ms. A porcentagem média de massa seca da proteína total em grãos da soja MON 94637 é de 39,25% (ou 392.500 $\mu\text{g/g}$). A porcentagem da proteína Cry1B.2 nos grãos da soja MON 94637 é de 30,57 ppm de proteína total do grão.

Portanto, as proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 representam uma porção muito pequena da proteína total nos grãos da soja MON 94637. Esse baixo percentual das proteínas em relação à proteína total reduz o risco potencial de alergenicidade das mesmas.

A extensão da similaridade de sequência entre as proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 e alérgenos conhecidos, gliadinas e gluteninas foi avaliada usando a ferramenta de alinhamento de sequência FASTA juntamente com uma pesquisa de janela deslizante de oito aminoácidos.

Os resultados de bioinformática demonstraram não haver similaridade biologicamente relevante com sequências de alérgenos quando as sequências das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 foram consultadas na análise com o programa FASTA do banco de dados AD_2022. Nenhum alinhamento atingiu ou excedeu o limite de 35% de identidade acima de 80 aminoácidos como recomendado pelo Codex Alimentarius (2009) ou teve um E-score menor ou igual a 1×10^{-5} .

Além disso, nenhuma correspondência polipeptídica curta (oito aminoácidos) foi compartilhada entre as sequências das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 e as proteínas no banco de dados de alérgenos. Estes dados mostram que as sequências das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 não possuem similaridade estrutural e imunologicamente relevante com alérgenos conhecidos, gliadinas e gluteninas.

Uma pesquisa de bioinformática de alinhamento FASTA foi realizada usando a sequência de aminoácidos das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 e um banco de dados de toxinas para identificar uma possível homologia com proteínas que pudessem ser prejudiciais à saúde humana e animal.

Os resultados das análises de bioinformática demonstraram que não existe nenhuma similaridade estrutural relevante entre as proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 e qualquer sequência do banco de dados TOX_2022 (toxicidade) pois, nenhum alinhamento exibindo um E-score $<1 \times 10^{-5}$ foi observado.

Ainda, não houve evidência de toxicidade aguda em camundongos quando administradas as proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 por via oral a 5.000 mg/kg de massa corporal (Good, 2022; 2023).

Termoestabilidade e a resistência da proteína à digestão com pepsina ou fluidos gástrico e intestinal simulados (SGF/SIF):

A capacidade de degradação das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 por pepsina, pancreatina e digestão sequencial foi avaliada.

Com relação a proteína Cry1A.2, os resultados mostraram que pelo menos 99,4% da proteína Cry1A.2 intacta foi degradada por pepsina em 0,5 minuto quando analisada por SDS-PAGE e 99,4% da proteína Cry1A.2 intacta foi degradada por pepsina em 0,5 minuto quando analisada por *Western blot* utilizando um anticorpo específico para Cry1A.2. A análise de SDS-PAGE mostrou que fragmentos peptídicos entre 3,5 a 6 kDa foram observados ao longo dos 60 minutos de digestão com pepsina. Pelo menos 90% da proteína Cry1A.2 intacta foi degradada por pancreatina em 5 minutos quando analisada por *Western blot*. Os fragmentos da proteína Cry1A.2 foram digeridos em 0,5 minuto quando incubados com pepsina seguida de pancreatina. Estes resultados mostram que a proteína Cry1A.2 completa é rapidamente degradada por pepsina e pancreatina, e que os fragmentos também são rapidamente degradados por pepsina seguida pela pancreatina.

Quanto à proteína Cry1B.2, os resultados mostraram que pelo menos 99,4% da proteína Cry1B.2 intacta foi degradada por pepsina em 0,5 minuto quando analisada por SDS-PAGE e 87,5% da proteína Cry1B.2 intacta foi degradada por pepsina em 0,5 minuto quando analisada por *Western blot* utilizando um anticorpo específico para Cry1B.2. A análise de SDS-PAGE mostrou que fragmentos peptídicos de ~4 kDa foram observados durante os 60 minutos de digestão com pepsina. Pelo menos 87,5% da proteína Cry1B.2 intacta foi degradada por pancreatina em 5 minutos quando analisada por *Western blot*. Os fragmentos da proteína Cry1B.2 foram digeridos em 0,5 minuto quando incubados com pepsina seguida de pancreatina. Estes resultados mostram que a proteína Cry1B.2 completa é rapidamente degradada por pepsina e pancreatina, e que os fragmentos também são rapidamente degradados pela pepsina seguida pela pancreatina.

A rápida degradação das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 intactas apenas por pepsina ou pancreatina e a rápida degradação de seus fragmentos por digestão sequencial usando pepsina seguida de pancreatina indicam que é altamente improvável que as proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 representem qualquer risco de segurança alimentar para a saúde humana ou animal.

O efeito do tratamento térmico na atividade das proteínas foi avaliado usando as proteínas purificadas. Amostras das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 tratadas termicamente e uma amostra controle sem aquecimento foram analisadas: 1) usando um ensaio funcional para avaliar o impacto da temperatura na atividade enzimática das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2; e 2) usando SDS-PAGE para avaliar o impacto da temperatura na integridade das proteínas.

Os resultados demonstram que a proteína Cry1A.2 e Cry1B.2 se comportam com uma tendência previsível de desnaturação proteica e perda de atividade funcional em temperaturas elevadas. Portanto, é razoável concluir que tais proteínas não seriam consumidas como uma proteínas ativas em produtos alimentícios ou rações derivados da soja MON 94637, devido a práticas de processamento padrão que incluem tratamento térmico (Hammond e Jez, 2011).

IV - Avaliação de segurança ambiental.

Avaliação de características agronômicas e fenotípicas, e interações ambientais da soja MON 94637

Experimentos de campo para avaliar características agronômicas e fenotípicas, e interações ambientais da soja MON 94637, em comparação à soja controle convencional e às referências comerciais, foram conduzidos durante a safra 2021/2022 em seis locais no Brasil (Verardino, 2023a). As Estações Experimentais onde esse estudo foi conduzido foram: Luís Eduardo Magalhães, BA (BALM); Cachoeira Dourada, MG (MGCH); Sorriso, MT (MTSO); Rolândia, PR (PRRO); Não-Me-Toque, RS (RSNM); e Santa Cruz das Palmeiras, SP (SPSD). As identidades da soja MON 94637 e da soja controle convencional foram confirmadas por análises de PCR evento-específica e as referências comerciais foram identificadas por meio da etiqueta do fabricante. Assim, a presença dos genes *cry1A.2* e *cry1B.2* foi devidamente certificada na soja MON 94637.

Avaliações de estresses foram realizadas em quatro tempos distintos (final do estágio vegetativo - R1, R2-R3, R4-R5 e R6-R7), sendo que os estresses foram classificados como doenças e presença de artrópodes não alvo (bióticos) e estresses abióticos. As doenças avaliadas foram antracnose, ferrugem asiática, crestamento bacteriano, septoriose, míldio, mancha olho de rã, cercosporiose, fitóftora, oídio, mancha alvo e mofo branco. Os artrópodes avaliados foram, ácaro, tamanduá-da-soja, percevejos, tripes e mosca branca. Os estresses abióticos avaliados foram seca, granizo, deficiência nutricional, solo compactado, calor / escaldadura, solo encharcado e vento. Referente às doenças avaliadas, 72 observações foram realizadas nos locais estudados e diferenças qualitativas não foram detectadas entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional. Referente aos artrópodes não alvo, 45 observações foram realizadas nos locais estudados e diferenças qualitativas não foram detectadas entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional. Referente aos estresses abióticos, 72 observações foram realizadas nos locais estudados e diferenças qualitativas não foram detectadas entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional.

Um estudo foi realizado para avaliar a viabilidade e morfologia do pólen coletado na soja MON 94637, na soja controle convencional e em quatro referências comerciais cultivadas sob condições agronômicas semelhantes em York County, Nebraska, nos Estados Unidos em 2019, uma área geográfica que representa as condições ambientais relevantes para a produção de soja. Nenhuma diferença significativa ($\alpha = 0,05$) foi detectada entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional para porcentagem de pólen viável e diâmetro do pólen. Além disso, nenhuma diferença visual na morfologia geral do pólen foi observada.

Os ensaios de avaliação fenotípica e agronômica no Brasil não mostraram efeitos pleiotrópicos e epistáticos, sendo que as características fenotípicas e agronômicas da soja MON 94637 não foram alteradas em função da modificação genética, quando comparado à soja controle convencional, exceto pela expressão da característica de resistência a insetos, que foi o objetivo da transformação para expressão das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2 em soja.

Uma avaliação comparativa das características de germinação e dormência das sementes foi conduzida para a soja MON 94637 e a soja controle convencional. Os lotes de sementes da soja MON 94637 e da soja controle convencional foram colhidos em Kunia, Havaí em 2019. Nas análises dos dados de dormência e germinação, não foram detectadas diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional nos regimes de temperatura ótimo (25 °C) ou subótimo (10/25 °C) para qualquer uma das características avaliadas, incluindo sementes duras viáveis

Possíveis efeitos em organismos não-alvo

A avaliação de abundância de organismos não alvo na soja MON 94637 ocorreu nos seis locais em que foram conduzidos os estudos de avaliação agronômica e fenotípica já mencionados no presente documento, a saber: Cachoeira Dourada, MG (MGCH); Não-MeToque, RS (RSNM); Sorriso, MT (MTSO); Rolândia, PR (PRRO); Luís Eduardo Magalhães, BA (BALM) e Santa Cruz das Palmeiras, SP (SPSD) (Verardino, 2023b).

A avaliação da abundância de artrópodes não alvo foi realizada por meio de coleta com placa (Vertical Beet Sheet) e bandejas amarelas. Essas avaliações foram realizadas em épocas previamente definidas, iniciando ao final do estágio vegetativo – R1 e aproximadamente a cada 10 dias entre coletas, totalizando seis coletas. Os artrópodes cuja abundância foi considerada como representativa, ou seja, apresentou número médio $\geq 1,0$ por parcela e época de coleta, foram submetidos a análise estatística. Os artrópodes que atingiram o critério de

inclusão na coleta com placa (VBS) foram: Aranhas, Carabidae, Chrysomelidae (vaquinhas), Neuroptera (*Chrysoperla spp.*), Hemiptera (*Geocoris spp.*, *Nabis spp.*, *Orius spp.*), Pentatomidae (percevejos), Reduviidae (*Zellus spp.*). Os artrópodes que atingiram o critério de inclusão coletados em bandeja amarela foram: *Astylus variegatus*, Carabidae, Chrysomelidae (vaquinhas), Diptera (*Condylostylus spp.*), Grillydae, Hymenoptera (parasitoide), Coleoptera (*Lagria villosa*), Hemiptera (*Nabis spp.*, *Orius spp.*), Pentatomidae (percevejos), Diptera (Tachnidae, *Toxomerus spp.*).

A abundância de organismos não-alvo avaliada neste estudo demonstrou que a soja MON 94637 não difere consistentemente da soja controle convencional, as diferenças significativas encontradas foram pontuais e não representam características que constituem potenciais riscos ambientais.

A performance obtida com o uso proposto para o OGM

Os resultados da eficácia de controle de lepidópteros obtidos na soja MON 94637 foram comparados aos resultados obtidos na soja controle convencional em comparações individuais por local. Parâmetros avaliados: dano inicial (*Elasmopalpus lignosellus* (lagarta elasma), *Agrotis ipsilon* (lagarta rosca) e/ou *Spodoptera frugiperda*) e porcentagem de desfolha (Plusiinae, Heliiothinae, *Spodoptera spp.*, *Anticarsia gemmatalis*). Nas análises individuais (por local), dos 44 parâmetros avaliados para danos iniciais e porcentagem de desfolha, as comparações em 30 parâmetros (valores diferentes de zero e que apresentaram variabilidade dos dados) foram possíveis, sendo que 19 apresentaram diferenças significativas entre a soja MON 94637 e a soja controle convencional. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística (teste t) para a comparação das médias da soja MON94637 em relação à soja controle convencional, ao nível de significância de 5%. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a soja MON 94637 apresentou eficácia no controle de lepidópteros comparada à soja controle convencional.

A eficácia da soja MON 94637 foi avaliada, também, por meio de bioensaios em laboratório, utilizando discos foliares para analisar o controle das lagartas *Chrysodeixis includens* e *Anticarsia gemmatalis* na soja MON 94637, em comparação à soja controle convencional. As lagartas de *A. gemmatalis* e *C. includens*, apresentaram 100% de mortalidade em todos os estádios fenológicos testados. Com base nestes resultados, pode-se concluir que a soja MON 94637 apresentou eficácia no controle das referidas lagartas.

V - Parecer Final

O “Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental da Soja MON 94637” foi elaborado conforme a Resolução Normativa Nº 32, de 15 de junho de 2021, que dispõe sobre as normas para liberação comercial e monitoramento de animais e vegetais Geneticamente Modificados - OGM e seus derivados de origem vegetal e animal. A CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. levou em consideração também resultados de estudos realizados com a soja MON 94637 nos Estados Unidos, quando não havia hipótese de risco relacionada com particularidades da fauna ou flora brasileiras, como previsto no §2º do Art. 11 da Resolução Normativa nº 32/2021.

Os dados e informações apresentados neste relatório demonstram que exceto pela expressão das proteínas Cry1A.2 e Cry1B.2, que conferem proteção contra lepidópteros-praga, a soja MON 94637 é agrônômica e fenotipicamente semelhante à soja cultivada comercialmente. Além disso, os estudos realizados demonstraram que a soja MON 94637 é tão segura quanto a soja convencional para o uso como alimento humano e animal, e para o meio ambiente.

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, considera-se que os dados de biossegurança do evento MON 94637 **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.

REFERÊNCIAS

Codex Alimentarius (2009). Foods derived from modern biotechnology. Second Edition. Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Good, N. A. (2022). An acute oral gavage toxicity study of Cry1A.2 protein in CD-1 mice. Chesterfield, Missouri.

Good, N. A. (2023). An Acute Oral Gavage Toxicity Study of Cry1B.2 Protein in CD-1 Mice. Chesterfield, Missouri.

Hammond, B. G. e J. M. Jez (2011). "Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops." Food and Chemical Toxicology 49(4): 711-721.

Leandro V. Astarita
Presidente da CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Vieira Astarita, Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**, em 11/11/2023, às 19:41 (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 <https://sei.mcti.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **11512320** e o código CRC **59B60A52**.