

PARECER TÉCNICO Nº 4867/2015

Processo nº: 01200.003948/2012-75

Data de Protocolo: 25/9/2012

Requerente: Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda.

CQB: 107/99

Total de Páginas: 461

CNPJ: 08.636.452/0001-76

Endereço: Avenida das Nações Unidas, 14171, 2º andar, Edifício Diamond Tower, Santo Amaro, São Paulo - SP

Presidente da CIBio: Mário Von Zuben

Extrato Prévio: 3408/2012, publicado em 31/10/2012

Resolução Normativa: RN 05/2008

Finalidade (objetivo): Liberação comercial da soja DAS-44406-6 e seus derivados

Reunião: 188ª Reunião Ordinária, ocorrida em 10 de dezembro de 2015

Decisão: DEFERIDO

TÍTULO DA PROPOSTA: “Relatório de Biossegurança da soja DAS-44406-6”

Descrição do OGM: Soja DAS-44406-6 com tolerância aos herbicidas 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), glifosato e glufosinato de amônio.

Proteínas Expressas:

- CP4-EPSPS – Confere tolerância ao herbicida glifosato;
- PAT – Confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio;
- AAD-1 – Confere tolerância ao herbicida 2,4-D

I – SOLICITAÇÃO

A Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda, através dos requisitos estabelecidos na Resolução Normativa 05 da CTNBio, solicita liberação comercial da soja DAS-44406-6 para efeito de sua liberação no meio ambiente, cultivo, produção, manipulação, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, descarte e qualquer outra atividade da soja DAS-44406-6 e progênes e seus derivados, nos termos da Resolução Normativa Nº. 5 da CTNBio, do Decreto Nº. 5.591 e da Lei nº. 11.105/05.

A soja DAS-44406-6 é portadora do gene *aad-12 v1* que codifica a proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12) a qual confere à soja tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), do gene *2mepsps* que codifica a proteína 2mEPSPS a qual confere tolerância ao herbicida glifosato e do gene *pat v6* que codifica a proteína PAT a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

Este OGM foi aprovado em várias agências reguladoras dos países: Austrália em 2013 (alimentação), Canadá em 2013 (alimentação/ração animal/cultivo), Japão em 2014 (alimentação e cultivo), México em 2014 (alimentação), Nova Zelândia em 2013 (alimentação), África do Sul em 2013 (alimentação e ração animal), Coreia do Sul em 2014 (ração animal), Taiwan em 2014

(alimentação), Estados Unidos em 2014 (alimentação/ração/cultivo) – Fonte: www.isaaa.org e recentemente (Abril de 2015) na Argentina (alimentação/ração/cultivo) – Fonte: MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y PESCA, Resolución 98/2015 (EXPEDIENTE # S05: 0004984/2015). O produto ainda está em avaliação no Brasil e em alguns países importadores de grãos.

A biossegurança do OGM foi avaliada nos Estados Unidos em várias localidades, a saber: Sycamore, Georgia; Richland, Iowa; Bagley, Carlyle, Illinois; Wyoming, Illinois; Sheridan, Indiana; Deerfield, Michigan; Fisk, Missouri; Brunswick, Nebraska; York, Nebraska. No Brasil, vários estudos a campo conduzidos com autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) demonstram a eficácia, a praticabilidade agrônômica e a biossegurança do uso da soja DAS-44406-6 para cultivo em nosso país. Para os ensaios foram conduzidos conforme a legislação nacional em Cravinhos-SP e Uberlândia-MG por meio da Liberação Planejada no Meio Ambiente (LPMA – P736), processo da CTNBio 01200.000624/2010-13 e em Indianópolis-MG, Montividiu-GO e Cravinhos-SP, por meio da Liberação Planejada no Meio Ambiente (LPMA – P1047), processo da CTNBio 01200.003916/2012-70.

Na CTNBio, o pedido de liberação comercial sob o processo 01200.003948/2012-75 foi protocolado pela empresa em 25 de setembro de 2012. Em maio de 2013, a solicitação para liberação comercial foi aprovada na subcomissão Humana e Animal. Além disso, a soja DAS-44406-6 não difere da soja convencional em sua composição química e nutricional, exceto pela presença e expressão dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat*, que conferem tolerância aos herbicidas 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio. A setorial Humana/Animal concluiu que o cultivo da soja DAS-44406-6 e o consumo da planta ou de seus derivados não causará efeitos adversos ao meio ambiente ou à saúde humana e/ou animal, sendo tão seguro quanto a soja convencional. As proteínas codificadas pelos genes citados não apresentam similaridade com as proteínas consideradas alergênicas ou tóxicas.

As características da planta geneticamente modificada, as informações coletadas durante os testes nos campos e as análises laboratoriais apresentadas no processo permitem concluir que o cultivo e consumo da soja DAS-44406-6 são tão seguros ao meio ambiente e à saúde humana e/ou animal quanto a soja convencional.

II - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A soja DAS-44406-6 foi obtida por transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA101, utilizando o plasmídeo pDAB8264.

A soja DAS-44406-6 é portadora do gene *aad-12 v1* que codifica a proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12) a qual confere à soja tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), do gene *2mepsps* que codifica a proteína 2mEPSPS a qual confere tolerância ao herbicida glifosato e do gene *pat v6* que codifica a proteína PAT a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

Este produto foi desenvolvido com o objetivo de fornecer ao agricultor uma maior flexibilidade na escolha de herbicidas para o controle de plantas daninhas que infestam a cultura da soja.

A linhagem de soja DAS-44406-6 foi obtida através de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* usando o plasmídeo pDAB8264. O inserto (T-DNA) do plasmídeo contém uma construção gênica, contendo os genes *aad-12* provenientes de

Delftia acidovorans, *2mepsps* proveniente de *Zea mays* e *pat* proveniente de *Streptomyces viridochromogenes*, otimizados para expressão em plantas.

A enzima AAD-12 é uma dioxigenase α -cetoglutarato 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), 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. O gene *pat* tem sido usado com frequência em trabalhos de biotecnologia vegetal como inibidor da glutamina sintetase conferindo às plantas tolerância ao glufosinato de amônio ou bialofós, tornando-se bem conhecido da comunidade científica e agências regulatórias.

A proteína 2mEPSPS é insensível ao glifosato, proporcionando assim a tolerância das plantas a esse herbicida. O gene *2mepsps* (também conhecido como *dmmg*, mEPSPS) foi introduzido em milho como fonte de tolerância ao glifosato no evento GA21 (identificado na OECD como MON-ØØØ21-9) e tem sido aprovado por agências regulatórias de vários países, sendo considerado seguro para alimentos e rações e para o meio ambiente (USDA, 1997). O mesmo gene está presente em outros produtos aprovados por agências regulatórias dos Estados Unidos, como no algodão GlyToTM (identificado na OECD como BCS-GHØØ2-5), e a soja FG-72 (identificada na OECD como MST-FGØ72-3).

Análises de *Southern Blot* para caracterização molecular do evento DAS-44406-6 confirmaram que apenas um único e intacto inserto dos genes *aad-12*, *pat* e *2mepsps* foi integrado no genoma da soja. Uma cópia única de cada um dos elementos genéticos do cassete de expressão do gene *aad-12*, *pat* e *2mepsps* está presente e a integridade do fragmento de DNA inserido foi demonstrada em três diferentes gerações de cruzamentos, confirmando a estabilidade genética durante os procedimentos de melhoramento clássico de plantas. As análises de *Southern Blot* também confirmaram a ausência de sequências indesejadas de DNA, como as do plasmídeo original, na soja portadora do evento DAS-44406-6. Os estudos de segregação em cada uma das várias gerações de cruzamento confirmaram a herdabilidade mendeliana prevista para os genes *aad-12*, *pat* e *2mepsps*.

A proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12) é derivada de *Delftia acidovorans*, uma bactéria de solo gram-negativa. Essa proteína é composta por 293 aminoácidos e possui o peso molecular de aproximadamente 32 kDa. A caracterização detalhada da proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12) proveniente de plantas de soja DAS-44406-6 foi feita utilizando um sistema heterólogo de microorganismos (*Pseudomonas fluorescens*). Adicionalmente aos testes laboratoriais, a caracterização da expressão da proteína AAD-12 nas plantas de soja portadoras do evento DAS-44406-6 foi feita no decorrer do ciclo de crescimento das plantas, analisando diferentes tecidos como folha, planta inteira, raiz e grãos que receberam aplicação dos herbicidas 2,4-D, glufosinato e glifosato, comparativamente às plantas não pulverizadas.

A enzima AAD-12 é uma dioxigenase dependente de α -cetoglutarato que degrada o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), através da catálise de conversão de 2,4-D em 2,4-Diclorofenol (DCP), em um composto sem atividade herbicida (Müller *et al.*, 1999;

3

Westendorf *et al.*, 2002 e 2003; Wriugh *et al.*, 2005). 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 sequência de aminoácidos da proteína expressa na soja é idêntica à da enzima natural exceto pela adição de uma alanina na posição número 2. A alanina adicional compõe parte do sítio de restrição da enzima *Nco* I (CCATGG), contendo também o códon de início da tradução ATG. O códon adicional tem o duplo propósito de facilitar as subseqüentes operações de clonagem e de aprimorar o contexto da sequência flanqueadora do códon iniciador ATG para otimizar o início da tradução (Kozak, 1984). As proteínas codificadas pelo gene sintético e pelo gene natural são 99,3% idênticas, diferindo apenas no aminoácido número 2. A proteína AAD-12 é constituída de 293 aminoácidos e possui peso molecular de aproximadamente 32 kDa

A expressão da proteína ariloxialcanoato dioxigenase (AAD-12) confere às plantas transgênicas a tolerância ao herbicida 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) através da catálise da conversão de 2,4-D para 2,4-Diclorofenol (DCP) (Müller *et al.*, 1999; Westendorf *et al.*, 2002 e 2003; Wright *et al.*, 2007), produto sem qualquer atividade herbicida (Figura 28). A proteína AAD-12 também é capaz de degradar herbicidas do tipo fenoxiacetato aquiral como o MCPA (ácido (4-cloro-2-metil-fenoxi) acético) e herbicidas à base de piridiloxiacetato como triclopir e fluroxipir, resultando em compostos inativos como fenóis e piridinóis, respectivamente

As proteínas AAD-12, PAT e 2mEPSPS foram caracterizadas bioquimicamente, e sua expressão foi medida através de análise por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) específico. A expressão das proteínas foi avaliada em folhas, raízes, forragem e grãos. Os resultados mostraram baixos níveis de expressão das proteínas AAD-12, PAT e 2mEPSPS, indicando baixa exposição potencial a humanos e animais.

As proteínas AAD-12, PAT e 2mEPSPS foram estudadas para detectar efeitos adversos potenciais a humanos e animais. Estudos através de bioinformática revelaram a ausência de similaridade das sequencias de aminoácidos das três proteínas com sequencias de proteínas tóxicas ou alergênicas e nenhuma evidência foi encontrada para a glicosilação das proteínas AAD-12, PAT e 2mEPSPS. As proteínas estudadas degradam-se rapidamente na presença de fluídos gástricos simulados e de altas temperaturas durante o processamento industrial, anterior ao consumo da soja. Além disso, o óleo de soja é praticamente livre de proteínas.

Estudos a campo conduzidos com a autorização da CTNBio demonstraram a eficácia e praticabilidade econômica do uso da soja DAS-44406-6 em condições de cultivo no Brasil, confirmando resultados semelhantes aos obtidos nos Estados Unidos. Os resultados desses estudos demonstraram também que a soja DAS-44406-6 é similar a cultivar convencional em características agrônômicas como emergência, vigor, altura de planta, acamamento, etc. A soja DAS-44406-6, à semelhança da soja convencional, não exhibe tendência a proliferar-se como plantas daninhas e não é invasiva em ecossistemas naturais.

Nenhuma vantagem competitiva para a sobrevivência ou dispersão da soja é proporcionada pelos genes *aad-12*, *pat* e *2mepsps* introduzidos na soja DAS-44406-6, quando comparada à soja convencional.

Foram realizados estudos de composição química e nutricional de forragem e grãos de soja DAS-44406-6 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-44406-6 não difere da soja convencional em sua composição química e nutricional, exceto pela presença e expressão dos genes *aad-12*, *pat* e

2mepsps que conferem resistência aos herbicidas 2,4-D e glufosinato de amônio e glifosato, respectivamente.

As características da planta geneticamente modificada, as informações coletadas durante os testes de campo e as análises laboratoriais apresentadas neste documento confirmam os dados obtidos nos Estados Unidos, comprovando que o cultivo e o consumo da soja DAS-44406-6 é tão seguro ao meio ambiente e à saúde humana e animal quanto à soja convencional. A disponibilidade da soja DAS-44406-6 terá um impacto positivo nas práticas de controle de plantas daninhas, constituindo-se numa alternativa importante para atender às necessidades dos produtores de soja no Brasil.

II.1. ASPECTOS DA SUBCOMISSÃO VEGETAL/AMBIENTAL

A linhagem de soja DAS-44406-6 foi obtida através de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* usando o plasmídeo pDAB8264. O inserto (T-DNA) do plasmídeo contém uma construção gênica, contendo os genes *aad-12* provenientes de *Delftia acidovorans*, *2mepsps* proveniente de *Zea mays* e *pat* proveniente de *Streptomyces viridochromogenes*, otimizados para expressão em plantas.

A enzima AAD-12 é uma dioxigenase α -cetoglutarato 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), 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 microrganismos, plantas e animais, com a propriedade de se degradar rapidamente em temperaturas elevadas. O gene *Pat* tem sido usado com frequência em trabalhos de biotecnologia vegetal como inibidor da glutamina sintetase conferindo às plantas tolerância ao glufosinato de amônio ou bialofós, bem conhecido da comunidade científica e agências regulatórias. Trata-se de uma proteína amplamente utilizada em outros produtos comerciais, sem registro de efeitos adversos ao meio ambiente e saúde humana e animal.

A proteína 2mEPSPS é insensível ao glifosato, proporcionando assim a tolerância das plantas a esse herbicida. O gene *2mepsps* (também conhecido como *dmmg*, mEPSPS) já foi introduzido anteriormente em milho como fonte de tolerância ao glifosato no evento GA21 (identificado na OECD como MON-ØØØ21-9) e tem sido aprovado por agências regulatórias de vários países, sendo considerado seguro para alimentos e rações e para o meio ambiente (USDA, 1997).

O mesmo gene está presente em outros produtos aprovados por agências regulatórias dos Estados Unidos, como no algodão GlyTol™ (identificado na OECD como BCS-GHØØ2-5).

II.2. ANÁLISES MOLECULARES E BIOQUÍMICAS

Análises de *Southern Blot* para caracterização molecular do evento DAS-44406-6 confirmaram que apenas um único e intacto inserto dos genes *aad-12*, *Pat* e *2mepsps* foi integrado no genoma da soja. Uma cópia única de cada um dos elementos genéticos do cassete

de expressão do gene *aad-12*, *Pat* e *2mepsps* está presente e a integridade do fragmento de DNA inserido foi demonstrada em três diferentes gerações de cruzamentos, confirmando a estabilidade genética durante os procedimentos de melhoramento clássico de plantas. As análises de *Southern Blot* também confirmaram a ausência de sequências indesejadas de DNA, como as do plasmídeo original, na soja portadora do evento DAS-44406-6. Os estudos de segregação em cada uma das várias gerações de cruzamento confirmaram a herdabilidade mendeliana prevista para os genes *aad-12*, *pat* e *2mepsps*.

As proteínas AAD-12, PAT e 2mEPSPS foram caracterizadas bioquimicamente, e sua expressão foi medida através de análise por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) específico. A expressão das proteínas foi avaliada em folhas, raízes, forragem e grãos. Os resultados mostraram baixos níveis de expressão das proteínas AAD-12, PAT e 2mEPSPS, indicando baixa exposição potencial a humanos e animais.

Os dados apresentados mostram a estabilidade e uniformidade na expressão das proteínas AAD-12, 2mEPSPS e PAT em diferentes locais e experimentos. Estas características demonstram que os genes inseridos se comportam como genes endógenos, cuja expressão não está sujeita a influência de fatores externos além daqueles esperados para todos os genes. Estas evidências corroboram a estabilidade gênica e efeito esperado para o inserto.

Os resultados da caracterização bioquímica realizada demonstraram a equivalência da proteína 2mEPSPS heteróloga, produzida pelo microorganismo *P. fluorescens*, com a proteína purificada do tecido vegetal da soja DAS-44406-6. A proteína 2mEPSPS derivada do microorganismo e da planta mostraram peso molecular esperado de aproximadamente 47 kDa (SDS-PAGE) e foram imunorreativas aos anticorpos específicos para esta proteína pela análise por *Western Blot*. A sequência de aminoácidos de ambas as proteínas foi confirmada por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). As extremidades N e C-terminal das proteínas oriundas das 2 fontes diferentes mostraram serem idênticas através das análises por MALDI-TOF MS/MS e ESI-LC/MS. Além disso, a ausência de glicosilação da proteína 2mEPSPS derivada da planta forneceu uma evidência adicional de que a proteína 2mEPSPS produzida por *P. fluorescens* e pela soja DAS-44406-6 são bioquimicamente equivalentes.

O padrão de segregação do inserto no decorrer da geração segregante foi demonstrado através da detecção da expressão da proteína e pelas análises de PCR evento-específico de plantas individuais da geração F2 da soja portadora do evento DAS-44406-6. Para esse estudo a geração F1 originou-se do cruzamento entre plantas T2 de soja DAS-44406-6 e uma linhagem de soja convencional. As plantas F1 resultantes de cruzamento foram autopolinizadas para produzir as sementes F2.

Um total de amostras de folhas de 119 plântulas F2 foram testadas para a presença ou ausência do inserto DAS-44406-6 através de análise específica de PCR (Mo, 2011). O DNA genômico de cada uma das 119 plantas, foi analisado via PCR para o evento específico da soja DAS-44406-6. Das 119 plantas, 96 plantas foram positivas para a presença do inserto DAS-44406-6, e 23 plantas forma negativas (*null segregante*).

As observações ao longo das primeiras 5 gerações da soja DAS-44406-6 indicaram que a inserção dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* não produziram alterações na morfologia das plantas hospedeiras, e em características agrônômicas, reprodutivas e na composição química e nutricional dos grãos e da forragem, indicando ausência de interações dos genes exógenos introduzidos e os genes endógenos do genoma receptor. Ao longo do trabalho de coleta de dados, várias características das plantas geneticamente modificadas foram analisadas comparativamente à soja isolinha convencional. Nestas pesquisas, um número grande de genes responsáveis por

diversas características acaba sendo indiretamente avaliado, dando oportunidade para se detectar interações entre os genes *aad-12*, *2mepsps* e *Pat* e os genes da soja hospedeira. Entretanto, nenhuma alteração nas características estudadas foi observada nas várias gerações avaliadas.

Estudos realizados nos EUA e no Brasil envolveram a análise de caracteres fenotípicos, agrônômicos (itens 2.2.1 a 2.2.5, ANEXO IV do processo), de composição de nutrientes (item 3.1 a 3.2., Anexo III do processo), do efeito da soja DAS-44406-6 em características químicas e físicas do solo (item 9, Anexo IV do processo), da degradabilidade da matéria orgânica das plantas no solo (item 10, Anexo IV do processo) e do efeito das plantas transgênicas no estado nutricional das plantas (item 9.2., Anexo IV do processo). Em todos esses estudos não foi detectado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a soja DAS-44406-6 e seu controle convencional de mesmo *background* genético, que poderia indicar a ocorrência de interações dos genes inseridos na soja DAS-44406-6 e demais genes do genoma com surgimento de efeitos pleiotrópicos e epistáticos detectáveis, permanecendo a soja geneticamente modificada com o mesmo fenótipo da convencional, exceto pela característica inserida.

Os diversos estudos que representam esta análise de risco, associados ao grande número de características avaliadas, permite concluir que nenhuma evidência de efeito pleiotrópico ou epistático associado aos genes inseridos foi observado.

A estabilidade genotípica já foi referida no presente parecer. A caracterização molecular da soja DAS-44406-6 por análise de *Southern blot* confirmou a inserção do inserto único T-DNA a partir do plasmídeo pDAB8264 contendo uma única cópia intacta de cada um dos genes *2mepsps*, *aad-12* e *pat*. Nenhum fragmento adicional de DNA do vetor original, além dos cassetes de expressão de *2mepsps*, *aad-12* e *pat*, foram identificados na soja DAS-44406-6. O inserto de T-DNA para a soja DAS-44406-6 mostrou ser integrado de forma estável ao longo de cinco gerações distintas (T2, T3, T4, T6, e F2) testadas.

No item 12 do Anexo II do processo, através da análise de segregantes numa geração F2, envolvendo o gene *Pat* foi demonstrado o padrão de herança mendeliana esperado para uma inserção única (1 locus). Outra evidência de estabilidade genotípica radica-se no padrão de segregação de uma geração de cruzamento BC1F2, envolvendo os genes *aad-12* e *2mepsps* da soja DAS-44406-6. A presença ou ausência de *aad-12* e *2mepsps* foi determinada usando a aplicação do herbicida (2,4-D + glifosato), no qual é específico para as proteínas AAD-12 e 2mEPSPS expressas na soja. A taxa de segregação esperada foi de uma proporção de 3:1 de plantas contendo os genes *aad-12* e *2mepsps* (homozigotas + heterozigotas) em comparação às plantas sem o gene (Tabela 27 da página 153 do processo), obedecendo assim, um padrão de herança mendeliana típica.

As proteínas PAT, AAD-12 e 2mEPSPS, presentes na construção gênica do evento DAS-44406-6, possuem ação específica sob seus respectivos substratos. As observações em diversas gerações da soja DAS-44406-6 mostram que a presença dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *Pat* não produziu alterações em características das plantas hospedeiras, incluindo características agrônômicas e reprodutivas, indicando ausência de interações entre estes genes.

Os estudos de expressão das proteínas demonstram um padrão consistente de expressão das proteínas PAT, AAD-12 e 2mEPSPS em diversos tecidos e locais distintos de cultivo. Uma eventual interação entre estas proteínas teria sido detectada através de alterações na expressão dessas enzimas nos vários ambientes estudados.

Os vários estudos realizados em condições ambientais distintas (Brasil e Estados Unidos) demonstram que os genes *aad-12*, *2mepsps* e *Pat* e respectivas proteínas introduzidas na soja DAS-44406-6 não apresentam interação com os genes endógenos da soja.

As informações e dados experimentais presentes neste documento demonstram que a soja DAS-44406-6 é equivalente à soja convencional em todas as suas características fenotípicas, agrônomicas, fisiológicas e bioquímicas, com a única diferença representada pelas características específicas aportadas pelos genes inseridos (item 2.2.1 a 2.2.5, Anexo IV do processo).

II.3. ANÁLISES FENOLÓGICAS

O fenótipo das plantas transformadas contendo o evento DAS-44406-6 é equivalente 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 DAS-44406-6, assim como a soja convencional, não é uma espécie invasiva em ecossistemas naturais e não apresenta tendência de proliferar-se como planta daninha.

As modificações genéticas incluídas na soja DAS-44406-6, descritas em detalhes no item 3 do Anexo II do processo, não possuem qualquer ação ou relação com os processos naturais de reprodução, disseminação e sobrevivência da espécie receptora.

Insetos, como *Trigona spinipes* Fabricius (Hymenoptera: Apidae) e principalmente *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), podem transportar o pólen e realizar a polinização de flores de diferentes plantas (ABUD *et al.*, 2007). No entanto, a flor de soja é pouco atraente para abelhas, que são os agentes polinizadores mais eficientes na soja, sendo que a taxa de cruzamento natural da soja raramente vai além de um por cento para qualquer variedade (ABUD *et al.*, 2007; NELSON e BERNARD, 1984). Estudos realizados em casa de vegetação indicaram que não houve diferença nestes parâmetros entre a soja FG72 e a soja não GM.

A soja é uma planta de autofecundação, em consequência da autopolinização ocorrer com estigma receptivo e anteras liberando pólen antes da abertura das flores (Ahrent & Caviness, 1994). Dessa forma é praticamente insignificante a disseminação dos genes por polinização cruzada entre plantas da mesma espécie. Tem sido amplamente demonstrado que a polinização cruzada em soja é praticamente inexistente mesmo a partir de pequenas distâncias, nas condições de cultivo a campo (Garber & Odland, 1926; Woodworth, 1928; Weber & Hanson, 1961; Beard & Knowles, 1971; Ahrent & Caviness, 1994, Caviness 1966 e 1970).

Em estudos no Brasil determinou-se que a taxa de cruzamento em soja foi de apenas 1,3% entre plantas em contato direto (Borém, 1999) e de 0,03 a 0,3% em plantas adjacentes (Borém, 1999; Schuster *et al.*, 2007; Abud *et al* 2003).

Não se espera hibridação introgressiva da soja DAS-44406-6 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).

A tolerância da soja DAS-44406-6 aos herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio não aumenta sua capacidade de proliferação, colonização ou sobrevivência no meio ambiente. Nenhuma das proteínas expressas pelo evento DAS-44406-6 afeta o potencial de sobrevivência da planta de soja DAS-44406-6, uma vez que a sobrevivência de um organismo em um meio ambiente depende de alterações morfológicas e fisiológicas que não ocorrem nas plantas da soja DAS-44406-6 (item 2.2.1 a 2.2.5., Anexo IV do processo). Como consequência, nenhuma vantagem competitiva para a sobrevivência ou

dispersão da planta no meio ambiente pode ser atribuída à introgressão dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* em cultivares de soja.

O fenótipo das plantas transformadas contendo os genes *aad-12*, *2mepsps* e *Pat* é similar ao fenótipo da planta original no que se refere aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento da planta e ao seu método de propagação. Além disso, a soja contendo os genes *aad-12*, *2mepsps* 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. Em resumo, a presença do inserto não alterou nenhuma das características botânicas da soja, devendo a mesma se comportar como qualquer outra soja em seu ambiente de cultivo, nas diversas regiões do Brasil.

Os genes *aad-12*, *2mepsps* e *Pat* conferem tolerância apenas aos herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, de forma que a soja DAS-44406-6 não codifica proteínas com outros efeitos (inseticida, nematicida, fungicida, bactericida, etc.). Dessa forma, cultivares de soja DAS-44406-6, assim como cultivares de soja convencional, têm suas características de susceptibilidade a pragas e doenças definidas pela herança genética do germoplasma que as originou.

O gene *aad-12* é proveniente de *Delftia acidovorans* e o gene *Pat* é proveniente do microrganismo *Streptomyces viridochromogenes*, sendo que ambos os organismos ocorrem naturalmente no solo e estão presentes na natureza. Sendo assim os organismos do solo, possíveis receptores dos genes *aad-12* e *Pat* das plantas de soja DAS-44406-6, não teriam um risco maior caso recebessem os mesmos genes dos microrganismos *Delftia acidovorans* e *Streptomyces viridochromogenes* já presentes no ambiente, e os quais seres humanos e animais estão expostos há muito tempo. O organismo doador do gene *2mepsps* é o milho (*Zea mays*), que é o cereal cultivado mais consumido na alimentação e ração, não apresentando nenhum risco aos seres humanos e animais.

Extensa experimentação comparando-se a soja DAS-44406-6 e seu controle isolinha convencional foi realizada em condições agrônomicas e ambientais distintas nos Estados Unidos e Brasil.

II.4 – AVALIAÇÕES AGRONÔMICAS

As características agrônomicas são resultantes de atributos morfológicos e fisiológicos codificados por um grande número de genes da espécie que podem dar oportunidade para o surgimento de alterações devido à inserção de genes exógenos na espécie hospedeira, resultando desta forma no valor dessas características para a avaliação da segurança ambiental de um organismo transformado.

A avaliação dos dados agrônomicos das características de crescimento da planta no período de cultivo demonstrou a equivalência da soja DAS-44406-6 com a soja convencional não transgênica.

As características fenotípicas e de crescimento da planta que respondem aos fatores de estresse ecológicos, a resposta à pressão de insetos e doenças nas condições de campo dos diversos ambientes e as características de germinação e dormência da soja DAS-44406-6 não foram alteradas em relação à soja convencional. Portanto, esses dados reforçam a conclusão de que as características agrônomicas, e de susceptibilidade a doenças e pragas da soja DAS-44406-6 não são significativamente diferentes das da soja controle e nada indica que a soja DAS-44406-

6 possa representar um risco significativo ao ambiente distinto dos riscos que possam ocorrer com a própria soja convencional.

Sementes remanescentes no solo podem germinar na safra seguinte, caso as condições de temperatura e umidade do solo sejam favoráveis. Entretanto, as plantas voluntárias (tigueras) de soja com os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat*, assim como as da soja convencional são facilmente eliminadas através de métodos manuais (capinas, arranquio, etc.), mecânicos (roçadas, trituração, incorporação, etc.) ou por métodos químicos (herbicidas). A única diferença nesse último caso é que as plantas voluntárias de soja DAS-44406-6 deverão ser controladas com herbicidas cujos ingredientes ativos sejam diferentes de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, e que sejam registrados para essa modalidade de uso, quando o agricultor decidir pelo controle químico das tiguerras.

II.5 – ORGANISMOS SIMBIONTES

Quanto a organismos simbiotes, a soja é uma das culturas que fixa N₂ atmosférico devido à associação simbiótica de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium*. A inoculação das sementes com a bactéria do gênero *Rhizobium* é uma das práticas adotadas. Essa associação pode ocorrer também com algumas espécies desta bactéria naturalmente presentes nos solos.

Os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* conferem tolerância apenas aos herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio à soja DAS-44406-6 e não codificam proteínas com outros efeitos (inseticida, nematicida, fungicida, bactericida, etc.), tampouco participam de cadeias bioquímicas para fixação do nitrogênio no solo.

Estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos evidenciaram que o OGM não apresentou nenhuma característica dispare da sua contraparte convencional, no que se refere as características agrônomicas, morfológicas, reprodutivas (itens 2.2.1 a 2.2.5, Anexo IV) assim como é equivalente em composição química e nutricional (itens 3.1. a 3.3., Anexo III), com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas à base de glufosinato de amônio pela expressão do gene *pat*, a herbicidas à base de glifosato pela expressão do gene *2mepsps* e a herbicidas à base de 2,4-D pelo gene *aad-12*. Nenhuma alteração no comportamento agrônomico da soja DAS-44406-6 foi verificado.

Com relação à transferência horizontal de genes, não existe qualquer mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva de que o DNA possa se transferir de plantas para microrganismos (Connor *et al.*, 2003; Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh *et al.*, 1994; Prins & Zadoks, 1994; Schluter *et al.*, 1995). Mesmo que uma transferência pudesse ocorrer, os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pa* presentes no evento DAS-44406-6 não trariam nenhum risco à saúde humana ou ao meio ambiente, baseado nos dados de segurança apresentados nesta petição.

II.6 - OUTRAS OBSERVAÇÕES

INCIDÊNCIA DE DOENÇA E DANOS POR INSETOS

Os ensaios de campo com a soja DAS-44406-6 foram monitorados quanto a incidência de doenças e pragas na soja DAS-44406-6 em comparação com a variedade de soja convencional presente no mesmo ensaio de campo. Os danos causados por doença e insetos foram os resultados das médias de dez locais mostraram que nenhuma diferença significativa foi

10

encontrada para incidência de doenças e ataques de insetos entre as plantas DAS-44406-6 e as plantas de soja convencional. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para a incidência de doenças e por danos causados por insetos pelo teste F, entre a soja DAS-44406-6 (com ou sem aplicação de herbicida) e a soja controle.

II.7 – CONCLUSÕES DOS ESTUDOS DE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS, DOENÇAS E PRAGAS

As características fenotípicas e de crescimento da planta que respondem aos fatores de estresse ecológicos, a resposta à pressão de insetos e doenças nas condições de campo dos diversos ambientes e as características de germinação e dormência da soja DAS-44406-6 não foram alteradas em relação às soja controle convencional. Portanto, esses dados reforçam a conclusão de que as características agronômicas, e de susceptibilidade a doenças e pragas da soja DAS-44406-6 não são significativamente diferentes das da soja controle e nada indica que a soja DAS-44406-6 possa representar um risco significativo ao ambiente distinto dos riscos que possam ocorrer com a própria soja convencional.

II.8 - SEGURANÇA AMBIENTAL DA SOJA DAS-44406-6

Estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos demonstraram que a soja DAS-44406-6 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*, a herbicidas à base de glifosato pela presença do gene *2mepsps* e a herbicidas à base de 2,4-D pela presença do gene *aad-12*.

A soja é uma planta de autofecundação, em consequência da autopolinização ocorrer com estigma receptivo e anteras liberando pólen antes da abertura das flores (Ahrent & Caviness, 1994). Dessa forma é praticamente insignificante a disseminação dos genes por polinização cruzada entre plantas da mesma espécie. Tem sido amplamente demonstrado que a polinização cruzada em soja é praticamente inexistente mesmo a partir de pequenas distâncias, nas condições de cultivo a campo (Garber & Odland, 1926; Woodworth, 1928; Weber & Hanson, 1961; Beard & Knowles, 1971; Ahrent & Caviness, 1994, Caviness 1966 e 1970).

Em estudos no Brasil determinou-se que a taxa de cruzamento em soja foi de apenas 1,3% entre plantas em contato direto (Borém, 1999) e de 0,03 a 0,3% em plantas adjacentes (Borém, 1999; Schuster *et al.*, 2007; Abud *et al* 2003).

Não se espera hibridação introgressiva da soja DAS-44406-6 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 (Sedyama *et al.*, 1999).

A tolerância da soja DAS-44406-6 aos herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio não aumenta sua capacidade de proliferação, colonização ou sobrevivência no meio ambiente. Nenhuma das proteínas expressas pelo evento DAS-44406-6 afeta o potencial de sobrevivência da planta de soja DAS-44406-6, uma vez que a sobrevivência de um organismo em um meio ambiente depende de alterações morfológicas e fisiológicas que

não ocorrem nas plantas da soja DAS-44406-6 (item 2.2.1 a 2.2.5., Anexo IV). Como consequência, nenhuma vantagem competitiva para a sobrevivência ou dispersão da planta no meio ambiente pode ser atribuída à introgressão dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* em cultivares de soja.

O fenótipo das plantas transformadas contendo os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* é similar ao fenótipo da planta original no que se refere aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento da planta e ao seu método de propagação. Além disso, a soja contendo os genes *aad-12*, *2mepsps* 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.

Os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* conferem tolerância apenas aos herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, de forma que a soja DAS-44406-6 não codifica proteínas com outros efeitos (inseticida, nematicida, fungicida, bactericida, etc.). Dessa forma, cultivares de soja DAS-44406-6, assim como cultivares de soja convencional, têm suas características de susceptibilidade a pragas e doenças definidas pela herança genética do germoplasma que as originou.

O gene *aad-12* é proveniente de *Delftia acidovorans* e o gene *pat* é proveniente do microrganismo *Streptomyces viridochromogenes*, sendo que ambos os organismos ocorrem naturalmente no solo e estão presentes na natureza. Sendo assim os organismos do solo, possíveis receptores dos genes *aad-12* e *pat* das plantas de soja DAS-44406-6, não teriam um risco maior caso recebessem os mesmos genes dos microrganismos *Delftia acidovorans* e *Streptomyces viridochromogenes* já presentes no ambiente, e os quais seres humanos e animais estão expostos há muito tempo. O organismo doador do gene *2mepsps* é o milho (*Zea mays*), que é o cereal cultivado mais consumido para alimentação e ração, não apresentando nenhum risco aos seres humanos e animais.

Sementes remanescentes no solo podem germinar na safra seguinte, caso as condições de temperatura e umidade do solo sejam favoráveis. Entretanto, as plantas voluntárias (tigueras) de soja com os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat*, assim como as da soja convencional são facilmente eliminadas através de métodos manuais (capinas, arranquio, etc.), mecânicos (roçadas, trituração, incorporação, etc.) ou por métodos químicos (herbicidas). A única diferença nesse último caso é que as plantas voluntárias de soja DAS-44406-6 deverão ser controladas com herbicidas cujos ingredientes ativos sejam diferentes de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, e que sejam registrados para essa modalidade de uso, quando o agricultor decidir pelo controle químico das tiguerras.

II.9 - POSSÍVEL VANTAGEM COMPETITIVA DA SOJA 44406-6

Nenhuma vantagem competitiva para a sobrevivência ou dispersão da planta é proporcionada pelos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* introduzidos na soja DAS-44406-6, quando comparada à soja convencional.

Estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos demonstraram que a soja DAS-44406-6 não difere da soja convencional em características agrônômicas, morfológicas e reprodutivas, sendo 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*, tolerância a herbicidas à base de glifosato pela expressão do gene *2mepsps* e a herbicidas à base de 2,4-D pelo gene *aad-12*. Através dos resultados desses estudos pode-se concluir que o

evento DAS-44406-6 não produz alterações significativas nas características botânicas, agronômicas e composição nutricional das plantas que possam diferenciá-las de seu correspondente convencional. Esses dados demonstram a equivalência dos dois produtos e ausência de interações genéticas adversas resultantes do processo de transformação.

A tolerância da soja DAS-44406-6 aos herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio não aumenta sua capacidade de proliferação, colonização ou sobrevivência no meio ambiente.

Nenhuma das proteínas expressas pelo evento DAS-44406-6 afeta o potencial de sobrevivência da planta de soja DAS-44406-6, 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-44406-6.

Como consequência, nenhuma vantagem para a sobrevivência no meio ambiente pode ser atribuída à introgressão dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* em cultivares de soja. Outro ponto importante é que esses exógenos introduzidos estão confinados com relação a espécies exóticas, pois se encontram apenas na soja cultivada do gênero *Glycine max* (L.) Merrill, e nunca foi encontrada na forma silvestre no Brasil (Sediyama *et al.*, 1999).

O fenótipo das plantas transformadas contendo os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* 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 os genes *aad-12*, *2mepsps* 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.

Os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* conferem tolerância apenas aos herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio, de forma que a soja DAS-44406-6 não codifica proteínas com outros efeitos (inseticida, nematicida, fungicida, bactericida, etc.). Dessa forma, cultivares de soja DAS-44406-6, assim como cultivares de soja convencional, tem suas características específicas de susceptibilidade a pragas e doenças definidas pela herança genética do germoplasma que as originou.

II.10 - OS EFEITOS RESULTANTES DA TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL PARA A MICROBIOTA DO SOLO, CASO OCORRA

Não é esperada transferência horizontal dos genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* para a microbiota de solo uma vez que não existe qualquer mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva de que o DNA possa se transferir de plantas para microrganismos (Connor *et al.*, 2003; Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh *et al.*, 1994; Prins & Zadoks, 1994; Schluter *et al.*, 1995). Mesmo que uma transferência pudesse ocorrer, os genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat* presentes no evento DAS-44406-6 não trariam nenhum risco à saúde humana ou ao meio ambiente, baseado nos dados de segurança apresentados nesta petição.

O gene *aad-12* é proveniente do microorganismo *Delftia acidovorans*, e o gene *pat* é proveniente do microorganismo *Streptomyces viridochromogenes*, sendo que ambos os organismos ocorrem naturalmente no solo e estão presentes na natureza. Sendo assim os organismos do solo, possíveis receptores dos genes *aad-12* e *pat* das plantas de soja DAS-44406-6, não teriam um risco maior do que se recebessem os mesmos genes dos microrganismos *Delftia acidovorans* e *Streptomyces viridochromogenes* presentes no ambiente, e os quais seres humanos e animais estão expostos há muito tempo. O gene *2mepsps* foi originalmente isolado de

milho (*Zea mays*) e não representa riscos maiores, à semelhança dos genes *aad-12* e *pat*. Este gene codifica uma proteína do tipo EPSPS, que é bastante abundante na natureza, estando presente no reino vegetal e em determinados microorganismos.

A possibilidade de transferência de material genético provenientes de grãos de soja ou de produtos feitos a partir de soja, para microorganismos no sistema gastrointestinal humano tem sido levantada, porém não existe qualquer mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva que o DNA possa se transferir de plantas para microorganismos (Calgene, 1993; WHO, 1993; FDA, 1994; Redenbaugh *et al.*, 1994; Prins & Zadoks, 1994; Schluter *et al.*, 1995) ou diretamente das plantas para células epiteliais no baixo estômago (FDA, 1994; Calgene, 1993).

II.11 - OS IMPACTOS NEGATIVOS E POSITIVOS AOS ORGANISMOS ALVO E NÃO-ALVO QUE PODERÃO OCORRER COM A LIBERAÇÃO DA SOJA DAS-44406-6

Estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos demonstraram que a soja DAS-44406-6 não difere da soja convencional em características agrônomicas, morfológicas, assim como é equivalente em composição química e nutricional, com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas à base de 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio pela expressão do genes *aad-12*, *2mepsps* e *pat*, respectivamente.

Através dos resultados desses estudos pode-se concluir que o evento DAS-44406-6 não produz alterações significativas nas características botânicas, agrônomicas e composição nutricional das plantas que possam diferenciá-lo de seu correspondente convencional. Esses dados demonstram a equivalência dos dois produtos e ausência de interações genéticas adversas resultantes do processo de transformação.

III - ASPECTOS DA SUBCOMISSÃO HUMANA/ANIMAL

III. 1 - ALERGENICIDADE E TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS PAT, AAD-12 E 2MEPSPS PRESENTES NA SOJA DAS-44406-6

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 varias partes da planta entre 0,001 a 0,0002 % da proteína total. Demonstrou-se ser facilmente degradável no fluido gástrico (digerida em menos de 15 segundos, Figs. 63 e 64) 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) será 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).

O consumo usual de soja no Japão onde o consumo é máximo indica (FAO/WHO) ~ 3 g/kg/dia para adultos e ~5,6 g/kg/dia.

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 varias partes da planta abaixo de 0,01 % da proteína total. Demonstrou-se ser facilmente degradável no fluido gástrico (digerida em 30 segundos, Figs. 61 e 61) 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 (Wiescinski & Golden, 2008). 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.

A proteína 2mEPSPS esta presente nos alimentos vegetais que consumimos regularmente e a alteração molecular que confere resistência ao glifosato em nada modifica sua função metabólica. É rapidamente digerida (30 seg., Figs. 65 e 66) em fluidos gástricos simulados e não exibe toxicidade aguda em ratos na dose de 5.000 mg/kg de peso vivo. Não é glicosilada e não apresenta homologia com proteínas com potencial alergênico. Também não apresenta homologia com proteínas tóxicas conhecidas. Seu MOE estimado é maior que 40.000

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.

III. 2 - CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

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-44406-6 sem pulverização, tratada com glufosinato, glifosato, com 2,4-D e com todos os três em 10 localidades nos EUA. Os valores e intervalos de variação permitem concluir que a soja DAS-44406-6 é substancialmente equivalente à isolinha. A análise de minerais comparou os teores de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, 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 (18) também seguiu o mesmo protocolo. 22 ácidos graxos distintos foram mensurados, os antinutrientes bioativos 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. A análise de vitaminas (C e 4 tocoferóis) também demonstra equivalência. 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 também foram conduzidos no Brasil em Uberlândia, MG e Cravinhos, SP com o\ a mesma indicação de equivalência.

Frangos foram alimentados com dieta balanceada (Laboratórios Genesis Midwest) contendo cinco formulações distintas, cada com 120 aves por 42 dias: isolinha e 3 sojas convencionais e a soja DAS-44406-6. Foram tratados em 3 grupos: inicial (39% de farelo de soja), intermediário (35%) 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.

Não se constatou diferença significativa entre a soja DAS-44406-6 e as demais sendo, portanto nutricionalmente equivalentes, inclusive nos exames buscando alterações patológicas nos órgãos.

A resistência ao glufosinato em plantas transgênicas esta 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%) decorre 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 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 na rotulagem dos produtos (EPA, 2012).

IV - PARECER:

Considerando:

- 1) Que a soja, espécie *Glycine max*, está na cadeia alimentar há mais de 4.000 anos, sem relatos de danos ao homem, aos animais e ao meio ambiente;
- 2) Que durante estes milênios, não apresentou até hoje característica de planta daninha;
- 3) Que não há no Brasil espécies silvestres com que a soja possa se inter cruzar;
- 4) Que os genes inseridos se integraram em um único local do genoma da planta, as características conferidas pelos mesmos se mostraram estável ao longo de gerações e a segregação é mendeliana;
- 5) Que os estudos realizados no Brasil e Estados Unidos, demonstraram que a soja DAS-44406-6 não difere da soja convencional em características agrônomicas, morfológicas, reprodutivas, nas características de sobrevivência e na forma de disseminação das plantas, na resposta aos principais patógenos e pragas, com exceção apenas das características de tolerância aos herbicidas;

- 6) Que as análises de composição química, realizadas em liberações planejadas em diferentes locais do Brasil e dos Estados Unidos, apresentaram resultados semelhantes e mostraram que a soja transgênica é substancialmente equivalente à soja convencional;
- 7) Que os estudos de avaliação nutricional não apresentaram nenhuma alteração relacionada ao consumo da soja DAS-44406-6 em relação à soja convencional;
- 8) Que as proteínas expressas pela soja GM não apresentaram qualquer efeito tóxico ou alergênico;
- 9) Que a modificação genética introduzida não interferiu na capacidade de associação simbiótica das plantas;
- 10) As análises de biossegurança da soja DAS-44406-6 já realizadas pelos órgãos de regulamentação dos países onde a mesma já foi analisada e aprovada;
- 11) As informações atualmente disponíveis na literatura científica.

Não há evidências experimentais de que a soja DAS-44406-6 seja inferior ou apresente qualquer risco toxicológico ou nutricional para animais, que seja distinto da variedade convencional largamente utilizada. Portanto, a modificação introduzida por manipulação genética, simplesmente conferiu resistência aos herbicidas glufosinato de amônio, glifosato e 2,4-D, proporcionando vantagens agrônomicas, econômicas e ecológicas que estão sendo adequadamente avaliadas pela área vegetal da CTNBio. Conclui-se que a soja DAS-44406-6 é tão segura quanto sua equivalente convencional.

Assim, recomendamos o DEFERIMENTO da solicitação de liberação comercial da soja DAS-44406-6.

V - RESTRIÇÕES AO USO DO OGM E SEUS DERIVADOS

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “*ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação*”.

Não há diferença entre a performance agrônômica das plantas transgênicas e convencionais, bem como há equivalência substancial entre as mesmas. Assim, as informações indicam que as plantas transgênicas não diferem fundamentalmente dos genótipos de soja não transformado, com exceção da tolerância aos herbicidas. Não há também evidência de reações adversas ao uso da soja DAS-44406-6. Por essa razão, não existem restrições ao uso desta soja ou de seus derivados, seja para alimentação humana ou de animais.

A soja não é nativa do Brasil e não existe no país nenhuma espécie nativa, silvestre ou feral que possa inter cruzar com *Glycine max*. Portanto, não há riscos adicionais para o meio ambiente com o plantio da soja DAS-44406-6 além daqueles já ocasionados para as diferentes variedades de soja convencional em uso no país.

VI - CONSIDERAÇÕES SOBRE PARTICULARIDADES DAS DIFERENTES REGIÕES DO PAÍS (SUBSÍDIOS AOS ÓRGÃOS DE FISCALIZAÇÃO)

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “*ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação*”. No Brasil, não existem espécies aparentadas da soja em distribuição natural. A modificação genética introduzida não altera as características botânicas da

planta, de forma que a soja se comporta como seu contraparte convencional em condições de cultivo, exceto pela característica inserida, em qualquer região de cultivo da cultura.

VII. MONITORAMENTO

Uma importante preocupação quanto ao manejo agrícola, advém de trabalhos que já vinham sendo desenvolvidos para os possíveis manejos de plantas voluntárias (Soja, milho e algodão). O controle das plantas voluntárias de soja ganhou importância após o aparecimento dos primeiros casos de ferrugem asiática, com a regulamentação do vazio sanitário e a ampla adoção de cultivares que possuem evento de tolerância ao herbicida glifosato.

A requerente apresentou proposta de plano de monitoramento pós-liberação comercial, conforme a Resolução Normativa 09 de 2011, consistindo em um monitoramento geral visando a obtenção de informações que possam indicar possíveis efeitos adversos decorrentes da liberação comercial do evento DAS-44406-6 sobre o ambiente ou sobre a saúde humana ou animal, em consonância com sua aplicação de uso (Artigo 1º, parágrafo 1), durante um período de 5 anos.

O monitoramento poderá ser conduzido total ou parcialmente por intermédio da contratação de serviços de instituições capacitadas, conforme Artigo 1º, parágrafo 3 da Resolução Normativa N° 9.

Serão apresentados à CTNBio relatórios parciais anuais contendo os resultados do ano anterior, e um relatório final contendo a sumarização dos resultados gerados durante o período de monitoramento do milho DAS-44406-6.

Caso algum efeito adverso relacionado ao meio ambiente ou à saúde humana ou animal seja constatado durante o monitoramento geral, a requerente deverá comunicar o fato à Secretaria Executiva da CTNBio, no prazo máximo de 15 (quinze) dias da constatação, mediante a apresentação de um relatório técnico consubstanciado sobre os efeitos adversos constatados.

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 em safras seguidas, ou por falta de conhecimento do produtor, é necessário que a requerente considere ações de gestão listadas abaixo, as quais deverão ser acrescidas 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.

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

18

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.

VIII – CONCLUSÃO

Diante do exposto e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas é possível concluir que a soja DAS-44406-6 é tão segura quanto seus equivalentes convencionais. No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, Considero que o pedido atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que a soja DAS-44406-6 é substancialmente equivalente à soja convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, conclui-se que a soja DAS-44406-6 não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à da soja convencional.

Considera-se que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas ao disposto na Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

Conforme determina a Lei 11.105/05, em seu Art. 14, inciso XX, compete a CTNBio identificar as atividades e produtos decorrentes do uso de OGMs e seus derivados que possam causar degradação ao meio ambiente ou risco à saúde humana, ressalvada a aplicação da lei de agroquímicos, que possui rito específico já estabelecido no país, exceto se o OGM seja desenvolvido para servir de matéria prima para a produção de algum agroquímico (Lei 11.105/05, Art. 39). Portanto, o presente parecer considera tão somente a biossegurança da soja DAS-44406-6.

A presente análise considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; resultados de liberações planejadas no meio ambiente e textos relacionados. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros, bem como as análises já realizadas em outros países pelos respectivos órgãos de regulamentação de organismos geneticamente modificados.

IX - BIBLIOGRAFIA

1. Abud, S., Souza, P.I.M., Vianna, G.R., Leonardecz, E., Moreira, C.T., Faleiro, F.G., Junior, J.N., Monteiro, P.M.F.O., Rech, E.L., Aragão, F.J.L. (2007). Gene flow from transgenic to nontransgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.6, p. 445-452.
2. Abud, S. et al. (2003). Dispersão de pólen em soja transgênica na região do Cerrado. *Pesquisa agropecuária brasileira*. vol.38 n no 10 Brasília Oct. 2003

3. Ahrent, D.K., Caviness, C.E., 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Science* 34, 376-378.
4. Beard, B.H., Knowles, P.F., 1971. Frequency of cross-pollination of soybeans after seed irradiation. *Crop Science* 11, 489-492
5. Borém, A. (1999). Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.10, p.101-107, 1999.
6. Calgene, Inc. (1993). Food additive petition for the APH(3') II as a processing aid FDA Docket Number: 93F-0232, 1993
7. Caviness C. E. (1966). Estimates of natural cross pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6: 211-212.
8. Caviness C. E. (1970). Cross pollination in the soybean. In: *The indispensable pollinators*, Ark. Agr. Ext. Serv. Misc. Pub. pp. 127, 33-36.
9. 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.
10. Cranston, H.J., Kern, A.J., Hackett, J.L., Miller, E.K., Maxwell, B.D., Dyer, W.E., 2001. Dicamba resistance in kochia. *Weed Science* 49, 164-170.
11. 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>
12. 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
13. Garber, M. & Odland, T. G. (1926). Natural crossing in soybean. *J. Am. Soc. Agron.* 18:967-970.
14. Herouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D (2005) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants.. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134-149.
15. Herouet-Guichenev C et al (2009) Safety evaluation of the double mutant 2mEPSPS from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54:143-153.

16. 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.
17. Nagami H, Nishigaki Y, Matsushima S, Matsushita T, Asanuma S, Yajima N, Usuda M, Hirosawa M. (2005) Hospital-based survey of pesticide poisoning in Japan, 1998—2002. *Int J Occup Environ Health.* 11:180-4.
18. Nelson, R.L., Bernard, R.L. (1984). Production and performance of hybrid soybeans. *Crop Science*, v. 24, p. 549-553.
19. Mohr KI, Tebbe CC (2007) 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.* 75:573-82.
20. Prins, T. W. & Zadoks, J. C. (1994). Horizontal gene transfer in plants, a biohazard? Outcome of a literature review. *Euphytica* 76:133-138. 1994.
21. 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
22. Resolução 98/2015 (EXPEDIENTE # S05: 0004984/2015) http://www.lakaut.com.ar/acerca-de-lakaut/noticias/normativas/2015/04/ministerio-de-agricultura-ganaderia-y-pesca-secretaria-de-agricultura-ganaderia-y-pesca_2132. Acessado em 1/12/2015.
23. Sedyama, T.; Teixeira, R. C. & Reis, M. S. (1999). Melhoramento da soja. In: Borém, A. (ed.) Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV. 808p
24. Schluter K, Futterer J, Potrykus I (1995). Horizontal gene-transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia-chrysanthem*) occurs, if at all, at an extremely low-frequency. *Bio/Technology* 13: 1094–1098.
25. 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 (2006) Analysis of reproductive toxicity and classification of glufosinate-ammonium. *Regul Toxicol Pharmacol.* 44:S1-76.
26. Schuster, I.; Vieira, E.S.N.; Santana, H.; Sinhorat, D.; Silva, R.B. da; Oliveira, M.A.R. Fluxo gênico em soja na Região Oeste do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.515-520, 2007
27. Shipitalo MJ, Malone RW, Owens LB. (2008) Impact of glyphosate-tolerant soybean and glufosinate-tolerant corn production on herbicide losses in surface runoff. *J Environ Qual.* 37:401-8.

28. 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.
29. Weber, C. R, Hanson, W. D. (1961). Natural hybridization with and without ionizing radiation in soybeans. Crop Science, 1, 389-392.
30. Weber, C. R.; Fehr, W. R. (1967). Effect of hybridization and thermal neutron irradiation on quantitative characters of soybeans. Crop Science, 7, 78-81
31. WHO. (1993). Health Aspects of Marker Genes ins Genetically Modidied Plants. World Health Organization Food Safety, Geneva, Switzerland, 32 pp. 1993.
32. www.isaaa.org
33. Woodworth, C. M. (1928). Relative infrequency of soybean varieties having only one factor for yellow cotyledon. Genetics 13: 453-455
34. Wohlleben et al., (1992) Identification and characterization of phosphinothricin-tripeptide bisyntohetic genes in Streptomyces viridochromogenes. Gene 115:127-132.
35. USDA, 1997. Availability of determination of nonregulated status for genetically engineered corn line. Federal Register 62 (234): 64350-64351. www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs2/97_09901p_com.pdf.

Data: 10/12/2015

EDIVALDO DOMINGUES VELINI
Presidente da CTNBio

DELIBERAÇÃO:

A CTNBio decidiu por 16 (dezesseis) votos favoráveis à aprovação e 2 (dois) votos contrários: Dr. Paulo Yoshio Kageyama, representante do Ministério do Desenvolvimento Agrário, e Dr. Rogério Marcos Magalhães, representante do Ministério do Meio Ambiente.