

PARECER TÉCNICO Nº 4410/2015

Processo nº: 01200.000123/2012-07

Requerente: Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda .

CNPJ: 08.636.452/0001-76

Endereço: Av. Nações Unidas 14171, 2º Andar, 04794-000, São Paulo, SP

Presidente da CIBio: Mário Von Zuben

Título da proposta: Liberação Comercial de soja geneticamente modificada tolerante a herbicidas – Evento DAS-68416-4

Reunião: 181ª. Reunião ordinária ocorrida em 09/04/2015.

1

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de soja geneticamente modificada, evento DAS-68416-4, concluiu pelo seu **DEFERIMENTO**, nos termos deste parecer técnico.

A Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda., solicitou para CTNBio parecer sobre a biossegurança de soja geneticamente modificada tolerante aos herbicidas 2,4-D e glufosinato de amônio para efeito de sua liberação no meio ambiente, comercialização, consumo e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e progênies dele derivadas. O evento DAS-68416-4 é portador do gene *aad-12* que codifica a proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12) a qual confere tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e do gene *pat* que codifica a proteína PAT a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. A linhagem de soja DAS-68416-4 foi obtida por transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA101, utilizando o plasmídeo pDAB4468, cuja construção gênica contém o gene *aad-12* proveniente de *Delftia acidovorans* e o gene *pat* proveniente do microrganismo *Streptomyces viridochromogenes*. A enzima AAD-12 é uma dioxigenase α -cetogluturato dependente 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), em 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. A proteína PAT inativa o glufosinato por acetilação de uma

amina primária do herbicida. A proteína PAT é uma acetiltransferase bem estudada e caracterizada. As acetiltransferases são comuns na natureza sendo encontradas em microorganismos, plantas e animais, com a propriedade de se degradar rapidamente em temperaturas elevadas.

2

A segurança alimentar humana e animal do evento DAS-68416-4 foi analisada através de estudos de composição química e nutricional de forragem e grãos de soja DAS-68416-4 comparativamente 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-68416-4 não difere da soja convencional em sua composição química e nutricional, exceto pela presença e expressão dos genes *aad-12* e *pat*, conforme esperado.

A segurança ambiental do evento foi analisada em estudos realizados no Brasil, nos Estados Unidos e no Canadá que demonstraram que a soja DAS-68416-4 não difere da soja convencional em características agronômicas, morfológicas, reprodutivas, assim como é equivalente em composição química e nutricional com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas à base de glufosinato de amônio pela expressão do gene *pat* e a herbicidas à base de 2,4-D pela presença do gene *aad-12*. O fenótipo das plantas transformadas contendo os genes descritos é similar ao fenótipo da planta original no que se refere aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento da planta, ao seu método de propagação. Além disso, a soja contendo o referido evento de transformação, assim como a soja convencional, não apresenta tendência a proliferar-se como planta daninha e não é uma espécie invasiva em ecossistemas naturais. Outrossim, a requerente declinou da confidencialidade das sequências gênicas do evento.

Para o presente parecer foram analisados os relatórios apresentados pela requerente bem como literatura científica independente. Considerando as particularidades das diferentes regiões do país, estudos científicos realizados para avaliação de biossegurança, características agronômicas e fenotípicas, como parte da avaliação de risco deste OGM, foram incluídas regiões representativas para a cultura da soja no território brasileiro. A CTNBio concluiu que

a presente a soja não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à soja convencional.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: evento DAS-68416-4

Requerente: Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda

Espécie: *Glycine max*

Característica Inserida: tolerância aos herbicidas 2,4-D e glufosinato de amônio

Método de introdução da característica: *Agrobacterium tumefaciens*

A soja DAS-68416-4 é portadora do gene *aad-12 v1* que codifica a proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12) a qual confere tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), e do gene *pat v6* que codifica a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT) a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

Uso proposto: Livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, armazenamento, comercialização, consumo, liberação e descarte e quaisquer outras atividades relacionadas a este OGM e progênes derivadas.

II. Informações Gerais

O gene *aad-12 v1*, é uma versão sintética do gene da ariloxialcanoato dioxigenase, originário da bactéria *Delftia acidovorans*, sendo uma bactéria estritamente aeróbica, gram-negativa, que ocorre no solo, em água corrente, em tratamento de esgoto e presente em espécimes clínicas (Tamaoka *et al.* 1987, Wen *et al.*, 1999). *Delftia acidovorans* tem a capacidade de transformar ácido ferúlico em vanilina e outros metabólitos de sabor (Toms e Wood, 1970; Ramachandra Rao e Ravishankar, 2000; Shetty *et al.*, 2006). *Delftia acidovorans*, como muitas outras bactérias de solo, adquiriu a capacidade de usar herbicidas como fontes de carbono para se desenvolver, acabando por dar ao microrganismo uma vantagem competitiva nessas condições. A enzima AAD-12 é uma dioxigenase dependente de α -cetogluturato 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) (Müller *et al.*, 1999; Westendorf *et al.*, 2002 e 2003; Wrigth *et al.*, 2005), 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 fluoxipir em seus fenóis inativos correspondentes. A enzima AAD-12 tem seletividade enantiomérica para os (S)-enantiômeros dos herbicidas ácidos fenoxi quirais (ex. diclorpop e mecoprop), mas não degrada os (R)-enantiômeros. São os R-enantiômeros nesta classe de químicos que tem atividade herbicida. Portanto, a enzima AAD-12 não degrada os herbicidas comerciais à base de ácidos fenoxi quirais. O gene *pat* v6 é originário de *Streptomyces viridochromogenes*, e codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase. Este microrganismo não é conhecido como patógeno humano e não é associado a outras propriedades (ex. produção de toxinas) conhecidas por afetar a saúde humana, sendo utilizado comercialmente em várias construções genéticas. O gene *pat* utilizado neste evento, foi sintetizado com base na seqüência de aminoácidos da proteína presente no *S. viridochromogenes*, utilizando-se de códons usuais em plantas para maior expressão do gene em soja (Van Wert, 1994; OECD, 1999). O gene *pat* tem sido usado com frequência como marcador seletivo em trabalhos de transformação genética de plantas, conferindo tolerância a herbicidas tais como glufosinato de amônio ou bialofós e é bem conhecido da comunidade científica e agências regulatórias (AgBios, 2008).

III. Caracterização molecular do evento DAS-68416-4

A requerente apresentou a caracterização molecular do inserto com mapas detalhados do vetor e da construção. O inserto (T-DNA) de pDAB4468 consiste do gene *aad-12*, cuja expressão é controlada pelo promotor AtUbi10 e pela seqüência terminadora AtuORF23 3' UTR, pelo gene *pat*, cuja expressão é controlada pelo promotor CsVMV e pelo terminador AtuORF1 3'UTR, e do elemento RB7 de ligação à matriz nuclear presente na extremidade 5' do promotor AtUbi10. Foram desenvolvidas várias gerações de cruzamento para a análise de integridade, estabilidade e herdabilidade dos insertos *aad-12* e *pat* na soja DAS-68416-4. A caracterização molecular dessa soja por análise de *Southern Blot* confirmou a inserção de uma cópia única e intacta dos cassetes de expressão *aad-12* e *pat* originários do inserto. Nenhum fragmento adicional dos cassetes de

expressão *aad-12* e *pat* foram identificados no evento DAS-68416-4 e nenhuma sequência do plasmídeo original estava presente. Análises detalhadas de *Southern Blot* foram realizadas usando sondas específicas para as sequências gênicas codificadoras, promotores, terminadores, e outros elementos reguladores presentes no plasmídeo pDAB4468. A localização de cada sonda no plasmídeo pDAB4468 foram descritas no dossiê assim como os tamanhos esperados e observados para os fragmentos resultantes de digestões específicas de combinações de sondas, baseado nos sítios de enzimas de restrição do plasmídeo pDAB4468.

O evento DAS-68416-4 também mostrou estabilidade em três gerações de cruzamento (T3, T4 e T5) bem como padrão esperado de segregação para um único inserto/lócus na geração F2 segregante do evento DAS-68416-4. A avaliação da herança genética dos genes inseridos mostrou uma segregação 3:1, sendo que as plantas segregantes apresentaram fenótipo normal em todos os casos analisados. Efeitos pleiotrópicos e epistáticos não foram constatados nos ensaios com o evento modificado resultante da inserção dos genes.

IV. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

A estabilidade da inserção de DNA foi analisada ao longo de 4 gerações da soja DAS-68416-4, através de digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e *Southern blot*. Os resultados mostraram, em todas as amostras analisadas, como esperado, a presença de uma cópia única e intacta do inserto, demonstrando assim sua integração e estabilidade ao longo de várias gerações. Em estudo investigando a possibilidade da transferência do gene de resistência ao glufosinato para as bactérias do intestino de abelhas que frequentam plantações de canola resistente ao herbicida, Mohr e Tebbe (2007) concluíram não haver indícios deste fenômeno.

IV.1. Alergenicidade e toxicidade das proteínas introduzidas na soja DAS-68416-4

O potencial de toxicidade da proteína AAD-12 foi avaliado através de pesquisa de homologia de sequência de aminoácidos da proteína. Apesar da identificação de várias homologias, nenhuma delas referiu-se a toxinas conhecidas. O potencial de alergenicidade de AAD-12 também foi investigado por pesquisa de homologia, neste caso com sequências de aminoácidos de alérgenos conhecidos na *Food Allergy Research and Resource Program*

Database (FARRP, version 11). Não foi encontrada qualquer homologia significativa nesta pesquisa. Em estudo *in vivo*, foi investigado o potencial da proteína AAD-12 em camundongos. Neste estudo, foi administrada uma dose única de 2.000 mg da proteína AAD-12 por quilo de peso corporal, em camundongos, não sendo observadas modificações patológicas nos animais.

6

Para a proteína PAT, o potencial de toxicidade e alergenicidade foi também investigado por bioinformática, com análise da homologia da sequência de aminoácidos com toxinas ou alérgenos conhecidos, não tendo sido encontradas homologias significantes. Em estudo similar, Herouet et al. (2005) observaram homologia de sequência menor que 35% com toxinas alimentares ou alérgenos. Foi também descrita neste estudo a rápida degradação da proteína PAT em condições que simulam fluido gástrico e intestinal com pancreatina e pepsina, bem como a ausência de toxicidade ou mortalidade da proteína PAT quando administrada em doses de 1 ou 10 mg/kg de peso em camundongos. Estes resultados indicam que não há efeito prejudicial associado à inclusão da proteína PAT no consumo humano ou animal.

A proteína PAT é expressa com intensidade adequada nesta soja, permitindo que resista a níveis de glufosinato superiores a quantidade recomendada para o uso no campo. A proteína, no entanto, esta presente nas várias partes da planta entre 0,001 a 0,0002 % da proteína total. Demonstrou-se ser facilmente degradável no fluido gástrico (digerida em 5 segundos) e intestinal. Análise *in silico* e em voluntários humanos demonstraram ser destituída de alergenicidade sendo ademais não glicosilada (Herouet et al., 2005), um fato positivo já que as proteínas com potencial de causar alergias comumente carregam esta modificação. Sua toxicidade foi igual a do controle negativo (aprotinina) em injeção intravenosa em ratos. Por ingestão foi administrada a camundongos na quantidade equivalente a 500mg de PAT por kg de peso vivo. Nenhum efeito adverso foi detectado e foi impossível definir um DL50 devido à não toxicidade. Calcula-se que a dose sem efeito observado (NOEL) seja maior que 5g/kg de peso animal. Considerando os níveis usuais de consumo do grão de soja (WHO) a exposição na dieta humana seria de ~ 0,008mg/kg/dia(adultos) ou ~ 0,015mg/kg/dia (crianças). A

margem de exposição (MOE) será > 620.000 ou > 330.000 (adultos e crianças respectivamente).

A proteína AAD-12 é expressa com intensidade adequada nesta soja, permitindo que resista a níveis de 2,4-D superiores a quantidade recomendada para o uso no campo. A proteína, no entanto, esta presente nas várias partes da planta abaixo de 0,01 % da proteína total. Demonstrou-se ser facilmente degradável no fluido gástrico (digerida em 30 segundos) e intestinal. Análise *in silico* e em voluntários humanos demonstraram ser destituída de alergenicidade sendo ademais não glicosilada, um fato positivo já que as proteínas com potencial de causar alergias comumente carregam esta modificação. Por ingestão foi administrada a camundongos na quantidade equivalente a 2000 mg por kg sem efeitos adversos. Nenhum efeito adverso foi detectado e foi impossível definir um DL50 devido à não toxicidade. Calcula-se que a dose sem efeito observado (NOEL) será maior que 2g/kg de peso animal. Considerando os níveis usuais de consumo do grão de soja (WHO) a exposição na dieta humana corresponde a uma margem de exposição (MOE) que será > 39.000 ou > 20.000 (adultos e crianças respectivamente) ou atingida apenas com o consumo diário de ~ 7.000 kg ou ~ 2.000 kg de grãos.

Avaliou-se a persistência de resíduos do pesticida 2,4-D no grão de soja na dose máxima de aplicação do pesticida (em quatro aplicações) usando-se cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas. O limite de detecção foi de 0,003 mg/kg e o de quantificação 0,01 mg/kg (ppm). Não se detectou resíduo nos grãos na grande maioria dos experimentos exceto em uma das amostras onde apareceu no teor de $< 0,01$ mg/kg mas como esta amostra não foi tratada com herbicida seria contaminação no laboratório ou na manipulação da amostra.

IV.2. Características nutricionais

A composição dos produtos derivados da soja transgênica de DAS-68416-4 foi analisada em comparação com a variedade controle Maverick, não-transgênica. Os resultados mostraram similaridade entre as duas variedades, para um grande número de elementos nutricionais. Em estudo recente, Herman et al. (2011) avaliaram os efeitos de dietas contendo farelo da soja

DAS-68416-4 em frangos. Os animais foram alimentados durante 6 semanas com dieta contendo 40%, 36% e 32% nos períodos inicial, intermediário e final, respectivamente. A análise de vários parâmetros de crescimento e desempenho dos frangos indicaram que a soja DAS-68416-4 é nutricionalmente equivalente à soja não-transgênica. Por outro lado, a resistência ao glufosinato em plantas transgênicas está em uso desde 1995, não sendo evidenciado dano animal ou ambiental. A toxicidade reprodutiva em animais experimentais foi avaliada, e os resultados indicaram que nas condições normais de uso o produto não apresenta risco reprodutivo (Schulte-Hermann et al., 2006).

A análise centesimal mediu a concentração de proteínas, gordura, cinzas, umidade, carboidratos, fibras em detergente ácido e neutro, cálcio e fósforo. As determinações foram realizadas com a isolinha, e a soja DAS-68416-4 sem pulverização, tratada com glufosinato, com 2,4-D e com ambos. Os valores e intervalos de variação permitem concluir que a soja DAS-68416-4 é substancialmente equivalente à isolinha. A análise de minerais comparou os teores de cálcio, cromo, cobre, iodo, ferro, magnésio, manganês, molibdênio, fósforo, potássio, selênio, sódio e zinco com os mesmos tratamentos acima descritos. As diferenças estatisticamente significativas encontradas estão dentro de valores de dispersão normais e seguros. A análise de aminoácidos também seguiu o mesmo protocolo. 22 ácidos graxos distintos foram mensurados, os antinutrientes ácido fítico, rafinose, lecitina, estaquiase e inibidor da tripsina; as isoflavonas genisteína, gliciteína, daidzeína, e o resultado seguiu o mesmo padrão: algumas leituras estatisticamente significativas como distintas do controle mas sempre dentro dos limites de valores da literatura. Revisões rigorosas apontam um papel benéfico e seguro para as isoflavonas, na concentração em que se encontram na soja (Song et al. 2007). Os estudos foram executados em localidades distintas dos EUA (Iowa, Illinois, Indiana, Nebraska) duas localidades em Ontario no Canadá e no Brasil. Consequentemente a soja DAS-68416-4 tratada das 3 maneiras distintas com os herbicidas é substancialmente equivalente em todos os parâmetros examinados, à soja isolinha.

Frangos foram alimentados com dieta balanceada (Laboratórios Genesis Midwest) contendo cinco formulações distintas, cada com 120 aves: isolinha e 3 sojas convencionais e a soja DAS-68416-4. Foram tratados em 3 grupos: inicial (40% de farelo de soja), intermediário

(36%) e terminação (31%). As aves foram avaliadas quanto ao ganho de peso, consumo da ração e estado geral. Ao final foram abatidas avaliando-se a qualidade da carcaça, massa muscular, fígado, gordura abdominal (Herman et al., 2011). Não se constatou diferença significativa entre a soja DAS-68416-4 e as demais sendo portanto nutricionalmente equivalentes, inclusive nos exames buscando alterações patológicas nos órgãos.

A tecnologia de resistência ao glufosinato em plantas transgênicas está em uso desde 1995 sem evidência de dano animal ou ambiental. Sua toxicidade reprodutiva em animais experimentais foi avaliada e nas condições normais de uso não apresenta risco reprodutivo para humanos (Schulte-Hermann et al., 2006). No Japão, investigou-se 346 casos de envenenamento por herbicidas de 1998 a 2002. A maioria (70%) decorrem de tentativas de suicídio. Com o paraquat 70% vai a óbito e com glufosinato ou glifosato menos de 10% morrem (Nagami et al., 2005). O envenenamento de um homem de 65 anos após ingestão de 300 ml de glufosinato a 20% w/v resultou em sintomas neurológicos sendo tratado com respiração artificial e conseguindo recuperação completa após 5 dias (Hirose et al., 1999).

Quanto às preocupações cercando o herbicida 2,4-D é significativo, tanto que a EPA americana analisou uma solicitação do Natural Resources Defense Council (NRDC) para suspensão do uso deste herbicida nos EUA com base em determinada argumentação e supostos novos estudos que amparariam a solicitação. A EPA rejeitou o pedido. Esta molécula está em uso nos EUA desde 1946 e integra nada menos que 600 produtos à disposição de famílias (é muito usado para controle de ervas daninhas que invadem gramados residenciais) e agricultores. Nesta avaliação a EPA analisou novos estudos usando os recursos mais avançados em reprodução animal para examinar o efeito do produto como perturbador endócrino e seus efeitos neuro e imunotóxicos. A agência manteve a autorização e introduziu a exigência de novas informações no rotulagem dos produtos (EPA, 2012).

Adicionalmente, a requerente acrescentou estudos de análise de composição em mais dois novos ambientes, Cravinhos/SP e Castro/PR.

Nos quatro ambientes estudados, os dados analisados para análise centesimal, análise de minerais, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, antinutrientes, metabólitos secundários,

isoflavonas e fibra dos grãos de soja geneticamente modificada e convencional, não diferiram estatisticamente, evidenciando a equivalência nutricional da soja geneticamente modificada com sua contraparte convencional.

V. Aspectos Ambientais

Até o momento, a soja DAS-68416-4 obteve aprovação comercial na Austrália, Canadá, Coréia do Sul, Estados Unidos, Japão, México, Nova Zelândia e Taiwan e está em processo de análise na Europa e Argentina, seja para plantio, ração animal ou alimentação humana. Essas informações foram obtidas junto ao banco de dados do “International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications” (ISAAA), através do link <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=254>, acessado em abril de 2015.

Estudos realizados no Brasil, nos Estados Unidos e no Canadá demonstraram que a soja DAS-68416-4 não difere da soja convencional em características agrônomicas, morfológicas, reprodutivas, demonstrando sua equivalência em composição química e nutricional (com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas à base de glufosinato de amônio pela expressão do gene *pat* e a herbicidas à base de 2,4-D pela presença do gene *aad-12*).

Não se espera hibridação introgressiva da soja DAS-68416-4 com espécies sexualmente compatíveis, uma vez que no Brasil não existe 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 elas não ocorrem naturalmente no Brasil (Borém, 1999), e a soja cultivada do gênero *Glycine* nunca foi encontrada na forma silvestre no país (Sediyama et al., 1999).

Nenhum efeito adverso causado pelo cultivo da soja DAS-68416-4 foi verificado para os organismos indicadores relevantes, quando comparado à soja convencional, baseado em estudos realizados no Brasil, nos Estados Unidos e no Canadá.

Foram conduzidos estudos comparativos da soja DAS-68416-4 com sua correspondente convencional, para avaliação de características agrônomicas, botânicas, reprodutivas e

composicional envolvendo um grande número de genes, com germoplasma avaliado em condições de clima temperado, tropical e subtropical, da América do Norte e Brasil e demonstraram a similaridade dessas características.

11

A tolerância da soja DAS-68416-4 aos herbicidas à base de 2,4-D e/ou glufosinato de amônio não aumenta sua capacidade de proliferação, colonização ou sobrevivência no meio ambiente. Nenhuma das proteínas expressas pelo evento DAS-68416-4 afeta o potencial de sobrevivência da planta de soja DAS-68416-4, uma vez que o potencial de sobrevivência em um meio ambiente depende de alterações morfológicas e fisiológicas que não ocorrem nas plantas da soja DAS-68416-4. Como consequência, nenhuma vantagem competitiva para a sobrevivência ou dispersão da planta no meio ambiente pode ser atribuída à introgressão dos genes *aad-12* e *pat* em cultivares de soja.

O fenótipo das plantas transformadas contendo os genes *aad-12* e *pat* é similar ao fenótipo da planta original no que tange aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento da planta, ao seu método de propagação. Além disso, a soja contendo os genes *aad-12* e *pat*, assim como a soja convencional, não apresenta tendência a proliferar-se como planta daninha, e não é uma espécie invasiva em ecossistemas naturais.

A soja é uma cultura anual não latente, não é capaz de formar estruturas de reprodução de longo prazo no meio ambiente. As sementes constituem as únicas estruturas de sobrevivência, não havendo regeneração natural da soja a partir de tecido vegetativo.

Não é esperada transferência horizontal dos genes *aad-12* e *pat* para a microbiota de solo uma vez que não existe qualquer mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva que o DNA possa se transferir de plantas para microrganismos no solo (Connor et al., 2003; Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh et al., 1994; Prins e Zadoks, 1994; Schluter et al., 1995). Ainda que se verificasse tal fato, os genes *aad-12* e *pat* presentes no evento DAS-68416-4 não trariam nenhum risco à saúde humana ou ao meio ambiente, baseado nos dados de segurança que incluem a degradabilidade das proteínas, a não semelhança com alérgenos

conhecidos, além do fato de que tratam-se de genes amplamente distribuídos na natureza. Dessa forma, nenhum risco ao meio ambiente é esperado pelo cultivo da soja DAS-68416-4.

Foram conduzidos estudos para avaliar o efeito da soja DAS-68416-4 em atributos químicos e físicos do solo e concentração de nutrientes nas folhas (Cruz, M. C. P.; et al., 2011a). Os experimentos foram conduzidos nas localidades de Mogi Mirim (SP) e Indianópolis (MG). Foram analisados teores de P (fósforo), S-SO₄²⁻ (enxofre na forma de sulfato), MO (matéria orgânica), pH, valores de K⁺ (potássio), Ca²⁺ (cálcio), Mg²⁺ (magnésio), H+Al, Al³⁺ (alumínio), SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca catiônica) e V%. O estudo também demonstrou o desdobramento da interação entre os locais e os tratamentos para concentrações médias de Mg²⁺. Foram também avaliados micronutrientes B (boro), Cu (cobre), Fe (ferro), Mn (mangânês) e Zn (zinco) e finalmente resultados de granulometria do solo.

Como não foram observados efeitos significativos para tratamentos em relação a todos os atributos químicos e para a granulometria, dentro de cada local, pode-se concluir que as áreas experimentais dentro de cada local foram uniformes, portanto adequadas para se fazer uma análise comparativa do efeito da soja transgênica em relação à soja convencional. Houve, entretanto diferenças entre locais na classe textural (muito argilosa em Indianópolis (MG) e argilosa em Mogi Mirim (SP). Apenas para os teores de S-SO₄²⁻ no solo, não houve diferença entre locais. As diferenças entre locais são esperadas, uma vez que são solos formados a partir de materiais de origem diferentes e com históricos de culturas e de práticas de calagem e adubação não necessariamente iguais.

Uma nova amostragem de solo foi realizada após a aplicação dos tratamentos, aos 5 meses após a colheita da soja, e os resultados da análise de P resina, SO₄²⁻, de matéria orgânica, de pH, CaCl₂, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, H+Al, Al³⁺, SB e CTC evidenciaram que não houve diferenças significativas entre a soja DAS-68416-4 e a soja convencional, para nenhum dos atributos químicos estudados. Também não houve diferenças significativas entre a soja DAS-68416-4 e a soja convencional para argila, areia grossa, areia fina e silte. Verificou-se diferenças significativas para efeito de locais decorrentes do tipo de solo, manejo de solo, histórico de culturas, tecnologia de aplicação, o que é esperado para este tipo de ensaio.

Também foram conduzidos estudos para avaliação do estado nutricional das plantas, através da determinação da concentração de macro e micronutrientes em folhas de soja. Para concentração de N houve interação local x tratamento, com variação de 4 a 10 g/kg de N nas folhas em Mogi Mirim e Indianópolis, respectivamente. Em Indianópolis as concentrações de N foram maiores em quase todos os tratamentos em virtude de maior fertilidade do solo, pois foram aplicados apenas 12,5 kg/ha de N no plantio e subsequentemente 7,0 kg/ha de N na adubação de cobertura, enquanto que, em Mogi Mirim foi de 50 kg/ha no plantio. Houve também diferenças nas concentrações de P e S na interação local x tratamento, com variação de 0,5 a 0,74 mg/kg para P e de 0,16 a 0,57 mg/kg para S nas folhas em Mogi Mirim e Indianópolis, respectivamente.

Diferenças entre locais foram também observadas para a concentração de B, com valor maior nas plantas cultivadas em Indianópolis (MG), e de Cu, Mn e Zn, maiores nas plantas de Mogi Mirim. O primeiro fator que regula a concentração de nutrientes nas plantas é o teor de nutrientes no solo. No entanto, outros fatores podem fazer as concentrações de nutrientes nas folhas variarem, como quantidades de fertilizantes aplicadas, temperatura e disponibilidade de água, interações entre nutrientes e luminosidade. Além destes fatores, a cultivar da soja comercial BRS 232 mostrou-se distinta da cultivar Maverick dos tratamentos isolinha e DAS-68416-4, tratamentos que não mostraram diferenças significativas entre as plantas isolinha e a transgênica com e sem aplicação do herbicida. A combinação destes fatores em cada local de condução dos experimentos explica as variações obtidas.

Foram conduzidos ensaios para avaliar a decomposição de plantas de soja geneticamente modificadas comparativamente à soja convencional. O estudo foi também conduzido em Indianópolis/MG e Mogi Mirim/SP. A decomposição dos restos culturais no campo foi avaliada pelo método de sacos de nylon (*litter bags*), descrito por Santos e Whitford (1981). Na época da colheita da cultura foi feita a coleta de 4 a 5 plantas de cada uma das parcelas de cada tratamento. As plantas foram cortadas entre 2,5 e 5,0 cm acima da superfície do solo. Os grãos foram excluídos das amostras. As hastes e as folhas foram separadas e seccionadas em pedaços menores que 10 cm e, posteriormente, foram embalados separadamente em hastes e

vagens sem sementes. Todo o material colhido foi encaminhado ao laboratório de processamento da Gravena Ltda.

As amostras foram secas em estufa mantida entre 65 e 70°C, até peso constante. Em cada saco de nylon foram colocados 10g de material, sendo 6,5g de haste e 3,5 de vagens sem sementes (proporções médias medidas nas amostras) e estes foram codificados para a posterior identificação a campo. Os sacos foram confeccionados em tela de nylon com malha de 2 mm e dimensão de 20 x 20 cm. Os sacos foram costurados com linha de nylon ou material similar para evitar perda de material durante a coleta.

Os materiais testados apresentaram o mesmo padrão de decomposição no intervalo de tempo avaliado, diferindo apenas em função do local, na avaliação aos 30 dias de incubação e em decorrência da degradação da cultivar comercial. A maior taxa de decomposição foi verificada nos primeiros 30 dias, com cerca de 60% de perda de material orgânico nas duas localidades do ensaio. A presente taxa apresenta valor similar aos obtidos por Broder e Wagner (1988) que estimaram perdas de 68% dos resíduos vegetais, aos 32 dias, em área de cultivo convencional. Ao final do período de incubação, aos 120 dias, a decomposição em Indianópolis foi de 68,83% e, em Mogi Mirim (SP), foi de 71,92%, considerando a mineralização rápida de compostos solúveis, de menor peso molecular, na primeira fase da decomposição, seguida de mineralização mais lenta devido ao acúmulo de moléculas mais resistentes (Zech et al., 1997; Lehman et al., 2008).

A relação C/N e o conteúdo de lignina são fatores fortemente ligados ao processo de decomposição dos restos culturais, afetando a disponibilidade de nitrogênio para as culturas (Heizmann, 1985; Bruulsema e Christie, 1987). Para Siqueira e Franco (1988), quando a relação C/N está entre 20 e 30, ocorre equilíbrio entre os processos de mineralização e de imobilização do nitrogênio. Quando é maior do que 30, a imobilização predomina em relação à mineralização. Entretanto, para Derpsch e Calegari (1985), com relação C/N superior a 25 já é possível ocorrer imobilização líquida de N. A relação C/N das plantas de soja, pouco acima de 40 na média dos locais e tratamentos, ficou acima do esperado para leguminosas (< 20), contudo, este índice pode ter sido influenciado pelo período em que ocorreu o experimento

(outono-inverno), onde os índices pluviométricos são menores. No entanto, como nos primeiros 30 dias a perda média de matéria seca foi superior a 60%, a relação C/N alta não foi fator limitante à decomposição.

15

Adicionalmente a requerente acrescentou estudos de ensaios em Cravinhos/SP e Castro/PR para avaliação das características agrônômicas. Os dados evidenciaram que os tratamentos da soja geneticamente modificada sem aplicação e com aplicação de herbicidas foram estatisticamente indistinguíveis em todas as características avaliadas nos quatro ambientes.

Os dados de estudo de expressão de proteínas (em amostra de folha, planta inteira, raiz, forragem e grãos de soja) evidenciaram que na soja controle (convencional) não houve a expressão de nenhuma das proteínas do constructo (conforme esperado), sendo que a média da expressão da proteína AAD-12 variaram de 9,02 ng/mg de peso seco de rão estágio R8 à 57,11 ng/mg de peso seco em tecido de folha R1. A expressão da proteína PAT variou de 1,42 ng/mg peso seco em grãos estágio R8 a 17,90 ng/mg peso seco em folha V2-V3.

O estudo de expressão em campo foi feito em 4 localidades nos EUA e em 2 no Canadá. Os tratamentos nos casos avaliados foram: nenhum, só 2,4-D, só glufosinato e 2,4-D + glufosinato. Os resultados para AAD-12 (seg. Tabela 7) medidos em folhas, raiz, forragem e grão indicam valores maiores em folhas (50 a 57 ng/mg peso seco), intermediários em forragem (39 a 41 ng/mg) e menores nos grãos (16,2 a 16,9 ng/mg) e raiz (16 a 17 ng/mg). Estudo de expressão também foi conduzido no Brasil em Mogi das Cruzes (seg. Tabela 10) indicando os diferentes resíduos de agroquímicos utilizados. No Brasil os resultados foram: folhas (53 a 51 ng/mg), forragem (48 a 49 ng/mg), raiz (15,7 a 17,9 ng/mg).

Para a proteína PAT os valores no estudo brasileiro foram: folha (~ 8 ng/mg), forragem (~ 7 ng/mg), raiz (~1,6 ng/mg) e grão (~ 1,5 ng/mg).

A metodologia para detecção do OGM foi desenvolvida (fragmento de 263 pb do gene *pat*) e testada. As proteínas respectivas podem ser identificadas por ELISA específico. A análise da

segregação indicou resultados coerentes com herança monogênica dominante em padrão mendeliano.

Observações efetuadas ao longo de 3 gerações acompanhando fenótipo, comportamento agrônomico, composição nutricional, degradabilidade no solo, não revelaram diferença com a soja convencional afastando efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos. Esse padrão de comportamento agrônomico e fenotípico e a composição nutricional assim como a quantidade de proteína expressa, afastam interações adversas entre os produtos gênicos expressos nesta soja. Também foi constada a estabilidade genotípica das características introduzidas. As observações feitas também não identificaram alteração na capacidade reprodutiva ou na sobrevivência, esta soja não se comportando em nada como se exibisse maior invasividade que a convencional.

A construção genética em questão é voltada para a tolerância em herbicidas, cujo genes *aad-12* e *pat* não codificam proteínas com efeito herbicida, inseticida, nematicida, fungicida, bactericida etc. Sendo assim, não se espera nenhum tipo de efeito em insetos praga ou polinizadores da cultura da soja. É importante destacar que os organismos doadores, *Delftia acidovorans*, portador do gene *aad-12*, e o microrganismo *Streptomyces viridochromogenes*, portador do gene *pat*, ocorrem naturalmente no solo e estão presentes no meio ambiente e não participam da cadeia de patogenicidade de insetos, mamíferos, etc.

V.1. Informações sobre o herbicida 2,4-D

A molécula do herbicida 2,4-D tem registro de aprovação em mais de 70 países até o momento, incluindo: África do Sul, Algéria, Alemanha, Argentina, Austrália, Áustria, Belize, Bolívia, Brasil, Bulgária, Camarões, Canadá, Cazaquistão, Chile, China, Colômbia, Costa Rica, Costa do Marfim, Croácia, Cuba, Chipre, Dinamarca, El Salvador, Equador, Espanha, Estados Unidos, Estônia, Etiópia, Finlândia, Filipinas, França, Guatemala, Grécia, Honduras, Hungria, Índia, Irlanda, Iraque, Itália, Jamaica, Japão, Letônia, Líbia, Lituânia, Madagascar, Malásia, Ilhas Maurício, México, Marrocos, Nicarágua, Nova Caledônia, Nova Zelândia, Nicarágua, Países Baixos, Panamá, Paraguai, Peru, Polônia, Porto Rico, República Tcheca,

Reino Unido, Romênia, Rússia, Taiwan, Tailândia, Trindade & Tobago, Turquia, Ucrânia, Uruguai, Venezuela, Vietnã e Zâmbia.

De acordo com o Decreto 4.074/2002, o órgão responsável por avaliar a eficácia agrônômica do produto e emitir os certificados de registro no Brasil é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), após as avaliações e aprovações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). O órgão responsável por realizar a avaliação toxicológica e classificar toxicologicamente os produtos é a ANVISA, ao passo que o IBAMA é o órgão responsável por realizar a avaliação ecotoxicológica e classificar os produtos quanto ao potencial de periculosidade ambiental.

O herbicida 2,4-D está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) desde os anos 70, sendo amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas latifoliadas, em aplicações pós-emergentes nas culturas do trigo, milho, arroz, cana-de-açúcar e pastagens, e em pré-plantio das culturas de soja e cana-de-açúcar. O herbicida haloxifope-R está registrado no MAPA, sendo amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas de folhas estreitas, em pós-emergência das culturas da soja, algodão e feijão.

A segurança ambiental e de saúde humana e animal do 2,4-D tem sido reavaliada constantemente por diferentes agências e órgãos governamentais, tais como: Agência de Proteção Ambiental (EPA) Americana, Pest Management Regulatory Agency do Canada, Autoridade Europeia para a Segurança Ambiental (European Food Safety Authority-EFSA), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS). A última reavaliação da EPA para 2,4-D na forma de sal de colina foi liberada em outubro de 2014 (EPA, 2014). A ANVISA está em processo de reavaliação do 2,4-D. Nenhuma agência regulatória voltada para a proteção da saúde pública classificou o 2,4-D como um agente carcinogênico humano.

VI. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

A requerente apresentou a caracterização molecular do inserto com mapa detalhado do vetor. A avaliação da herança genética dos genes inseridos mostrou uma segregação 3:1,

sendo que as plantas segregantes apresentaram fenótipo normal em todos os casos analisados. Efeitos pleiotrópicos e epistáticos não foram constatados nos ensaios com o evento modificado resultante da inserção dos genes.

A Empresa atendeu plenamente, em diversos níveis, as exigências de ensaios de biossegurança nacionais e padronizados internacionalmente para a correta caracterização de inocuidade do transgene.

A soja não é nativa do Brasil sendo uma planta essencialmente autógama. Independente da fauna de polinizadores, é baixa a frequência de cruzamentos

Com base nestas informações, disponíveis na literatura, apresentada no pedido de liberação comercial, observa-se que os riscos de cruzamento são baixos e, em havendo, os danos esperados são negligenciáveis. De fato, nem se espera que sojas cultivadas nas proximidades de plantios de soja convencional cruzem com estes em taxas significativas nem muito menos que o transgene se propague em populações de outras espécies do gênero. Além disso, os ensaios realizados pela empresa revelaram que o evento introduzido não altera de forma alguma a relação desta planta com a biota, quando comparada com seu parental.

A CTNBio encaminhou à requerente o Ofício nº 852/13-CTNBio, de 10 de julho de 2013, onde solicitou informações complementares ao processo. Foram levantadas questões relacionadas a diversos tópicos, tais como: 1. Identificação de novas ORFs; 2. Geração da soja solicitada; 3. Marcador molecular e tamanho dos fragmentos; 4. Quantificação do DNA antes e depois da digestão; 5. Tamanho dos fragmentos; 6. Confidencialidade das sequências flanqueadoras; 7. Aminoácido alterado e conservação da proteína; 8. Rotas metabólicas; 9. Anticorpos monoclonais; 10. Fragmentos fracos; 11. Sequenciamento da proteína; 12. Ausência de efeitos pleiotrópicos e epistáticos; 13. Rotas metabólicas; 14. Toxicidade aguda em ratos; e 15. Transferência horizontal para a microbiota do solo. Após análise minuciosa das respostas da requerente frente aos questionamentos e informações complementares requeridas pela diligência, observamos que foram totalmente atendidas.

VII. Considerações sobre particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização)

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados as pesquisa e o cultivo de OGM nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental ”

A modificação genética introduzida não altera as características botânicas da planta, de forma que a soja DAS-68416-4 se comporta como qualquer *Glycine* em condições de cultivo, exceto pela característica inserida.

VIII. Conclusão

Considerando que a espécie soja é uma planta bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano e que os genes introduzidos nessa variedade não evidenciaram efeitos adversos, segundo os testes realizados.

Considerando que dados de composição centesimal não apontaram diferenças significativas entre as variedades geneticamente modificadas e as convencionais, sugerindo a equivalência nutricional entre elas.

Considerando ainda que:

1. As proteínas inseridas estão presentes em plantas e microrganismos e vários mutantes naturais, portanto, homens e animais, há muito tempo, possuem histórico de exposição às mesmas;
2. a análise molecular da soja DAS-68416-4 evidenciou que a integridade e estabilidade do inserto foi mantida;
3. a análise de segregação e padrão de herança genética são estáveis ao longo de sucessivas gerações;

4. as avaliações agronômicas indicaram que a inserção não levou a expressão de qualquer outra características que não aquela esperada, ou seja, a tolerância a herbicidas;
5. as proteínas inseridas não apresentaram diferenças nutricionais, imunológicas e histológicas, caracterizado a inocuidade da transformação realizada e a segurança do emprego da soja DAS-68416-4. Foram descartados também possíveis efeitos alergênicos pela introdução dos genes escolhidos, seja pelo histórico de uso deles em diversas transformações já aprovadas em diversos países, seja pela análise *in silico* dos peptídeos expressos e demais testes de digestibilidade;
6. As evidências obtidas com os estudos experimentais e observacionais indicam semelhança entre a soja DAS-68416-4 e a variedade não-transgênica, nos aspectos toxicológico, alergênico e nutricional. Não há evidência de qualquer risco toxicológico ou nutricional, indicando que a única consequência da modificação introduzida por manipulação genética com introdução dos genes *aad-12* e *pat* foi a indução de resistência aos herbicidas ácido diclorofenóxiacético e glufosinato de amônio.

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-68416-4 é tão segura quanto seus equivalentes convencionais. No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e as legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que a soja DAS-68416-4 é substancialmente equivalente à soja convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal.

No tocante ao meio ambiente, concluiu-se que a soja DAS-68416-4 não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal, guardando com a biota relação idêntica à soja convencional. 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.

Assim, a CTNBio manifestou-se pelo **DEFERIMENTO** da solicitação de liberação comercial da soja DAS-68416-4, tolerante a herbicidas, conforme requerida pela Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda

21

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; palestras, textos etc. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros.

IX. Monitoramento pós-liberação comercial

Como a resistência de plantas a herbicidas nas áreas de cultivo tem sido cada vez mais frequente devido a vários fatores, como a falta de manejo ou o uso indevido da tecnologia, através do cultivo de plantas com o mesmo gene de resistência na safra/safrinha, ou por falta de conhecimento do produtor, é necessário que a requerente considere ações de gestão listadas abaixo, as quais deverão constar no plano de monitoramento pós-liberação comercial:

- Determinação das medidas mitigatórias quanto a seleção de plantas resistentes aos herbicidas;
- Apresentação de um programa de gestão junto aos clientes, na qual a empresa deverá tomar medidas eficazes para o manejo da resistência, a fim de evitar a seleção de plantas resistentes e o uso responsável do produto;
- Elaboração de um programa de proteção individual visando evitar a contaminação por herbicidas, o qual deverá incluir educação e treinamento dos distribuidores, agricultores e aplicadores sobre o uso adequado da tecnologia, relatando casos verificados de resistência ao 2-4 D para as partes interessadas, o desenvolvimento de testes de diagnóstico para avaliar as espécies de plantas daninhas resistentes e monitorar se o 2-4 D está sendo usado em culturas subsequentes (safra/safrinha).

A requerente deverá submeter o plano de monitoramento pós-liberação comercial, ou solicitar sua isenção, no prazo de 30 (trinta) dias, contados a partir da publicação do deferimento do pedido de liberação comercial do OGM, em consonância com a avaliação de risco da CTNBio, bem como com o parecer contido na sua decisão técnica, conforme determina Art. 3º da Resolução Normativa No 09 da CTNBio, de 02 de dezembro de 2011.

XI. Bibliografia consultada

AgBios. (2008). Databa.e product description.ACS-ZMØØ2-1 / ACS-ZMØØ3-2 (T14, T25). Disponível em: <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowProd&data=T14%2C+T25&format=SHORT>, Acesso em: 06/01/2015

Borém, A. (1999). Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v.10, p.101-107, 1999.

Broder, M. W. & Wagner, G. H. (1988). Microbial colonization and decomposition of corn, wheat, and soybean residue. Soil Sci. Soc. Am. J., 52:112-117, 1988.

Bruulsema, T. W.; Christie, B. R. (1987). Nitrogen contribution to succeeding corn from alfalfa and red clover. Agronomy Journal, v.79, p.96-100, 1987.

Calgene, Inc. (1993). Food additive petition for the APH(3') II as a processing aid FDA Docket Number: 93F-0232, 1993.

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.

Cruz, M. C. P.; Ferreira, M. E.; Gravena, R.; Cordioli, V. H.; Guimarães, J. R. D. O.; Amorim, L. C. S. (2011a). Impacto da soja geneticamente modificada contendo o evento DAS-68416-4 em características físico-químicas do solo e concentração de nutrientes nas folhas. Gravena / UNESP / Dow AgroSciences. Relatório não publicado.

Cruz, M. C. P.; Ferreira, M. E.; Gravena, R.; Cordioli, V. H.; Guimarães, J. R. D. O.; Amorim, L. C. S. (2011b). Decomposição da soja geneticamente modificada contendo o evento DAS-68416-4 em condições de campo. Gravena / UNESP / Dow AgroSciences. Relatório não publicado.

Derpsch, R.; Calegari, A. (1985). Guia de plantas para adubação verde de inverno. Londrina, Instituto Agrônomo do Paraná, 1985. 96p. (Documentos IAPAR, 9)

EPA documentos relativos à petição para revogar o uso de 2,4-D (2012): <http://www.regulations.gov/#!docketDetail;dct=FR+PR+N+O+SR;rpp=25;po=0;D=EPA-HQ-OPP-2008-0877>

EPA documentos relativos à petição para revogar o uso de 2,4-D (2014):
http://www.epa.gov/oppfead1/cb/csb_page/updates/2014/enlist-duo.html

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

FDA. (1992). Fed Reg Vol. 66, No 12, page 4720.

Fukuzawa H, Arai S, Kawai-Yamada M, Das A, Tagawa M, Uchimiya H. Glufosinate-tolerant tobacco plants directed by the promoter of adenylate kinase gene of rice. Ann Bot. 2002 Mar;89(3):351-4.

Hawkes T, Pline-Srnic W, Dale R, Friend E, Hollinshead T, Howe P, Thompson P, Viner R, Greenland A. D-glufosinate as a male sterility agent for hybrid seed production. Plant Biotechnol J. 2011 Apr;9(3):301-14.

Heinzmann, F. X. (1985). Resíduos culturais de inverno e assimilação de nitrogênio por culturas de verão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.20, p.1021-1030, 1985.

Herman RA, Fast BJ, Johnson TY, Sabbatini J, Rudgers GW. Compositional safety of herbicide-tolerant DAS-81910-7 cotton. J Agric Food Chem. 2013 Nov 27;61(47):11683-92.

Herman RA, Dunville CM, Juberg DR, Fletcher DW, Cromwell GL. Performance of broiler chickens fed diets containing DAS-68416-4 soybean meal. GM Crops. 2011. Jun-Dec;2(3):169-75.

Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regul Toxicol Pharmacol. 2005;41(2):134-49.

Hirose Y, Kobayashi M, Koyama K, Kohda Y, Tanaka T, Honda H, Hori Y, Yoshida K, Kikuchi M. (1999) A toxicokinetic analysis in a patient with acute glufosinate poisoning. Hum Exp Toxicol. 18:305-8.

ISAAA - <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=254>, acessado em abril de 2015.

Jayaraj J, Devlin R, Punja Z. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. Transgenic Res. 2008 Aug;17(4):489-501.

Jiang L, Qu F, Li Z, Doohan D. Inter-species protein trafficking endows dodder (*Cuscuta pentagona*) with a host-specific herbicide-tolerant trait. New Phytol. 2013 Jun;198(4):1017-22.

Lepping MD, Herman RA, Potts BL. Compositional equivalence of DAS-44406-6 (AAD-12 + 2mEPSPS + PAT) herbicide-tolerant soybean and nontransgenic soybean. *J Agric Food Chem.* 2013 Nov 20;61(46):11180-90.

Lehamnn, R. M.; Osborne, S. L.; Rosentrater, K. A. (2008). No Differences in decomposition rates observed between *Bacillus thuringiensis* and non-*Bacillus thuringiensis* corn residue incubated in the field. *Agronomy Journal*, v.100, p.163–168, 2008.

Mishutkina IaV, Kamionskaia AM, Skriabin KG. [Generation of sugar beet transgenic plants expressing bar gene]. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2010 Jan-Feb;46(1):89-95. Russian.

Mohr KI, Tebbe CC. Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Jun;75(3):573-82. Peterson JM. Herbicide resistance screening assay. *Methods Mol Biol.* 2009;526:137-46.

Müller, R. H.; Jorks, S.; Kleinsteuber, 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.

Nagami H, Nishigaki Y, Matsushima S, Matsushita T, Asanuma S, Yajima N, Usuda M, Hirose M. (2005) Hospital-based survey of pesticide poisoning in Japan, 1998—2002. *Int J Occup Environ Health.* 11:180-4.

OECD. (1999). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to fosfotricina herbicide. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 1999.

OECD. (2001). Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France. ENV/JM/MONO(2001)15, [http://www.oilis.oecd.org/oilis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)15](http://www.oilis.oecd.org/oilis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)15)

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

Ramachachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla Flavor: Production by Conventional and Biotechnological Routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:289-304.

Rasco-Gaunt S, Liu D, Li CP, Doherty A, Hagemann K, Riley A, Thompson T, Brunkan C, Mitchell M, Lowe K, Krebbers E, Lazzeri P, Jayne S, Rice D. Characterisation of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize. *Plant Cell Rep.* 2003 Feb;21(6):569-76.

Ren Y, Lv J, Wang H, Li L, Peng Y, Qu LJ. A comparative proteomics approach to detect unintended effects in transgenic Arabidopsis. *J Genet Genomics*. 2009 Oct;36(10):629-39.

Ryffel GU. Transgene flow: Facts, speculations and possible countermeasures. *GM Crops Food*. 2014 Oct 2;5(4):249-58.

25

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

Santos, P. F.; Whitford, W. G. (1981). The effects of microarthropods on litter decomposition in a Chihuahuan desert ecosystem. *Ecology*, v.62, p.654-663, 1981.

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

Sedyama, T.; Cardoso, A. A.; Vieira, C.; Andrade, D. (1970). Taxa de hibridação natural em soja, em Viçosa e em Capinópolis, Minas Gerais. *Revista Ceres* 17: 229-331

Sedyama, T.; Teixeira, R. C. & Reis, M. S. (1999). Melhoramento da soja. In: Borém, A. (ed.) *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV. 808p.

Shetty, K.; Paliyath, G.; Pometto, A.; Levin, R. E. (2006). *Food Biotechnology*, CRC Press, ISBN 0824753291, pp. 1672-1673.

Siqueira, J. O.; Franco, A. A. (1988). *Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília, Ministério da Educação e Cultura, 1988. 236p.

Schulte-Hermann R, Wogan GN, Berry C, Brown NA, Czeizel A, Giavini E, Holmes LB, Kroes R, Nau H, Neubert D, Oesch F, Ott T, Pelkonen O, Robert-Gnansia E, Sullivan FM. Analysis of reproductive toxicity and classification of glufosinate-ammonium. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006;44(3 Suppl 1):S1-76.

Shipitalo MJ, Malone RW, Owens LB. Impact of glyphosate-tolerant soybean and glufosinate-tolerant corn production on herbicide losses in surface runoff. *J Environ Qual*. 2008;37(2):401-8.

Song WO, Chun OK, Hwang I, Shin HS, Kim BG, Kim KS, Lee SY, Shin D, Lee SG.(2007) Soy isoflavones as safe functional ingredients. *J Med Food*. 10:571-80.

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.

Van Wert, S. L. (1994). USDA - APHIS Petition for Determination of Nonregulated Status: Glufosinate Resistant Corn Transformation Events T14 and T25. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC. USDA #94-357-01p, 1994.

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.; Muller, R.H.; Babel, W. (2002). The two enantiospecific dichloroprop/*f*_l-ketoglutarate-dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 from protein and sequence data of RdpA and SdpA. *Microbiol. Res.* 157:317-22.

Westendorf, A.; Muller, R. H.; Babel, W. (2003). Purification and characterization of the enantiospecific dioxygenases from *Delftia acidovorans* MC1 initiating the degradation of phenoxypropionatos and phenoxyacetate herbicides. *Acta Biotechnol.* 23: 3-17.

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.; Lira, J. M.; Walsh, T.; Merlo, D. J.; Jayakumar, P.; Lin, G. (2007). Novel Herbicide Resistance Genes. World Intellectual Property Organization International Publication Number WO 2007/053482 A2

Wright TR, Shan G, Walsh TA, Lira JM, Cui C, Song P, Zhuang M, Arnold NL, Lin G, Yau K, Russell SM, Cicchillo RM, Peterson MA, Simpson DM, Zhou N, Ponsamuel J, Zhang Z. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 23;107(47):20240-5.

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

Wohlleben et al., (1992) Identification and characterization of phosphinothricin-tripeptide bisyntohetic genes in *Streptomyces viridochromogenes*. *Gene* 115:127-132.

Zech, W.; Senesi, N.; Guggenberber, G; Kaiser, K.; Lehmann, J.; Milano, T. M.; Miltner, A; Schroth, G. (1997). Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, v.79, p.117-161, 1997.

XII. Votos Contrários:

Votaram pelo indeferimento da Proposta:

- Paulo Kageyama – Representante do Ministério do Desenvolvimento Agrário.
- Suzi Barletto Cavalli – Especialista em Agricultura Familiar.

27

Brasília, DF, 09/04/2015

Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio

Assessor: Gutemberg D. Sousa