PARECER TÉCNICO 5483/2017

Processo: 01200.005925/2015-48
Data de protocolo: 29/12/2015
Requerente: Centro de Tecnologia Canavieira - CTC
CQB: 006/96
CNPJ: 06.981.381/0002-02
Endereço: Fazenda Santo Antônio, s/n, Bairro Santo Antônio, Piracicaba, SP.
Presidente da CIBio: Reinaldo Montrazi Barata
Título da Proposta: Liberação Comercial de Cana-de-Açúcar Geneticamente Modificada para Resistência a Insetos
Classificação: Classe de Risco I
Resolução Normativa: RN 05/2008
Decisão: DEFERIDO
Reunião: 203ª. Reunião ordinária em 08/06/2017

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de cana-de-açúcar geneticamente modificada para resistência a insetos e derivados, evento CTB141175/01-A, para efeito de sua liberação no meio ambiente, comercialização, consumo e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e progênies dele derivadas, concluiu pelo DEFERIMENTO.

O CTC solicitou para CTNBio parecer sobre a biossegurança da cana geneticamente modificada, evento CTB141175/01-A que foi obtido por bombardeamento de células embriogênicas (calos) dos primórdios foliares (palmito) de cana-de-açúcar cultivar CTC20 com microprojéteis contendo o fragmento de DNA CTC2.nptII purificado do vetor pGH-CTC2.nptII, o qual contém os genes *cry1Ab* e *nptII*, conferindo a cana resistência a insetos.

A segurança alimentar humana e animal da presente cana foi analisada através de subsídios técnicos comparativamente à cultivar convencional.

A segurança ambiental do evento foi analisada em estudos realizados no Brasil que demonstraram que cana geneticamente modificada não difere da cana convencional em características agronômicas, morfológicas, reprodutivas, assim como é equivalente em composição química e nutricional com exceção apenas às características de resistência a insetos. 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 cana contendo o referido evento de transformação, assim como a cana convencional, não apresenta tendência a proliferar-se como planta daninha e não é uma espécie invasiva em ecossistemas naturais.

Para o presente parecer, foram analisados os relatórios apresentados pela requerente bem como literatura científica independente e subsídios de audiência pública. Considerando as particularidades das diferentes regiões do país, estudos científicos realizados para avaliação de bisseguranca, características agronômicas e fenotípicas, como parte da avaliação de risco

deste OGM, foram incluídas regiões representativas para a cultura desta variedade de cana no território brasileiro. A CTNBio concluiu que a presente cana não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à cana 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.

PARECER TÉCNICO

I – Identificação do OGM

- **Designação do OGM:** Evento CTB141175/01-A de cana-de-açúcar
- **Espécie:** Híbrido comercial de *Saccharum officinarum*
- **Característica inserida:** Resistência a insetos
- **Método de introdução da característica:** Transformação genética de calos por meio de bombardeamento
- **Uso proposto**: Liberação comercial do evento geneticamente transformado e de seus derivados e progênies nas modalidades de cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, bem como quaisquer outras atividades relacionadas.

II. Informações Gerais

Trata-se da solicitação do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC - proponente) sobre a Proposta de Liberação Comercial de Cana-de-Açúcar Geneticamente Modificada, Evento CTB141175/01-A, aprovado pela CIBio da empresa e elaborado de acordo com a Resolução Normativa Nº 05 da CTNBio, de 13 de março de 2008. A solicitação é para a liberação comercial da cana-de-açúcar evento CTB141175/01-A, seus derivados e progênies.

O evento CTB141175/01-A foi obtido por bombardeamento de células embriogênicas (calos) dos primórdios foliares (palmito) de cana-de-açúcar cultivar CTC20 com microprojéteis contendo o fragmento de DNA CTC2.nptII purificado do vetor pGH-CTC2.nptII, o qual contém os genes *cry1Ab* e *nptII*.

A cultivar CTC20 foi desenvolvida pelo CTC por meio do melhoramento genético convencional e foi lançada no mercado doméstico em 2010. Atualmente, essa cultivar é plantada nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do país, do Paraná ao estado de Goiás, regiões onde apresenta boa adaptação agronômica, destacando-se pela grande adaptabilidade ao plantio e colheita mecanizados, alto vigor de brotação de soqueira sob palha, alto potencial de produtividade agrícola, excelente perfilhamento e baixo potencial de florescimento. Estes diferenciais da cultivar CTC20, somada à sua capacidade de regeneração *in vitro*, foi o que levou o CTC a escolhê-la como base genética do evento CTB141175/01-A, com o intuito de desenvolver uma cultivar geneticamente modificada resistente ao ataque da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*). A resistência à broca-da-cana do evento CTB141175/01-A é proporcionada pela expressão do gene *cry1Ab*, originário de *Bacillus thurigiensis*, que codifica a proteína Cry1Ab, de 648 aminoácidos, com toxicidade específica para alguns insetos da Ordem Lepidoptera. O evento CTB141175/01-A apresenta ainda o gene *nptII* que

codifica a enzima neomicina fosfotransferase tipo II (NptII), de 265 aminoácidos, originária do transposon Tn5 de *Escherichia coli*. A enzima NptII confere resistência a antibióticos do tipo aminoglicosídeos como a canamicina e a geneticina, utilizados na seleção do evento CTB141175/01-A no protocolo de transformação genética. Portanto, o evento CTB141175/01-A é um produto transgênico, obtido por meio de transformação genética via biobalística e que proporciona um controle proativo da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera; Crambidae), principal praga da cultura.

Os ataques da broca têm como consequências perda de peso e morte dos brotos, perfilhos e colmos; enfraquecimento da planta favorecendo o tombamento; enraizamento aéreo e brotações laterais e secamento dos ponteiros de canas novas resultando em um sintoma conhecido como coração morto. Além disso, ao perfurar o colmo da planta a broca cria condições favoráveis à entrada de fungos e bactérias especialmente *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, resultando em deterioração fisiológica, microbiológica e tecnológica da cana.

Atualmente, a praga é controlada por meio de controle químico, realizado com aplicação de inseticidas e controle biológico, através da liberação de predadores e parasitoides, com o uso principalmente da vespa *Cotesia flavipes*, um endoparasitoide larval e o *Trichogramma galloi*, parasita dos ovos da broca-da-cana. Apesar de consistirem importantes ferramentas de controle, há desvantagens como alto custo financeiro, exposição direta e indireta de pessoas aos componentes químicos, crescente questionamento da população sobre as aplicações aéreas, consumo de água e emissão de gases do efeito estufa, no caso do controle químico, e o dispendioso trabalho no caso do controle biológico.

Ensaios de eficácia conduzidos com o evento CTB141175/01-A, com inoculação massiva de insetos, demonstraram que o evento apresenta menor suscetibilidade à *D. saccharalis* quando comparado à cultivar parental CTC20 e com uma linhagem parental CTC20 que passou pelos mesmos passos de cultura de tecido (CTC20 nulo), em seis localidades representativas da área de cultivo da CTC20: Conchal/SP, Jaboticabal/SP, Montividiu/GO, Paranavaí/PR, Piracicaba/SP e Uberlândia/MG. Por apresentar menor susceptibilidade à *D. saccharalis*, espera-se que o cultivo do evento CTB141175/01-A diminua ou elimine a necessidade de controle químico da broca-da-cana. Como o controle químico é uma atividade amplamente reconhecida por seu potencial poluidor, espera-se que o cultivo do evento CTB141175/01-A apresente menor potencial de risco ao meio ambiente e, por conseguinte, aos solos e cursos d'água.

III – Caracterização Molecular do evento:

As diferentes análises e experimentos realizados e apresentados pela proponente indicam que a resistência ao inseto *D. saccharalis* devido à inserção do gene *cry1Ab*, e a resistência aos antibióticos do tipo aminoglicosídeos, como a canamicina e a geneticina, conferida pela introdução do gene *nptII*, são as duas únicas características que difere o evento CTB141175/01-A da cultivar parental CTC20.

Caracterização molecular do evento: número de cópias inseridas e local das inserções

Com o intuito de caracterizar as inserções de T-DNA no evento CTB141175/01-A, bem como o número de cópias inseridas de cada gene, a proponente realizou análise de Southern blot, PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e sequenciamento de DNA de segunda geração. Os resultados de Southern blot revelaram a presença de 7 inserções com 6 cópias de *cry1Ab* e 9 cópias de *nptII*, consistentes com o resultado de qPCR. A complexidade genômica da cana-de-açúcar e a ausência de um genoma de referência dificultou bastante a análise completa das sequências de DNA dos insertos e das sequências flanqueadoras. No entanto, as sequências de DNA forneceram informação para vários insertos e para as regiões flanqueadoras. Dados de BlastN e BlastX não demonstraram evidências da presença de proteínas de fusão produzidas pelas junções entre o DNA vegetal e o cassete de transformação inserido, enquanto que resultados de *Western blot*, utilizando anticorpos policlonais anti-Cry1Ab e anti-NptII, confirmaram que as únicas proteínas heterólogas expressas no evento CTB141175/01-A são as proteínas Cry1Ab (72 kDa) e NptII (29 kDa), não havendo a presença de proteínas quiméricas.

A nova caracterização molecular do evento CTB141175/01-A foi realizada por meio de sequenciamento de DNA, técnicas de PCR quantitativo e análises *Southern blot* e apresentadas na como informações complementares na proposta de liberação comercial e durante a Audiência Pública da Cana-de-açúcar. Com base nos resultados gerados pelas técnicas mencionadas, a proponente concluiu que o evento CTB141175/01-A possui 7 inserções do T-DNA, que possuem conjuntamente 6 cópias do gene *Cry1Ab* e 9 cópias do gene *NptII*, sendo que 3 cópias adicionais do gene *NptII* não constavam originalmente na proposta de liberação comercial e foram apresentadas na Audiência Pública e no documento com informações complementares enviados à CTNBio. Estas 3 novas cópias do gene *NptII* referem-se a pequenas inserções truncadas e não funcionais da construção gênica que foram completamente sequenciadas e não alteram a análise de biossegurança alimentar do evento CTB141175/01-A por não codificarem proteínas funcionais. Importante considerar que, devido à natureza altamente poliploide e complexa do genoma da cana-de-açúcar e à característica de propagação vegetativa da cultura, a presença de múltiplas cópias dos genes *Cry1Ab* e *NptII* no genoma do evento CTB141175/01-A não acarreta em maior preocupação com a biossegurança alimentar deste evento.

A proponente também apresentou dados de *Western blot* com anticorpos policlonais, na Audiência Pública e no documento de informações complementares enviado à CTNBio que demonstram que o evento expressa as proteínas integras do tamanho predito, sem a presença de proteínas truncadas ou fusionadas, corroborando os dados de sequenciamento e garantido que a análise de biossegurança do evento CTB141175/01-A, a despeito de sua complexidade genômica, pode se ater à biossegurança alimentar comprovada das proteínas Cry1Ab e NptII.

Estabilidade do transgene

Para demonstrar molecularmente que o evento CTB141175/01-A apresenta estabilidade genotípica, foi utilizada a técnica de *Southern blot* com DNA de folhas do evento representando 06 (seis) gerações de vegetações propagativas (T0: cana-planta; T1: primeira soca; T3: terceira soca; T5: quinta soca). Como controles negativo e positivo foram utilizados DNA da cultivar CTC20 (WT) e DNA plasmidial contendo o cassete de transformação,

respectivamente. Os perfis de hibridação se mantiveram idênticos ao longo das 6 gerações, tanto para a hibridização com a sonda *cry1Ab* quanto para a sonda *nptII*. Não foram encontrados indícios de instabilidade genética de qualquer tipo, incluindo do tipo que poderia ser atribuído a existência de determinadas sequências de DNA (por exemplo, transposons) próximas às inserções do cassete de transformação no evento CTB141175/01-A.

Estes resultados indicam que as inserções estão integradas no genoma da cana CTB141175/01-A de forma estável, pelo menos até a sexta geração.

Controle molecular da expressão dos transgenes
No cassete utilizado para a transformação da cana CTC20, o gene *cry1Ab* foi colocado sob o controle do promotor constitutivo do gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (*PepC*) de *Zea mays* (*Zm-PepC*), reconhecido por conferir expressão preferencial em folhas (tecido verde fotossintetizante) e por apresentar níveis de expressão compatíveis ao promotor *Zm-Ubi1* (HARRISON *et al*., 2011). O gene *nptII* foi colocado sob o controle do promotor constitutivo do gene da ubiquitina do milho (*Zm-Ubi-1*), cuja expressão preferencial é em tecidos com alta taxa de divisão. Ambos os genes utilizam o terminador do gene da nopalina sintase (*nos*), de *Agrobacterium tumefaciens*.

V - Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

Proteínas expressas no evento CTB141175/01-A
Dada a presença de mais de uma cópia de cada gene no transgene, questionou-se quanto ao níveis de expressão da proteína em virtude das múltiplas cópias. Foi então realizado um experimento de *Western blot* utilizando amostras de folhas do evento CTB141175/01-A (cana-planta e cana-soca) e da cultivar parental CTC20 e CTC20 nulo. Como controle foram utilizadas amostras do milho Bt11, que também expressa a proteína Cry1Ab e as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac purificadas. Também foi adicionado um evento de cana-de-açúcar que expressa a proteína Cry1Ac. A revelação da membrana com anticorpo primário policlonal anti-CrylAb mostrou que a proteína Cry1Ab foi detectada, com o tamanho esperado de 72 kDa, em todas as amostras do evento CTB141175/01-A, mas estava ausente no parental CTC20 e no controle da transformação CTC20 nulo. O ensaio mostrou uma banda similar em tamanho à proteína Cry1Ab purificada e na amostra de milho geneticamente modificado Bt11, que também expressa a proteína Cry1Ab. Resultado similar foi obtido quando a membrana foi revelada com anticorpo primário policlonal anti-NptII, revelando neste caso a presença de uma banda de 29 kDa em amostras do evento CTB141175/01-A mas não no controle não transformado CTC20 e nem no CTC20 nulo. O tamanho de 29 kDa é o esperado para a proteína NptII. Os resultados de *Western blot* confirmaram a presença e a integridade das proteínas Cry1Ab e NptII no evento CTB141175/01-A, não sendo detectada a presença de proteínas quiméricas.

Experimentos de bioensaio com folhas destacadas e dieta diluída mostraram que o evento CTB141175/01-A expressa a proteína Cry1Ab em concentração suficiente para garantir o controle de uma população suscetível de broca-da-cana, mesmo em situação de diluição de 25 vezes na dieta. Estes dados indicam que o evento CTB141175/01-A atende um dos requisitos para ser classificado com "Alta Dose" segundo os critérios do EPA (2001).

A proposta de liberação comercial do evento CTB141175/01-A apresenta dados de expressão foliar da proteína Cry1Ab e NptII, mensurados via técnica de ELISA, em quatro períodos do desenvolvimento da cultura, sendo dois em cana-de-ano (cana-planta) e dois em cana primeira soca. Também há dados para a expressão foliar de Cry1Ab em segunda soca. Os dados revelam que o evento CTB141175/01-A tem um alto nível de expressão foliar de Cry1Ab, em torno de 10 vezes superior a eventos comerciais de milho geneticamente modificado que expressam esta proteína. Os níveis de expressão da proteína NptII em folhas são bastante baixos quando comparados com Cry1Ab (em torno de 7.000 vezes menor).

A proteína Cry1Ab é altamente expressa em folhas do evento CTB141175/01-A (~ 50 a 150 µg/g de tecido fresco. Este nível de expressão de Cry1Ab garante eficácia no controle de *Diatraea saccharalis*. A expressão da proteína Cry1Ab em outros tecidos (raiz e colmos) é bem menor (235 ng/g peso fresco). Isso é explicado pelo emprego do promotor PEPC que promove expressão preferencial em tecidos verdes. Assim, por consequência, a exposição para fins de alimentação é minimizada.

A proteína NptII é expressa em baixos níveis em folhas do evento CTB141175/01-A (~0.05 a 0,2 µg/g de peso fresco). Este nível baixo de expressão é explicado pelo emprego do promotor Ubi-1, que promove a expressão preferencial em tecidos com alta taxa de divisão, como aqueles presentes na etapa de seleção do protocolo de transformação. A expressão da proteína NptII em outros tecidos (raiz e colmos) é bem menor (35 ng/g de peso fresco). Como consequência, a exposição para fins de alimentação é irrelevante na prática.

As proteínas Cry1Ab e NptII têm diferenças importantes na sua constituição, local e modo de ação, portanto, a probabilidade de interação entre estas duas proteínas é praticamente nula.

Um dado já conhecido da cana-de-açúcar, e que é relevante para a análise dos aspectos relacionados à saúde humana e animal, é que não há relatos na literatura de reações alérgicas à cana-de-açúcar como alimento e nem de alérgenos respiratórios (OECD, 2011). Também não há relatos na literatura sobre a presença de fatores antinutricionais em cana-de-açúcar (OECD, 2011).

O processo industrial de produção de açúcar e etanol se inicia com a moagem dos colmos, que origina o caldo e o bagaço. O caldo é a principal matéria prima utilizada na fabricação de açúcar e etanol. Resumidamente, o caldo é filtrado e clarificado por aquecimento (103°C/3h) na presença de cal (hidróxido de cálcio) e sulfitos para precipitar impurezas, em especial proteínas. Em seguida, o caldo é filtrado para remoção de impurezas sólidas, originando o lodo. O caldo clarificado e filtrado é concentrado por evaporação (cozimento) resultando na precipitação do açúcar bruto. O processo de evaporação/cristalização é repetido até que não ocorra mais cristalização de sacarose. Para a fabricação de etanol, na maioria das usinas brasileiras, o líquido residual da produção do açúcar chamado de melaço é misturado com caldo clarificado e leveduras para ser fermentado, dando origem ao "vinho". Após a fermentação o vinho passa por centrifugação, e a fase aquosa é então levada à destilação e retificação, originando o etanol hidratado. O etanol hidratado pode ainda passar por um processo de desidratação, quando se obtém o etanol anidro. O subproduto da destilação é conhecido como vinhaça, e trata-se de uma solução de cor escura rica em nutrientes, frequentemente utilizada para fertirrigação (CULLIS *et al*., 2014).

A presença de DNA e proteínas totais em diferentes produtos oriundos do processamento industrial da cana-de-açúcar no Brasil foi avaliada por CULLIS *et al*. (2014). As frações avaliadas foram cana picada, bagaço, torta de filtro, caldo de cana bruto, caldo de cana clarificado, melaço, vinhaça e açúcar cristal bruto. Foi verificado que o DNA genômico da cana-de-açúcar é gradualmente degradado e perdido durante o processamento industrial e que a quantidade de DNA detectada a partir da etapa de clarificação (frações referentes ao caldo clarificado, melaço, vinhaça e açúcar bruto) é menor que 1 pg DNA/g. Os autores não foram capazes de detectar sequer traços de DNA em açúcar refinado, mesmo utilizando técnicas de alta sensibilidade (CULLIS *et al*., 2014). Outros trabalhos que focaram na degradação de fragmentos específicos de DNA oriundos de cana-de-açúcar ou beterraba geneticamente modificada durante o processamento industrial também chegaram à conclusão que o processamento industrial para a produção de açúcar refinado é suficiente para remover completamente o DNA originalmente inserido na planta (KLEIN *et al*., 1998; OGUCHI *et al*., 2009; JOYCE *et al*., 2013).

A avaliação da degradação de proteínas totais durante o processamento de cana-de-açúcar convencional em usinas brasileiras revelou que a concentração de proteínas nas frações sequenciais do processamento tem um decréscimo de três ordens de magnitude no decorrer do refino. Os resultados indicaram que a maior parte da proteína contida originalmente na cana picada (90%) é igualmente distribuída entre o bagaço e lodo (resíduo proveniente da filtração do caldo clarificado). O estudo também revelou que menos de 0,005 a 0,02% da proteína total inicial está presente no açúcar cristal bruto, o que leva a concentrações de 9 a 15 ppm de proteína total neste produto. A concentração de proteínas totais no açúcar refinado foi estimada em 1,4 ppm, porém este valor está no limite da técnica de detecção utilizada, indicando que o processo de refinamento é suficiente para remover praticamente toda a proteína originária da cana-de-açúcar (CULLIS et al., 2014).

O percentual de sacarose presente no açúcar bruto pode variar entre 97 a 99,5% (OEDC, 2011). Em geral, o açúcar bruto resultante do processamento da cana consiste em 99,8% de sacarose e 0,2% de impurezas (0,04% de umidade; 0,07% de minerais; 0,07% de açúcar invertido; 0,02% de materiais insolúveis) (QUAST, 1986). Entretanto, após o processo de refino, que consiste na dissolução do açúcar bruto e a remoção de corantes naturais e materiais insolúveis, a sacarose pode atingir uma pureza de 99,93% (CLARKE, 1988). O etanol hidratado obtido como produto final do processo de destilação possui um teor alcoólico da ordem de 96°GL (96 Graus Gay-Lussac = 96% etanol + 4% água), sendo principalmente destinado ao abastecimento de veículos movidos a etanol. O produto também pode passar por um processo de desidratação, assumindo um teor alcoólico da ordem de 99,5°GL, sendo então apto a ser misturado à gasolina.

Os resultados de análise de expressão de Cry1Ab em colmos do evento CTB141175/01-A indicam que, como esperado pelo emprego do promotor PEPC, que é específico para tecidos fotossintetizantes, que a expressão desta proteína em colmos de cana-de-açúcar é basal. Os baixos níveis de proteínas Cry1Ab e NptII em colmos de cana-de-açúcar também podem ser explicados pelos baixos teores de proteínas neste tecido vegetal. Estes resultados indicam que a exposição às proteínas Cry1Ab e NptII devido ao consumo do caldo do evento CTB141175/01-A será extremamente baixa.

Foi avaliado a equivalência da composição química e da qualidade do açúcar e álcool (flegma) produzido a partir do evento CTB141175/01-A em r elação ao açúcar e álcool produzidos a partir da cultivar CTC20. Não foram verificadas alterações entre os parâmetros de qualidade da matéria prima testada (Fibra, Amido, Brix, Dextrana, AR, ART, pH, Pol e Pureza) entre o evento CTB141175/01-A e a cultivar CTC20. Em relação à produção de açúcar, também não foram encontradas diferenças relevantes entre os parâmetros físico-químicos (Amido, Cinzas condutimétricas, Cor ICUMSA (MOPS), Dextrana, Filtrabilidade, Floco ácido, Floco alcoólico, AR, Polarização e Turbidez) dos açúcares produzidos à partir do evento CTB141175/01-A e da cultivar CTC20. Ambos açúcares foram classificados como tipo 3C, segundo tabela COPERSUCAR (2015). Em relação à produção de álcool, foram avaliados, por HPLC, os parâmetros iniciais e finais da fermentação alcoólica (ART inicial, ART final, Etanol e Glicerol) do caldo do evento CTB141175/01-A e da cultivar CTC20. Não foram observadas diferenças relevantes entre os parâmetros de fermentação dos dois genótipos testados, tampouco na viabilidade final das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* empregadas na fermentação, indicando que o evento CTB141175/01-A não produz toxinas que poderiam afetar a fermentação. Similarmente, não foram observadas diferenças relevantes entre a composição do álcool produzidos a partir do evento CTB141175/01-A em relação ao álcool produzido a partir da cultivar CTC20, para 22 características relacionadas à qualidade do etanol.

A composição mineral da vinhaça (CaO, P2O5, MgO, Nitrogênio total e K2O) também não diferiu entre estas duas fontes de matéria-prima. Foram realizados experimentos de identificação dos genes Cry1Ab e nptII e das respectivas proteínas no açúcar e no álcool, bem como nos subprodutos intermediários do processamento da cana-de-açúcar, cujos resultados confirmam os dados já mencionados publicados na literatura científica (CULLIS et al., 2014; KLEIN et al., 1998; OGUCHI et al., 2009; JOYCE et al., 2013). Em relação à integridade do DNA genômico, medida pela razão de absorbância 260/280nm, foi verificado que apenas as amostras de folha, bagaço, caldo e lodo apresentaram DNA genômico íntegros em quantidades detectáveis. Todas as amostras de subprodutos produzidos após a etapa de clarificação (caldo clarificado, lodo, xarope, melaço, açúcar, flegma e vinhaça) apresentaram DNA genômico degradado. A detecção específica dos genes *cry1Ab* e *nptII* foi feita por ensaio de PCR em tempo real (TaqMan® multiplex), com limite de detecção de 0,05ng. Somente foi possível amplificar os genes heterólogos a partir de DNA do evento CTB141175/01-A das amostras de folha, bagaço, caldo e lodo, confirmando que a clarificação do caldo retira todo o DNA da cana-de-açúcar durante o processamento industrial. Os dados de detecção de proteínas foram similares aos de detecção de DNA. Somente foi possível detectar proteínas totais pela metodologia de Bradford nas amostras sem processamento (folhas, bagaço e caldo). Da mesma maneira, somente foi possível detectar a proteína Cry1Ab, por meio de ELISA, nestas mesmas amostras, indicando mais uma vez que a clarificação degrada e remove as proteínas presentes no caldo da cana-de-açúcar.

Recentemente foi liberado para consulta pública o banco de dados IPAFEED (2015), parte do projeto MARLON financiado pela União Europeia, que contém dados pesquisáveis para monitorar possíveis impactos na saúde de animais de produção devidos à alimentação com rações geneticamente modificadas. Especificamente, para culturas contendo o gene Cry1Ab, o IPAFEED lista 17 estudos independentes com frangos, galinhas poedeiras, vacas, bezerros, suínos e salmão publicados em revistas científicas com revisão por pares. Em nenhum caso os

autores destes estudos observaram diferenças estatisticamente significativas deletérias entre os animais alimentados com ração geneticamente modificada contendo o gene Cry1Ab ou com ração convencional. Os dados trazem uma informação positiva tanto para reguladores como para pecuaristas: a partir de ensaios de alimentação de curto prazo controlados, de longo prazo e multi-geracionais foi constatado que não há efeitos adversos à saúde causados pela alimentação de animais com rações formuladas com grãos geneticamente modificados ou diretamente com estes grãos (IPAFEED, 2015).

Outros usos da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar também pode ser utilizada na alimentação animal, principalmente na forma de bagaço ou cana in natura. Uma pequena fração do bagaço gerado no processamento industrial é utilizada na alimentação de bovinos. No entanto, o bagaço in natura apresenta baixa digestibilidade e a utilização para alimentação animal geralmente requer procedimentos de processamento adicionais, como adição de soda ou cal, ou a exposição ao vapor de água a temperaturas elevadas (150-180°C), alta pressão (15 a 25 bar), por 5 a 20 minutos, seguido da separação dos feixes de fibras. Estes procedimentos atuam liberando a celulose para que esta possa ser digerida no rúmen do animal e são capazes de desnaturar os pequenos níveis de proteínas ou DNA presentes no material original.

A utilização de cana-de-açúcar na alimentação animal, sob forma fresca ou seca, normalmente é feita na forma de suplementação durante períodos de seca, quando a pastagem se torna escassa (SILVA FILHO, 2008). Como fonte de alimentação animal, a cana de açúcar possui baixos teores de proteína bruta e altos teores de açúcar, sendo um alimento desbalanceado não recomendado como fonte única de alimento aos animais. Outro fator desfavorável é que a digestibilidade dos nutrientes existentes é baixa, devido à constituição de suas fibras. Por este motivo, os criadores selecionam cultivares com relação FDN/POL adequada e fazem suplementação com fontes adicionais de nitrogênio (N). Dessa forma, há uma busca por cultivares específicas para esta finalidade (GOODING, 1982; RODRIGUES et al., 1997).

Apesar de relativamente pequena proporção, quando comparada ao processamento industrial, há ainda o consumo por humanos do caldo da cana-de-açúcar in natura bem como para a produção dos produtos artesanais açúcar mascavo, melado e rapadura, que são derivados da concentração, via emprego de aquecimento, do caldo da cana. Segundo a OECD (2011), o conteúdo proteico do caldo de cana é nutricionalmente desprezível. Sua composição consiste de 85% de água, e principalmente sacarose e açúcares reduzidos como glicose e frutose (em torno de 77 a 90% da matéria seca). A proteína responderia por apenas 0,19% da matéria seca do caldo (OECD, 2011).

Xu et al. (2009) avaliaram as características in vitro que estão ligadas à toxicidade alimentar e à alergenicidade e concluíram que as proteínas de fusão Cry1Ab e Cry1Ac são rapidamente degradadas em fluido gástrico. Também concluíram que não há epítopos prováveis nas proteínas Cry avaliadas. Recentemente, todas as proteínas Cry expressas em variedades comerciais de plantas Bt, a saber cry1Ac, cry1Ab, cry2Ab, cry1Ca e a fusão cry1Fa/cry1Ca, foram reavaliadas pelas ferramentas de bioinformática recomendadas e os resultados foram todos negativos quanto à presença de possíveis epitopos alergênicos (Randhawa et al., 2011).

Por fim, a Organização Mundial de Saúde avaliou a segurança para a saúde da proteína Cry1Ab e de outras proteínas do *Bacillus thuringiensis* e concluiu, numa extensa revisão, que elas não apresentam riscos para a saúde do consumidor ou do trabalhador (WHO, 1999). Petersen et al. (2005) reviram a extensa literatura sobre a biossegurança de marcadores de seleção e concluíram que, com base nas evidências publicadas, os riscos advindos do consumo de NptII são negligenciáveis. Outras revisões existem e todas concluem que o risco de que o gene nptII em plantas e de sua proteína, NptII, é extremamente baixo, tanto para o ambiente como para a saúde. Uma revisão completa das avaliações foi realizada pela Autoridade Europeia em Segurança Alimentar (EFSA, 2007) e também concluiu pela segurança destes genes marcadores e das proteínas expressas. Finalmente, a segurança dos genes marcadores e das proteínas expressas também foi revisto em publicação na forma de livro (Hammond, 2007), com idêntica conclusão.

Técnicas de detecção gerais e específicas do OGM

A proposta de liberação comercial do evento CTB141175/01-A elenca três técnicas de detecção que podem ser utilizadas para identificação do evento CTB141175/01-A: o bioensaio com larvas da broca-da-cana, ensaios imunológicos com anticorpos anti-Cry1Ab e anti-NptII e ensaios de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *crylAb* e *nptll*. Estas técnicas podem se mostrar específicas para o evento CTB141175/01-A enquanto ele seja o único evento de cana GM disponível, podendo se tornar não específico quando houver outros eventos de cana GM com estes mesmos genes. Assim, a empresa desenvolveu uma técnica de detecção específica para o evento CTB141175/01-A baseada na PCR conhecida como *"Plus-Minus"* ou "presença-ausência" que amplifica uma sequência do evento CTB141175/ 01-A contendo parte da região franqueadora de uma das inserções do transgene. Portanto, em havendo a necessidade de identificação da presença do evento no campo, a sua identificação poderá ser realizada com segurança.

As análises de avaliação da composição nutricional, de caracteres fenotípicos, agronômicos, degradabilidade e parâmetros industriais, demonstram que o evento geneticamente modificado é substancialmente equivalente à cultivar não transformada e indica que as integrações não geram interferências em genes essenciais ao metabolismo da planta. Além disso, os resultados apresentados indicaram que:

1) Os caldos provenientes do evento CTB141175/01-A e da cana parental apresentam índices semelhantes de eficiência de fermentação e de mortalidade celular em leveduras, indicando que as diferentes integrações dos genes *cry1Ab* e *nptII* não produzem nenhum componente tóxico;
2) O grau de estabilidade genotípica do evento CTB141175/A-01, verificado via *Southern blot*, mostrou que as integrações dos cassetes se mantiveram constantes durante os diferentes ciclos da cultura (planta e socas), por 6 gerações, ratificando a informação de que as integrações se fixam no genoma uma vez que o sistema de propagação vegetativa da cultura não permite a segregação genética, uma vez que não ocorre a meiose;
3) Não há diferença na composição química e nutricional do evento GM em relação ao parental não GM, indicando que o evento CTB141175/01-A é tão seguro quanto o seu parental;

4) Os processos industriais são tão estringentes que só é possível detectar a presença do DNA dos genes inseridos e de suas respectivas proteínas durante as etapas iniciais do processo (folha, bagaço, caldo e no lodo);
5) Há na literatura um amplo histórico de uso e exposição das proteínas NptII e Cry1Ab no meio ambiente, sem que haja qualquer relato de algum efeito adverso;
6) Quando o potencial alergênico do evento CTB141175/01-A foi analisado de acordo com os parâmetros da FAO (*Food And Agriculture Organization of the United Nations*) e da WHO (*Word Health Organization*), suas proteínas Cry1Ab e NptII foram consideradas seguras uma vez que mostraram ausência de similaridade com sequências alergênicas conhecidas, de serem completamente degradadas durante o processo de simulações de digestão com fluídos gástricos e intestinais e por não apresentarem sítios de glicosilação;
7) As integrações no genoma e respectivas expressões das proteínas heterólogas não alteraram a capacidade de reprodução, sobrevivência e disseminação do evento CTB141175/01-A em relação ao parental não GM;
8) O evento CTB141175/01-A, assim como seu parental, a CTC20, apresenta baixo potencial de florescimento na região Centro-Sul do Brasil, confirmando que os genes *cry1Ab* e *nptII* presentes neste evento não têm nenhuma influência no processo de reprodução sexuada vegetal do mesmo;
9) Não houve alteração da capacidade de reprodução assexuada do evento de cana-de-açúcar GM em relação à cultivar parental não GM, avaliada por meio da capacidade de perfilhamento;
10) A biodegradabilidade do evento CTB141175/01-A e do parental não GM foram equivalentes ao longo do período avaliado;
11) O evento CTB141175/01-A não apresentou efeitos adversos na variedade e frequência de artrópodes, uma vez que que o nível populacional da entomofauna de artrópodes nas parcelas não foi alterada, quando comparada com as parcelas contendo cultivo do parental convencional sem a aplicação de inseticida;
12) Não há nenhuma diferença entre o evento CTB141175/01-A e os controles convencionais CTC20 e CTC20 nulo em relação aos conteúdos de macro e micronutrientes no solo e dos parâmetros de fertilidade e suas texturas (física do solo), indicando que o evento CTB141175/01-A não apresenta qualquer capacidade de adicionar ou remover substâncias do solo em decorrência da introdução dos genes *cry1ab* e *nptII*;
13) Utilizando a fermentação como um sistema para o estudo da transferência horizontal de genes, não foi possível verificar a transferência horizontal dos transgenes do evento CTB141175/01-A para a levedura empregada para a fermentação do caldo, confirmando o consenso científico de que a transferência horizontal de transgenes de plantas para micro-organismos é um fenômeno extremamente raro.

No conjunto, os dados apresentados e as evidências científicas disponíveis na literatura indicam que a cana-de-açúcar evento CTB141175/01-A é seguro para alimentação humana, animal e ao meio ambiente, tanto quanto seu parental, a cultivar CTC20.

A requerente forneceu dados de análise da composição nutricional e da qualidade do açúcar e do álcool derivados do evento CTB141175/01-A e da cultivar parental CTC20, bem como da

identificação de DNA e proteína heterólogas no açúcar e no álcool e em frações oriundas do processamento industrial da cana-de-açúcar.

Efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos

As medidas de Brix (porcentagem de sólidos solúveis) e de POL (porcentagem de sacarose em uma solução açucarada) são uma medida da produção de açúcar da cultura da cana-de-açúcar. A análise de Brix e de POL do evento CTB141175/01-A e dos comparadores convencionais CTC20 e CTC20 nulo não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos em nenhuma das localidades ensaiadas, indicando ausência de efeitos pleiotrópicos ou epistáticos dos genes *cry1Ab* e *nptII* sobre o metabolismo de açúcares do evento CTB141175/01-A. Aliados aos resultados dos estudos de equivalência nutricional, estes resultados levam a concluir que o evento CTB141175/01-A apresenta comportamento semelhante aos genótipos comparadores convencionais, evidenciando que os genes *cry1ab* e *nptII* não apresentam efeitos pleiotrópicos ou espistáticos não intencionais.

VI - AVALIAÇÃO DE RISCO AO MEIO AMBIENTE

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar não é nativa do Brasil e, portanto, é considerada uma espécie exótica nos ecossistemas brasileiros. O centro de origem da espécie é o sudeste da Ásia e Ilhas da Melanésia. Ela chegou ao Brasil logo após o descobrimento, junto com a implementação das primeiras capitanias. Historicamente se registra que o primeiro engenho se estabeleceu na Capitania de São Vicente, em 1532 (MIOCQUE, 1977). Hoje ela é cultivada em praticamente todos os estados brasileiros, ainda que em alguns deles não de forma extensiva. Sendo uma planta exótica, não há qualquer possibilidade de hibridação introgressiva, pois nenhuma das espécies ancestrais do complexo Saccharum (DANIELS e ROACH, 1987) ocorre no Brasil.

No Brasil os dois principais produtos derivados da cana-de-açúcar são o açúcar e o etanol. Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e de etanol produzidos a partir de cana-de-açúcar e também é o maior exportador mundial de açúcar (USDA, 2016). Na safra 2015/2016 a região Centro-Sul foi responsável por 93% da produção de cana, de açúcar e de etanol, com a região Norte-Nordeste respondente por 7% da produção (UNICA, 2017). O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, respondendo por 47,7% da cana, 63,7% do açúcar e 48,2% do etanol produzidos no país na safra 2015/2016 (UNICA, 2017). Em 2016 a exportação de açúcar gerou US$ 10,4 bilhões de divisas para o país e o de etanol gerou U$ 896,34 milhões, dando um total de US$ 11,29 bilhões (MAPA, 2016). Além de gerar importantes divisas para o país, o setor sucroalcooleiro também gera muito emprego. Portanto, é uma cultura que tem importância econômica e social para o Brasil.

O genoma da cana-de-açúcar e seus reflexos no melhoramento e na biotecnologia da cultura

As cultivares comerciais modernas de cana-de-açúcar, dentre as quais se encontram a cultivar CTC20 e o evento CTB141175/01-A, são híbridos de várias espécies pertencentes ao gênero Saccharum. Estas espécies (*S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi* e

S. sinense) são todas originadas do Sudeste Asiático (MOORE et al., 2014). Ainda que várias espécies de *Saccharum* tenham contribuído para dar origem às cultivares comerciais atuais da cana, elas são o resultado do cruzamento entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (DILLON et al., 2007) e foram desenvolvidas por melhoramento genético realizado no final do século XIX (MATSUOKA et al., 1999), com o objetivo de reunir características de interesse presentes nas diferentes espécies.

O cultivares de *S. officinarum*, conhecidas como canas nobres, são vistosas e capazes de armazenar grande quantidade de sacarose nos colmos e produzir abundante caldo açucarado. São bastante dependentes de condições climáticas específicas, solos férteis e disponibilidade de água (MATSUOKA et al., 1999). Por outro lado, as cultivares de *S. spontaneum*, conhecidas como canas selvagens, são canas vigorosas e apresentam grande polimorfismo, ampla adaptabilidade e são encontradas em diferentes ambientes (MATSUOKA et al., 1999), contribuindo na composição das cultivares modernas com características como vigor, dureza, perfilhamento, capacidade de rebrota de soqueira e resistência a estresses abióticos (NAIDU e SREENIVASAN, 1987).

Dessa forma, pode-se dizer que as cultivares de cana-de-açúcar atualmente comercializadas são híbridos interespecíficos, sendo *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum* quem mais contribuiu para o genoma dessas cultivares. *S. sinense*, *S. barberi* e *S. robustum* provavelmente deram contribuições de menor expressão para algumas cultivares específicas (MATSUOKA et al., 1999). *S. officinarum* apresenta um número de cromossomos 2n = 80, com um número básico de cromossomos igual a 10, sendo portando octaplóide (oito cópias de cada cromossomo) (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2011). Mas *S. officinarum* é mais do que poliploide, é também autopoliploide (possui mais de duas cópias de cromossomos homólogos provenientes de uma única espécie) e alopoliploide (possui duas ou mais cópias de cromossomos híbridos) (SREENIVASAN et al., 1987). Por outro lado, *S. spontaneum* é uma espécie altamente polimórfica, vigorosa, resistente a doença e com um alto teor de fibra. Ela apresenta 2n = 40 a 128 cromossomos e é um poliploide complexo, com um número básico de cromossomos igual a 8 ou 10 (D'HONT et al., 1996). As cultivares modernas apresentam número de cromossomos variando de 2n = 100 a 130, indicando alta ploidia com presença de aneuploidia (GRIVET e ARRUDA, 2002). Surpreendentemente, os grupos de homologia da cana-de-açúcar podem apresentar diferentes números de cromossomos. Estima-se que os níveis de ploidia mais prováveis variem entre 6 e 14, mas que podem ser tão altos quanto 20 (GARCIA et al., 2013).

A complexidade do genoma da cana-de-açúcar impediu que até o momento fosse possível obter o genoma completo de uma espécie ou cultivar para ser utilizado como genoma de referência. Esta complexidade do genoma tem também reflexos tanto no melhoramento genético convencional como no desenvolvimento biotecnológico da cultura. Uma particularidade da cultura é ausência de programas de melhoramento que visam tão somente a introgressão de uma característica em um genótipo selecionado, ou seja, programas de retrocruzamentos. Como consequência, espera-se que os eventos de transformação genética na cultura sejam genótipo-específicos ou sejam utilizados para a obtenção de novos cultivares que deverão chegar ao mercado somente dez anos após o cruzamento original, que é o tempo regulamentar do programa de melhoramento da cultura.

Vários grupos de pesquisa têm relatado a seleção de eventos geneticamente modificados de cana-de-açúcar que apresentam múltiplas cópias dos transgenes inseridos (WENG et al., 2011; NOGUERA et al., 2015; WU et al., 2015; GAO et al., 2016). A base científica para isso é que alguns autores verificaram uma correlação positiva, em cana-de-açúcar, entre o número de cópias dos transgenes e os níveis de expressão da proteína heteróloga (WENG et al., 2011; WU et al., 2015; GAO et al., 2016). Esse resultado pode refletir o fato de que, por ser altamente poliploide, a cana-de-açúcar não possui genes endógenos em cópias únicas, sendo que a presença de múltiplas cópias gênicas seja necessária para garantir um nível adequado de expressão de proteína num genoma tão complexo. Gao et al. (2016) avaliaram a eficiência no controle de lepidópteros de eventos de cana-de-açúcar contendo baixo (menos de 10), moderado (de 10 a 80) e alto (mais de 80) números de cópias do gene c*ry1Ac*. Os resultados indicaram que eventos com moderado número de cópias do transgene apresentavam melhor eficiência no controle da praga que eventos com baixo número de cópias. Interessantemente, esses eventos com número moderado de cópias também foram superiores aos eventos com alto número de cópias do transgene, tanto na eficiência de controle da peste quanto na performance agronômica. Assim, não é de se estranhar que o evento CTB141175/01-A, objeto da presente solicitação de liberação comercial, tenha 6 cópias do gene *cry1Ab* e 9 cópias do gene *nptII*, estáveis no genoma ao longo de 6 gerações, e permitiu ao evento apresentar a mesma produtividade da cultivar parental.

Características da cultura comercial da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é propagada por meio do plantio de gemas presentes no colmo, ou seja, por meio de reprodução vegetativa. Dessa forma, a produção de sementes, ou reprodução sexuada, não é requerida para a propagação comercial da cultura. Na realidade, o florescimento é indesejável em plantios comerciais de cana-de-açúcar e a maioria das cultivares atualmente plantadas apresentam florescimento comprometido nas regiões produtoras, com exceção do nordeste brasileiro, devido a restrições de clima e de fotoperíodo. Assim, o plantio de cana-de-açúcar via semente só ocorre nos programas de melhoramento para a obtenção de novas cultivares. O florescimento da cana-de-açúcar é regulado pelo fotoperíodo e as condições ideais de luz, umidade e temperatura para a produção de sementes viáveis ocorre somente entre as latitudes de 5° e 15° (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Por este motivo, todas as estações de cruzamentos dos diferentes programas de melhoramento de cana existentes no Brasil, públicos ou privados, estão localizadas entre os estados de Alagoas e Bahia. O florescimento em regiões fora destas latitudes, quando geram sementes, as mesmas apresentam pouca ou nenhuma viabilidade.

A cultura da cana-de-açúcar apresenta ciclo de produção semi-perene, com a realização de um ciclo de cana-planta seguido por quatro a seis ciclos de cana-soca, quando então o canavial deve ser renovado.

A cana-de-açúcar é uma cultura extremamente responsiva às condições edafoclimáticas. Assim, não há uma cultivar de cana que seja bem produtiva em todas as regiões do Brasil onde se planta cana comercialmente. Este fato, aliada à necessidade de que haja matéria prima adequada para moagem na usina durante todo o período da safra, torna necessário a existência de cultivares precoces, médios e tardios no que se refere a ter o teor de açúcar adequado (cana

madura ou maturada) na época da moagem. Portanto, somando-se o fator edofoclimático e o ciclo de maturação da cana, uma usina necessita plantar de 10 a 20 cultivares de cana diferentes para se manter em operação durante todo o período da safra.

Alteração da capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos

As modificações genéticas introduzidas no evento CTB141175/01-A não alteraram sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes para outros organismos. As avaliações realizadas e apresentadas pela proponente demonstram que o evento CTB141175/01-A é equivalente em todas as características fenotípicas, agronômicas, fisiológicas e bioquímicas ao seu parental, exceto pelas características conferidas pelos genes introduzidos, ou seja, resistência à lagarta-da-cana e resistência a antibióticos do tipo aminoglicosídeos. Em especial, foi demonstrado que o evento CTB141175/01-A, da mesma maneira que a cultivar parental CTC20, apresenta baixíssimo potencial de florescimento e, por consequência, de reprodução sexuada na região Centro-Sul.

Adaptabilidade geográfica do evento CTB141175/01-A e da cultivar parental CTC20

O evento CTB141175/01-A de cana-de-açúcar foi avaliado em experimentos de campo na forma de liberações planejadas no meio ambiente, aprovadas pela CTNBio, nas seguintes localidades: Paranavaí (PR), Piracicaba, Jaboticabal e Conchal (SP), Uberlândia (MG) e Montividiu (GO). A proponente argumenta que tais localidades são representantes da área de cultivo da cultivar CTC20 e portanto, da região para onde o cultivo do evento CTB141175/01-A será recomendado e disponibilizado.

O evento CTB141175/01-A, assim como sua cultivar parental, não tem adaptabilidade para ser plantado no Nordeste do Brasil. A cultivar CTC20, parental do evento CTB141175/01-A, apresenta alta performance agronômica somente quando cultivada em ambientes de produção superiores, sem restrições de fertilidade do solo e/ou de disponibilidade hídrica. No Brasil, estas condições edafoclimáticas são encontradas, principalmente, na região centro-sul do país, região para a qual o cultivo da cultivar CTC20 é recomendado.

A principal limitação para o plantio da cultivar CTC20 nas condições do Nordeste brasileiro é a restrição hídrica presente nas condições de cultivo desta região, quando comparado com a região Centro-Sul. O potencial de produção da CTC20, mensurado como Toneladas de Cana por Hectare (TCH), é severamente afetado pelas restrições hídricas presentes nas regiões produtoras de cana do Nordeste.

Por esse motivo, o CTC não indica o plantio da cultivar CTC20 para as condições do Nordeste brasileiro. Isso pode ser verificado pela ausência dos estados nordestinos no registro da cultivar CTC20 no Registro Nacional de Cultivares (RNC), onde as regiões de plantio indicadas são os estados de Goiás, Minas Gerais (Triângulo Mineiro, Norte e SUL), Mato Grosso do Sul, Paraná (Norte e Sul) e São Paulo (http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php).

A proponente menciona, expressamente, na resposta a um dos questionamentos durante o processo de análise de risco que “Uma vez que a cultivar CTC20 não apresenta adaptabilidade

no Nordeste, não foram realizadas avaliações de campo do evento CTB141175/01-A nesta região. Considerou-se que tais ensaios não seriam capazes de produzir resultados confiáveis para a expressão dos transgenes, tampouco para os efeitos esperados dessa expressão, devido à ausência de performance agronômica adequada. Assim como para a cultivar CTC20, o CTC não recomendará o plantio do evento CTB141175/01-A no nordeste brasileiro."

A proponente menciona ainda que o modelo de negócios da empresa prevê a venda de mudas apenas para usinas e produtores associados que concordam em assinar um contrato que prevê o georreferenciamento das áreas plantadas com cultivares CTC. Esse modelo de negócios permite que a empresa controle as áreas de plantios de suas cultivares e direcione o plantio do evento CTB141175/01-A para o centro-sul do Brasil. Menciona ainda que o modelo de negócios da empresa é uma oportunidade única para controlar e gerenciar a adoção de áreas de refúgio baseadas num modelo de georreferenciamento que permitirá controlar as áreas plantadas com o evento CTB141175/01-A e com a cultivar CTC20 convencional.

Segundo a proponente, o pipeline de pesquisa da empresa prevê o desenvolvimento de cultivares geneticamente modificadas adequadas para o plantio no Nordeste por meio de novas transformações de cultivares com alto rendimento. Neste sentido, a empresa já requereu permissão da CTNBio para realizar ensaios de campo para avaliação de risco ao meio ambiente de outras cultivares GM no Nordeste.

Características agronômicas da cana CTB141175/01-A

O evento CTB141175/01-A de cana-de-açúcar foi avaliado em experimento de campo na forma de liberações planejadas no meio ambiente, aprovadas pela CTNBio, nas seguintes localidades: Paranavaí (PR), Piracicaba, Jaboticabal e Conchal (SP), Uberlândia (MG) e Montividiu (GO). A proponente argumenta que tais localidades são representantes da área de cultivo da cultivar CTC20 e portanto, da região para onde o cultivo do evento CTB141175/01-A será recomendado. Nestes locais, o evento CTB141175/01-A foi comparado com controles constituídos pela cultivar parental CTC20 original e por um material vegetal de CTC20 que passou pelas mesmas condições de cultura de tecidos que o evento CTB141175/01-A mas que não foi transformada (CTC20 nulo). Os experimentos foram conduzidos no delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, onde foram analisadas, tanto no ciclo de cana-planta quanto no ciclo de cana-soca, as características agronômicas e o risco ambiental para instruir o pedido de liberação comercial submetido à CTNBio.

Na avaliação agronômica, foram coletados dados para os seguintes parâmetros: 1) aparência visual geral, por meio de atribuição de notas de conjunto; 2) Brix e POL; 3) altura, diâmetro e peso dos colmos; 4) produtividade na forma de Toneladas de Cana por Hectare (TCH) e Toneladas de POL por Hectare (TPH). Estes parâmetros são os usualmente avaliados nos programas de melhoramento da cana-de-açúcar. Os dados apresentados pela proponente demonstram não haver diferenças significativas consistentes entre o evento CTB141175/01-A e o controle não transformado que passou pelos mesmos processos de cultura de tecido e que, portanto, não houve efeitos não intencionais sobre os parâmetros de produtividade que possam ser atribuídos ao processo de transformação genética.

A proponente apresentou ensaios de eficácia da tecnologia em campo, demonstrando que o evento CTB141175/01-A apresenta maior resistência ao ataque da broca-da-cana, em todas as seis localidades avaliadas, quando comparado aos controles convencionais conduzidos ou não sob o tratamento químico tradicional, tanto no parâmetro de "Intensidade de Infestação", medido em porcentagem de colmos infestados, quanto no parâmetro "Dano médio", medido em cm^2 de tecido afetado.

Fluxo gênico

Embora o Brasil não seja o centro de origem da cana-de-açúcar, algumas espécies de poáceas nativas, anteriormente classificadas como pertencentes ao gênero *Eryanthus*, foram reclassificadas como pertencentes ao gênero *Saccharum* (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al*., 2011) e, portanto, pertencem ao mesmo gênero da espécie parental não modificada segundo o sistema taxonômico atualmente mais aceito. Dessa forma, a ocorrência de fluxo gênico é teoricamente possível embora improvável devido à divergência dos centros de origem e história evolutiva das espécies em questão. A ocorrência do fluxo gênico requer a transferência de pólen do evento geneticamente modificado para as espécies nativas seguida pela fecundação efetiva, formação e germinação de sementes, formação de híbridos viáveis e férteis e, em última análise, da introgressão permanente do gene em questão na população da espécie nativa (GEPTS e PAPA, 2003).

A proponente avaliou o primeiro passo requerido nesta cadeia de eventos (transferência de pólen), que é o potencial de florescimento da cultivar parental CTC20 e do evento CTB141175/01-A nos locais recomendados para seu plantio. A cultivar CTC20 foi avaliada no Ensaio Final do Programa de Melhoramento do CTC de 2006, composto de 33 ensaios em 23 usinas produtoras de cana-de-açúcar da região centro-sul do país, totalizando 48 experimentos. O florescimento da cultivar foi avaliado conjuntamente com o florescimento de três cultivares comerciais de cana-de-açúcar. O florescimento foi avaliado de acordo com uma escala de 0 a 9, representando 0 a 100% de colmos florescidos. A nota final de avaliação da CTC20 ficou entre 1 e 2, representando uma classificação entre "0% de colmos encartuchados ou florescidos" e "até 10% de colmos encartuchados e não florescidos". Este resultado indica que a cultivar CTC20 apresentou um grande comprometimento em sua capacidade de florescimento no ano de 2006, na região centro-sul, sendo classificada como pouco florífera quando comparada com os materiais genéticos comerciais que foram avaliados conjuntamente no Ensaio Final. A proponente também forneceu dados a respeito da capacidade de florescimento do evento CTB141175/01-A em relação à cultivar CTC20 e três cultivares comerciais, no ano de 2015, em dois locais: Montividiu (GO) e Uberlândia (MG).

Os dados de florescimento são relativos à retirada de pendões florais incipientes, medida de biossegurança requerida nas liberações planejadas no meio ambiente aprovadas pela CTNBio. Devido à raridade do florescimento, houve grande dispersão dos dados e a proponente apresentou apenas estatística descritiva dos dados. O máximo de florescimento observado nos experimentos em ambos os locais foi de 4,3% (12 pendões em aproximadamente 280 perfilhos potencialmente floríferos) em uma parcela com a cultivar CTC20 em Uberlândia.

Neste local não houve emissão de pendões floríferos nas parcelas referentes ao evento CTB141175/01-A. Em Montividiu houve a retirada de dois pendões floríferos em uma parcela do evento CTB141175/01-A, o que representa uma incidência de 0,7% de florescimento. Estes dados, conjuntamente, indicam que o evento CTB141175/01-A apresenta potencial de florescimento bastante comprometido na região centro-sul do país, local destinado para recomendação de seu cultivo. Dessa forma, a proponente evidenciou que a primeira etapa necessária para a ocorrência de fluxo gênico entre o evento CTB141175/01-A e espécies selvagens nativas é bastante comprometida no evento CTB141175/01-A, tornando a ocorrência do fluxo gênico bastante improvável. Adicionalmente, não é esperado que as proteínas Cry1Ab e NptII ofereçam vantagem seletiva às espécies selvagens em seu habitat natural, condição necessária para a introgressão definitiva dos transgenes nas populações selvagens e efetivação do fluxo gênico para espécies selvagens.

Efeito da cana CTB141175/01-A em características físico-químicas e de fertilidade do solo

A proponente apresentou dados a respeito do impacto do cultivo do evento CTB141175/01-A sobre os parâmetros físico-químicos e de fertilidade do solo. Nenhuma diferença significativa para quaisquer parâmetros de solo foi constatada, na única localidade avaliada (Piracicaba/SP).

Efeito da cana CTB141175/01-A na macrobiota do solo

Em relação a um possível impacto à microbiota do solo, a proponente apresentou dados que demonstraram que a microbiota, medida por meio da análise de *fingerprinting* de comunidades de bactérias e fungos do solo associadas ao cultivo do evento CTB141175/01-A não difere da microbiota associada ao cultivo de um evento geneticamente transformado adicional, dos controles não geneticamente modificados, com ou sem tratamento químico, em nenhuma das quatro localidades avaliadas (Conchal e Piracicaba, SP; Uberlândia, MG; Montividiu, GO).

Potencial de invasibilidade

A cana-de-açúcar não tem potencial invasivo no meio ambiente, sendo propagada exclusivamente pela ação humana pelo plantio das gemas laterais dos colmos. A reprodução sexuada, por meio de sementes, não é realizada nos plantios comerciais, tampouco sua ocorrência espontânea é observada nas condições do centro-sul do país, devido às restrições climáticas e de fotoperíodo. Não há relatos de populações espontâneas de cana-de-açúcar ocorrendo no país, a despeito do cultivo extensivo desta cultura nos últimos cinco séculos.

A proponente avaliou a capacidade de perfilhamento do evento CTB141175/01-A em comparação com controles constituídos pelo genótipo parental CTC20, cultivado ou não em cultura de tecidos. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada no perfilhamento do evento e do controle nas seis localidades avaliadas: Paranavaí, Conchal, Jaboticabal, Piracicaba, Uberlândia e Montividiu. Dessa forma, pode-se concluir que o evento CTB141175/01-A não apresenta maior capacidade de propagação vegetativa do que a cana-de-açúcar convencional. Estes dados indicam o evento CTB141175/01-A, tal qual a cana-de-açúcar convencional, não tem potencial de se tornar uma planta daninha.

Probabilidade de danos às abelhas e outros organismos

A proposta de liberação comercial do evento CTB141175/01-A apresenta dados de literatura que demonstram baixo potencial da proteína causar danos a abelhas (AGBIOS, 2005; GRABOWSKI e DABROWSKI, 2012), minhocas (AGBIOS, 2005; VERCESI *et al*., 2006), colêmbolos (EPA, 2010; AGBIOS, 2005), neuropteros (AGBIOS, 2005; ROMEIS *et al*., 2004) e microcrustáceos aquáticos (AGBIOS, 2005). Similarmente, há dados de literatura científica que indicam a inocuidade da proteína NPTII sobre abelhas (FERNANDES *et al*., 2014), minhocas (EPA, 2005) e colêmbolos (EPA, 2005).

Alterações não desejadas em organismos não-alvo

A proponente avaliou o potencial do evento CTB141175/01-A causar alterações não desejadas em organismos não-alvo por meio da captura e identificação taxonômica de indivíduos das populações de artrópodes da parte aérea, de artrópodes da superfície do solo, da mesofauna do solo e de formigas cortadeiras incidentes em liberações planejadas no meio ambiente do evento CTB141175/01-A, em comparação à cultivar CTC20 passada por cultura de tecidos e à cultivar CTC20 conduzida ou não sob o manejo usual de inseticidas. Esta avaliação foi realizada em ensaios conduzidos em Conchal e Piracicaba (SP), Montividiu (GO) e Uberlândia (MG). A despeito de algumas diferenças estatisticamente significativas para alguns táxons específicos, bem explicadas por particularidades do tratamento/locais de ensaios pela proponente, não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas nos "Índices Médios de Diversidade (H')", "Equitabilidade (J)" e "Riqueza (S)" na população de artrópodes de solo capturadas por meio de armadilha do tipo *pitfall*, nem na população de artrópodes da parte aérea capturada por meio de armadilha adesiva, em nenhuma das localidades avaliadas. Dessa forma, os estudos de populações de insetos não-alvo da tecnologia não revelou um impacto do cultivo do evento CTB141175/01-A em condições de campo no país. De fato, não há motivos para esperar qualquer efeito nestas populações uma vez que as mesmas não se alimentam de folhas de cana-de-açúcar e, portanto, não entram em contato direto com as proteínas heterólogas expressas no evento CTB141175/01-A. Deve-se ainda considerar que a proponente demonstrou que o evento CTB141175/01-A possui florescimento bastante comprometido nas regiões destinadas para o seu cultivo e que mesmo que o evento fosse florífero, não haveria que se pensar em impactos em insetos polinizadores uma vez que a cana-de-açúcar é uma espécie anemófila (polinização pelo vento). Conclui-se que não se espera um impacto em espécies de artrópodes não alvo da tecnologia devido ao cultivo do evento CTB141175/01-A.

Biodegradabilidade da planta GM

A biodegradabilidade do evento CTB141175/01-A foi avaliada em comparação à biodegradabilidade da cultivar parental CTC20, em quatro localidades: Jaboticabal e Conchal (SP), Paranavaí (PR) e Uberlândia (MG). Para tanto, nestas localidades, foram instalados experimentos no delineamento em blocos casualizados, com 4 repetições.

A degradabilidade dos restos culturais no campo foi avaliada pelo método de sacos de *nylon* (*litterbags*), descrita por Santos e Whitford (1981) aos 30, 60, 90 e 120 dias após o enterro. Os resultados indicaram que as degradabilidades dos restos culturais entre os tratamentos (evento GM e parental não GM), foram semelhantes ao longo do período avaliado, demonstrando que o evento CTB141175/01-A não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota do solo relação idêntica ao da cultivar parental CTC20.

Parecer

Considerando que:

1) Os dados e informações apresentados pela proponente atendem aos requisitos da Resolução Normativa Nº 05, de 12 de março de 2008;
2) A cana-de-açúcar possui mais de 500 anos de histórico de cultivo seguro no meio ambiente brasileiro;
3) Que foi demonstrado que as inserções de DNA heterólogo presentes no evento CTB141175/01-A são geneticamente estáveis durante a propagação vegetativa da cana-de-açúcar;
4) As integrações no genoma e respectivas expressões das proteínas heterólogas não alteraram a capacidade de reprodução, sobrevivência e disseminação do evento CTB141175/01-A em relação ao parental não GM;
5) Que as únicas proteínas heterólogas expressas pelo evento CTB141175/01-A são as proteínas Cry1Ab e NptII;
6) Que as proteínas Cry1Ab e NptII estão entre as proteínas heterólogas mais utilizadas em eventos geneticamente modificados utilizados em diversos países, sem relatos de impactos negativos à saúde humana, animal ou ao meio ambiente;
7) Que o evento CTB141175/01-A não apresenta efeitos pleiotrópicos ou epistáticos que possam ser atribuídos a sua modificação genética;
8) Que o evento CTB141175/01-A apresenta baixo potencial de florescimento na região centro-sul, local recomendado para seu cultivo;
9) Que o evento CTB141175/01-A não apresenta maior potencial de disseminação quando comparado com os controles convencionais;
10) Que foi demonstrado que o cultivo do evento CTB141175/01-A não apresenta riscos adicionais à comunidade de artrópodes usualmente presente nos cultivos de cana-de-açúcar;
11) Que foi demonstrado que o cultivo do evento CTB141175/01-A não apresenta efeitos deletérios sobre os parâmetros físico-químico do solo, tampouco sobre sua microbiota;
12) As informações atualmente disponíveis na literatura científica;
13) As características nutritivas da cana-de-açúcar. Trata-se principalmente de alimento
14) energético, de baixo teor proteico, que não pode ser utilizado como única fonte alimentar nem pelo homem nem pelos animais.
15) As características do evento CTB141175/01-A. O evento CTB141175/01-A apresenta altos níveis de proteína Cry1Ab em folhas e baixos níveis de expressão desta proteína em colmos. A expressão de NptII em todos os tecidos do evento é considerada baixa. O evento CTB141175/01-A apresenta equivalência substancial com as cultivares comerciais utilizadas como controles convencionais
16) As características do processamento industrial, que é capaz de remover praticamente todo o DNA e proteína, incluindo o DNA e proteínas Cry1Ab e NptII, do açúcar e do álcool produzidos.
17) A segurança das proteínas Cry1Ab e NptII. Tratam-se de proteínas já bem conhecidas da literatura científica, que já passaram por diversas avaliações de risco e que constam de diversos produtos já colocados no mercado nacional e internacional. Existem amplo histórico de consumo seguro destas proteínas, tanto pelo homem quanto por animais, sem relatos de agravos à saúde humana e animal

18) Existe benefício direto no processo industrial e na qualidade do açúcar advindo de cana-de-açúcar livre da podridão-vermelha que é originada no dano causado pela Diatraea e resulta em compostos fenólicos que conferem coloração escura ao açúcar e exige maior quantidade de produtos químicos para sua clarificação.

Diante do exposto, e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas, é possível concluir que o evento em questão é tão seguro quanto seus equivalentes convencionais, não sendo causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional.

No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, A CTNBio considerou que o pedido atende às normas e as legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que a cana CTB141175/01-A é substancialmente equivalente à cana convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal.

No tocante ao meio ambiente, conclui-se que a cana CTB141175/01-A 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 cana 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. Neste sentido, a CTNBio deliberou favoravelmente ao pedido de comercialização do evento de cana CTB141175/01-A.

Área de Restrição Ambiental:

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, "ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental".

Área de Uso do OGM:

A cultivar CTC20, que deu origem ao evento CTB141175/01-A, foi desenvolvida para atender as condições edafoclimáticas da região Centro-Sul e não tem adaptabilidade para ser plantada no Nordeste do Brasil, motivo pelo qual não é utilizada nesta região do país. No registro da cultivar CTC20 no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as regiões de plantio indicadas são os estados de Goiás, Minas Gerais (Triângulo Mineiro, Norte e SUL), Mato Grosso do Sul, Paraná (Norte e Sul) e São Paulo.

O Anexo IV da Resolução Normativa Nº. 5 da CTNBio, no seu item 3, pede que seja informado os possíveis efeitos em organismos indicadores relevantes (simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores do OGM) nos ecossistemas onde se pretende efetuar o seu cultivo, em comparação com o organismo parental do OGM em um sistema de produção convencional. A empresa apresentou dados de performance agronômica e de biossegurança realizados em 06 localidades da região Centro-Sul. **Assim, considerando as localidades onde foram realizadas as avaliações de biossegurança do evento CTB141175/01-A, a CTNBio autoriza o uso deste evento apenas para a região Centro-Sul**.

Referências Bibliográficas

AGBIOS. Potential Toxicity of Cry1Ab protein to Non-Target Species. ESA. MON810. Appdx3 2005. Disponível em: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.410.2072&rep=rep1&type=pdf.

ALMEIDA, L.C. Broca da cana causa prejuízos milionários. 2016. Disponível em: http://www.canalbioenergia.com.br/artigoprejuizos-bilionarios-causados-pela-broca-da-cana/. Acessado em 28/04/2017.

AUSTRALIAN GOVERNMENT (2011). The Biology of the *Saccharum* spp. (Sugarcane). Disponível em http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/biologysugarcane-toc/$FILE/biologysugarcane11.pdf. Acessado em 28/04/2017.

CERA, 2011. A review of the environmental safety of the Cry1Ab protein. Disponível em http://ceragmc.org/docs/cera_publications/cry1ab_en.pdf

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. (2011). Sugarcane (*Saccharum* X *officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. Tropical Plant Biology, 4(1), p. 62-89.

CLARKE, M. A., & GODSHALL, M. A. (Eds.). (2013). Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane: proceedings of the Symposium on the Chemistry and Processing of Sugarbeet, Denver, Colorado, April 6, 1987 and the Symposium on the Chemistry and Processing of Sugarcane, New Orleans, Louisiana, September 3-4, 1987. Elsevier.

COPERSUCAR. Especificações para açúcar e etanol – safra 15/16. São Paulo, 2015.

CULLIS, C., CONTENTO, A. L., & SCHELL, M. A. (2014). DNA and Protein Analysis throughout the Industrial Refining Process of Sugar Cane. International Journal of Agricultural and Food Research (IJAFR), 3(2).

CUNHA, V.; BARTABURU, X. Cana-de-açúcar. 1. Editora Origem. 2015. 240p.

D'HONT, A., GRIVET, L., FELDMAN, P., RAO, S., BERDING, N., GLASMANN, J.C. (1996). Characterisation of the double genome struture of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular cytogenetics. Molecular and General Genetics, 250, p. 405-413.

DANIELS, J., ROACH, B.T. (1987). Taxonomy and evolution. In: Heinz, D.J. Sugarcane. Improvement through Breeding. Elsevier, Amsterdan, 1987. p. 7-84.

DILLON, S.L., SHAPTER, F.M., HENRY, R.J., CORDEIRO, G., IZQUIERDO, L., LEE, L.S. (2007). Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogoneae). Annals of Botany, 100(5), p. 975-989.

EFSA, 2007. Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the nptII antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants. Disponível em http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/742.

EPA (2001) Insect Resistance Manegement. In: Bt Plant-Incorporated Protectants October 15, 2001 Biopesticides Registration Action Document. Disponível em: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt_brad2/4-irm.pdf

EPA (2005) Attachment III: Environmental Risk Assessment of Plant Incorporated Protectant (PIP) Inert Ingredients. Meeting document: Fifra sap meeting concerning plant incorporated protectants based on plant viral coat protein genes (pvcp-pips). Disponível em http://archive.epa.gov/scipoly/sap/meetings/web/pdf/sapquestions11-18-05.pdf

EPA (2010) Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* (Bt) Corn Plant-Incorporated Protectants. BIOPESTICIDES REGISTRATION ACTION DOCUMENT. Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division: U.S. Environmental Protection Agency 2010. Disponível em: http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/cry1f-cry1ab-brad.pdf

FERNANDES, M. Z. (2014). Efeito do pólen de eucalipto geneticamente modificado em abelhas *Scaptotrigona bipunctata* (MELIPONINI) e *Apis mellifera* (APINI). Dissertação de Mestrado, PUCRS. Disponível em: http://repositorio.pucrs.br:8080/dspace/handle/10923/5824

GAO, S., YANG, Y., WANG, C., GUO, J., ZHOU, D., WU, Q., SU, Y., XU, L., QUE, Y. (2016) Transgenic Sugarcane with a *cry1Ac* gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer. PLoS One. 11(4):e0153929. doi: 10.1371/journal.pone.0153929.

GARCIA, A.A.F. et al. (2013). SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. Scientific Reports 3: 3399. doi: 10.1038/srep03399

GEPTS, P.; PAPA, R. Possible effects of (trans)gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. Environ. Biosafety Res., v. 2, n. 2, p. 89-103, 2003. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1051/ebr:2003009

GOODING, E. G. B. (1982). Effect of quality of cane on its value as livestock feed. Tropical Animal Production,

7(1), 72-91.

GRABOWSKI, M., DABROWSKI, Z. T. (2012). Evaluation of the impact of the toxic protein Cry1Ab expressed by the genetically modified cultivar MON810 on honey bee (*Apis mellifera* L.) behavior. Medycyna Weterynaryjna, 68(10), p. 630-633.

GRIVET, L., ARRUDA, P. (2002). Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. Current Opinion in Plant Biology, 5(2), p.122-127.

HAMMOND BG, 2007. Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology. CRC Press, 320 pp. ISBN 9780849339677.

HARRISON, M.D., GEIJSKES, J., COLEMAN, H.D., SHAND, K., KINKEMA, M., PALUPE, A., DALE, J.L. (2011). Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane. Plant Biotechnology Journal, 9(8), p. 884-896.

IPAFEED. Information Platform for animal health and GM feed. GM Feed consumption database. Disponível em http://ipafeed.eu/consumption-database

INDONESIA BIOSAFETY CLEARING HOUSE (2015). Disponível em http://indonesiabch.or.id/en/pangan/. Acessado em 28/04/2017.

ISAAA. GM approval database. Disponível em http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase

JOYCE, P. A., DINH, S. Q., BURNS, E. M., & O'SHEA, M. G. (2013). Sugar from genetically modified sugarcane: Tracking transgenes, transgene products and compositional analysis. International Sugar Journal, 860-863.

KLEIN, J., ALTENBUCHNER, J., & MATTES, R. (1998). Nucleic acid and protein elimination during the sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets. Journal of biotechnology, 60(3), 145-153.

MAPA (2016). Balança comercial do agronegócio resumida. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/relacoes-internacionais/estatisticas-de-comercio-exterior. Consultada em 28/04/2017.

MATSUOKA, S., GARCIA, A. A. F., & CALHEIROS, G. C. (1999). Hibridação em cana-de-açúcar. Hibridação Artificial de Plantas. Viçosa: Editora UFV, p. 221-254.

MIOCQUE, J.Y. (1977). Review of sugarcane varieties and breeding in Brazil. Sugar Journal, 40(7), p. 9-13.

MOORE, P.H., PATERSON, A.H., TEW, T. (2014). Sugarcane: the crop, the plant, and domestication. Sugarcane: physiology, biochemistry and functional biology. Wiley Blackwell, Oxford, p. 1-17.

NAIDU, K.M., SREENIVASAN, T.V. (1987). Conservation of sugarcane germplasm. In Proceedings of the Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop. Copersucar Technology Centre, Piracicaba-SP, Brazil, p. 33-53.

NOGUERA, A. et al. (2015). Genetic characterization and field evaluation to recover parental phenotype in transgenic sugarcane: a step toward commercial release. Molecular Breeding, 35(5), p. 115.

OECD (2011). Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of SUGARCANE (Saccharum ssp. hybrids): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Toxicants. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Novel Foods and Feeds. Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/49343153.pdf. Acessado em 28/04/2017.

OGUCHI, T., ONISHI, M., CHIKAGAWA, Y., KODAMA, T., SUZUKI, E., KASAHARA, M., ... & FURUI, S.

(2009). Investigation of residual DNAs in sugar from sugar beet (Beta vulgaris L.). Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 50(1), 41-46.

PETERSEN W, UMBECK P, HOKANSON K, HALSEY M, 2005. Biosafety considerations for selectable and scorable markers used in cassava (Manihot esculenta Crantz) biotechnology. Environ Biosafety Res. 4(2):89- 102.

PROCANA. Disponível em www.procana.com.br

RANDHAWA GJ, SINGH M, GROVER M, 2011.Bioinformatic analysis for allergenicity assessment of Bacillus thuringiensis Cry proteins expressed in insect-resistant food crops. Food Chem Toxicol. 49(2):356-62.

ROACH, B. T., & DANIELS, J. (1987). A review of the origin and improvement of sugarcane. In Copersucar international sugarcane breeding workshop (Vol. 1, pp. 1-31).

RODRIGUES, A. A., PRIMAVESI, O., & ESTEVES, S. N. (1997). Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 32(12), 1333-1338.

ROMEIS, J., DUTTON, A., & BIGLER, F. (2004). *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens)(Neuroptera: Chrysopidae). Journal of Insect Physiology, 50(2), p. 175-183.

SANTOS, P.F., WHITFORD, W.G. (1981). The effects of microarthropods on litter decomposition in a Chihuahuan desert ecosystem. Ecology, 62, p. 654-663.

SENASA (2015). Eventos con evaluación de aptitud alimentaria favorable / Events with favourable food safety assessment". Disponível em: http://senasa.gob.ar/eventos-con-evaluacion-de-aptitud-alimentaria-favorable-events-favourable-food-safety-assessment

SILVA FILHO, A. P. (2008) Cana-de-açúcar, alternativa sutentável e econômica na alimentação de bovinos confinados. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 79p.

SREENIVASAN, T.V., AHLOOWALIA, B.S., HEINZ, D.J. (1987). Cytogenetics. Chapter 5, In: DJ Heinz, ed. Sugarcane improvement through breeding. Elsevier Amsterdam. p. 221-253.

UNICA (2017). Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2015/2016. Disponível em: http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=180. Consultado em 28/04/2017.

USDA (2016). Sugar: World markets and trade. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/Sugar.pdf. Consultado em 28/04/2017.

UNICADATA. Disponível em www.unicadata.com.br

VERCESI, M. L., KROGH, P. H., & HOLMSTRUP, M. (2006). Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. Applied Soil Ecology, 32(2), p. 180-187.

WENG, L-X, et al. (2011).Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified *cry1Ac* provide effective control against stem borers in field trials. Transgenic Research, 20(4), p.759-772.

WU, H. et al. (2015). Transgene integration complexity and expression stability following biolistic or Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 51(6), p. 603-611.

WHO, 1999. *Bacillus thuringiensis*. Microbial Pest Control Agent. Environmental Health Criteria 217. World Health Organization. Genebra, Suíça. Disponível em http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/EHC217.PDF

XU W, CAO S, HE X, LUO Y, GUO X, YUAN Y, HUANG K, 2009. Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein. Food Chem Toxicol. 47(7):1459-65.

IX - Votos Contrários:

Votaram pelo indeferimento da Proposta:

- Mohamed Ezz El-Din Mostafa Habib – Especialista em meio ambiente
- João Dagoberto dos Santos – Especialista em agricultura familiar
- Isaque Medeiros Siqueira – Representante do Meio Ambiente.

O presente processo foi objeto de pedido de vistas, elaborado pelo Dr. Valerio P. Pillar, especialista da área ambiental, que solicitou em suas alegações finais, o encaminhamento do processo para diligência, por considerar que:

(1) falta de informação sobre a diferença mínima detectável e sua relevância ecológica para cada um dos testes não significativos,
(2) pequeno tamanho das parcelas experimentais nos ensaios avaliando efeitos sobre organismos não alvo,
(3) uso de métodos de captura inadequados para organismos não alvo de lepidópteros,
(4) falta de teste estatístico nas avaliações da microbiota,
(5) ausência de ensaios avaliando efeitos do consumo da variedade de cana-de-açúcar CTB141175/01-A por animais domésticos e por humanos,
(6) ausência de dados sobre a frequência com que ocorre o cruzamento da variedade CTB141175/01-A com outras variedades e com espécies sexualmente compatíveis, arrolando as espécies avaliadas, as técnicas utilizadas e os efeitos resultantes.

O pedido de diligência foi votado e não acatado pelo plenário da CTNBio.

Brasília – 08 de julho de 2017

Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio

Assessor Técnico: Gutemberg D. Sousa

SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10
Brasília , DF – CEP: 70610-200
Fones: (55)(61) 3411 5151 – FAX: (55)(61) 3317 7475