PARECER TÉCNICO Nº 1598/2008

Processo nº:01200.004487/2004-48
Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.
CNPJ: 64.858.525/0001-45
Endereço: Avenida das Nações Unidas, 12901, Torre Norte 7º Andar, São Paulo-SP
Assunto: Liberação Comercial de algodão geneticamente modificado
Extrato Prévio: 242/2004 publicado no D.O.U 195 de 08/10/2004, Seção 3, página 06
Reunião: 116ª Reunião ordinária, ocorrida em 18/09/2008
Decisão: Deferido

A CTNBio, após apreciação do pedido de Parecer Técnico para liberação comercial de algodão geneticamente modificado (Algodão Roundup Ready, Evento MON 1445) bem como de todas as progênies provenientes do evento de transformação evento MON 1445 e seus derivados de cruzamento de linhagens e populações não transgênicas de algodão com linhagens portadoras do evento MON 1445, concluiu pelo seu DEFERIMENTO nos termos deste parecer técnico.

A Monsanto do Brasil Ltda. solicitou à CTNBio Parecer Técnico relativo à biossegurança do algodão (*Gossypium hirsutum*) geneticamente modificado tolerante ao herbicida glifosato, designado Algodão Roundup Ready, para efeito de sua liberação ao livre registro, uso no meio ambiente, consumo humano ou animal, comércio ou uso industrial e qualquer outro uso e atividade relacionada a esse OGM ou linhagens ou cultivares dele derivadas, assim como os subprodutos obtidos, respeitadas as demais legislações e exigências aplicáveis a qualquer utilização das espécies cultivadas do gênero *Gossypium* vigentes no país. O Algodão Roundup Ready Evento MON 1445 foi produzido por transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídio PV-GHGT07, utilizando como planta receptora a variedade de algodão Coker 312. Nesse plasmídio estão presentes os genes *cp4 epsps, nptII, add e gox*. O gene *cp4-epsps* inserido foi obtido a partir de um trecho específico do DNA da bactéria *Agrobacterium* sp. cepa CP4 e codifica a enzima CP4-EPSPS (CP4 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase), que confere às plantas de algodão o atributo que possibilita o uso em pós-emergência do herbicida glifosato, para manejo de plantas daninhas, sem causar injúria à lavoura de algodão. O gene *nptII* codifica a proteína Neomicina Fosfotransferase tipo II, que confere tolerância aos antibióticos neomicina e canamicina. O gene *aad*, que codifica a proteína AAD (3´(9)-O-aminoglicosídeo adeniltransferase – marcador de seleção de resistência a antibióticos), não é expresso em tecido vegetal. O gene *gox* codifica a enzima GOX (glifosato oxidoredutase) que é responsável por metabolizar o herbicida glifosato. O gene *gox* não foi transferido para o algodão, e consequentemente, a proteína GOX não foi detectada no Algodão Roundup Ready evento MON 1445. Não existe qualquer evidência de que os organismos doadores dos genes inseridos sejam patogênicos ao homem. As análises moleculares e de segregação (padrão Mendeliano de 3:1) mostraram que o T-DNA foi parcialmente inserido em um único lócus do genoma do algodão. A estabilidade genética do evento MON 1445 foi determinada pelo padrão de estabilidade hereditária, pela integridade do DNA inserido e pela estabilidade do fenótipo em várias condições ambientais determinadas em várias gerações de linhagens obtidas por retrocruzamento com cultivares elite. Essa estabilidade foi também demonstrada pela integridade do DNA inserido e pela funcionalidade da proteína CP4 EPSPS expressa em linhagens obtidas por cruzamento com uma cultivar adaptada para plantio em ambiente brasileiro. As proteínas EPSPS e NPTII, as quais não têm histórico de toxicidade ou alergenicidade, resultantes da expressão dos transgenes se mostraram equivalentes às presentes na natureza. O gene *epsps* está presente tanto em plantas quanto em microrganismos, enquanto *nptII* está presente em muitas espécies de microrganismos, inclusive em bactérias intestinais e no gênero *Bacillus* encontrados em solos no Brasil. Estudos *in vitro* demonstraram que em fluidos intestinais simulados (pH 1,2 e pH 7,5) a proteína EPSPS

é degradada rapidamente, o que é comum no trato digestivo de mamíferos com proteínas que apresentam risco mínimo de toxicidade ou alergenicidade. Além disso, os estudos de toxicidade oral aguda em camundongos mostraram que tanto EPSPS quanto NPTII não apresentam potencial tóxico quando administradas oralmente na dosagem de 572 mg/kg corporal e 5 g/kg corporal respectivamente. As duas proteínas transgênicas CP4 EPSPS E NPTII estão na natureza, amplamente distribuídas entre os microganismos de onde foram derivadas. A introgressão de um transgene para plantas silvestres de algodão só poderia ocorrer se este conferisse uma forte vantagem seletiva, superior às desvantagens conferidas pelos alelos que estão geneticamente ligados ao transgene. No entanto, a característica de tolerância a herbicida é reconhecida como não sendo capaz de dotar os genótipos receptores de qualquer vantagem adaptativa fora de áreas agrícolas, uma vez que fora destas áreas, os potenciais genótipos silvestres receptores não sofrem ação da pressão seletiva do herbicida e, portanto, a eventual polinização destes genótipos não resultaria em introgressão gênica. As avaliações das características fenotípicas e agronômicas do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 cultivar DP50RR realizadas no Brasil têm resultados semelhantes aos encontrados em outras regiões do mundo em plantio experimental e comercial. Com exceção da tolerância ao herbicida glifosato, resultante da expressão do gene *cp4 epsps*, o Algodão Roundup Ready evento MON 1445 demonstra características fenotípicas e agronômicas equivalentes ao padrão de linhagens parentais convencionais e de cultivares comerciais de algodão convencional. O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, possibilitando controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas. Esse herbicida encontra-se registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para fins agrícolas e no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA do Ministério do Ministério do Meio Ambiente para fins não agrícolas, além de possuir monografia aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. As informações indicam que as plantas transgênicas não diferem fundamentalmente dos genótipos de algodão não transformado, à exceção da tolerância ao glifosato. Adicionalmente, não há evidência de reações adversas ao uso do Algodão Roundup Ready. Por essas razões, não existem restrições ao uso deste algodão ou de seus derivados seja para alimentação humana ou de animais. Diante do exposto, a liberação comercial do Algodão Roundup Ready, evento 1445 não é potencialmente causadora de dano à saúde humana e animal, nem de significativa degradação do meio ambiente. 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 existem variedades crioulas de algodoeiros e as cadeias de algodoeiros especiais, convencionais e transgênicos têm convivido de modo satisfatório, sem que tenham sido divulgados relatos de problemas de coexistência. Conforme o Anexo I da Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2008, a requerente terá o prazo de 30 (trinta dias) a partir da publicação deste Parecer Técnico, para adequar sua proposta de plano de monitoramento pós-liberação comercial. No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Algodão Roundup Ready evento MON 1445

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

Espécie: *Gossypium hirsutum* L.

Característica Inserida: Tolerância ao herbicida glifosato

Método de introdução da característica: Co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens.*

Uso proposto: produção de fibras para a indústria têxtil e grãos para consumo humano e animal do OGM e seus derivados.

II. Informações Gerais

O algodão pertence ao gênero *Gossypium*, Tribo Gossypieae, Família Malvaceae, ordem Malvales e subdivide-se em quatro subgêneros (*Gossypium*, *Sturtia*, *Houzingenia* e *Karpas*), que, por sua vez, se subdividem em nove seções e várias subseções [(32)]. O gênero *Gossypium* compreende atualmente 50 espécies bastante diversas, sendo oriundos da América, África, Ásia e da Austrália [(31)]. Os centros de origem de *G. hirsutum* encontram-se no México e na Guatemala, enquanto os de *G. barbadense*, no Peru e na Bolívia [(79)].

No mundo ocorrem quatro espécies de algodoeiros de importância agronômica, cujas fibras possuem valor comercial: duas são espécies diplóides do Velho Mundo (*G. arboreum e G. herbaceum*) e as outras duas são alotetraplóides do Novo Mundo (*G. barbadense e G. hirsutum*). As duas espécies alotetraplóides respondem por aproximadamente 98% da produção de algodão mundial. A espécie *G. hirsutum* é cultivada em 90% da área [(57)]. Os cultivares de *G. hirsutum* foram classificados em quatro tipos principais: Eastern, Acala, Delta e Plains [(66)]. O tipo Eastern inclui a variedade Coker 312, que foi utilizada na transformação genética, gerando o Algodão Roundup Ready evento MON 1445.

Dois tipos de algodoeiro são predominantemente cultivados no Brasil: o convencional e o algodoeiro geneticamente modificado resistente a lagartas. Estes algodoeiros são os responsáveis por praticamente todo o algodão produzido no país. Além destes, três outros algodoeiros com características genéticas ou ecológicas especiais são cultivados: o algodoeiro de fibra naturalmente colorida, o algodoeiro orgânico e o algodoeiro agroecológico. O algodoeiro colorido concentra-se, quase exclusivamente, no estado da Paraíba, sendo a área plantada em 2007 de aproximadamente 300 hectares. A produção de algodão orgânico certificado é realizada no Paraná e na Paraíba, e a área cultivada em 2007 foi de 250 hectares.

Lavouras de algodões agroecológicos foram cultivadas por 235 agricultores no bioma semi-árido de quatro estados da região Nordeste e produziram 42 toneladas [58].

As cadeias de algodoeiros especiais, convencionais e transgênicos têm convivido de modo satisfatório, sem que tenham sido divulgados relatos de problemas de coexistência. A área plantada com algodoeiro no Brasil na safra 2007/2008 foi cerca de um milhão e cem mil hectares, dos quais mais de 85% concentra-se no bioma Cerrado, particularmente nos estados do Mato Grosso, Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul. As demais lavouras estão presentes em outros estados do país, principalmente no Semi-Árido da região Nordeste, no Paraná, em Minas Gerais e em São Paulo [49].

Além do algodoeiro herbáceo, três outros algodoeiros ocorrem no Brasil, todos alotetraplóides e, portanto, sexualmente compatíveis com os cultivares. Nenhuma destas espécies é considerada planta daninha em ambientes agrícolas ou naturais.

A espécie *G. barbadense* tem centro de domesticação no Norte do Peru e Sul do Equador [16]. Foi introduzida por povos pré-colombianos e sua fibra era empregada na produção de artesanatos têxteis por algumas etnias indígenas antes da chegada dos portugueses [63]. Seu uso como planta têxtil se difundiu entre os colonizadores, mas entrou em decadência com a disseminação das duas raças exóticas de *G. hirsutum*. Não é encontrada em ambientes naturais e é mantida, basicamente, como planta de fundo de quintal. Sua distribuição é ampla, estando presente em quase todo o país e a conservação *in situ* está diretamente ligada à manutenção das tradições de uso como planta medicinal [10].

A única espécie nativa do Brasil é *G. mustelinum*, com distribuição natural restrita ao semi-árido nordestino [31, 51]. Populações são conhecidas apenas nos estados da Bahia e do Rio Grande do Norte, em municípios que não produzem algodão herbáceo. Dois problemas comprometem a manutenção *in situ* de *G. mustelinum*. O primeiro e mais grave é a destruição de matas ciliares de rios e riachos intermitentes, o *habitat* da espécie. O segundo é a pecuária extensiva praticada na região, particularmente de caprinos. Os animais se alimentam de brotos, folhas, frutos, sementes e da casca do caule, prejudicando o desenvolvimento e, em alguns casos, matando as plantas adultas. A renovação das populações também é comprometida, pois o pastejo em indivíduos jovens ocasiona a destruição de parte das plantas [10]. A distância entre as populações conhecidas e as regiões produtoras de algodão impede que haja cruzamentos de *G. mustelinum* com plantas de algodoeiro herbáceo presentes nas lavouras.

O terceiro tipo de algodoeiro é conhecido como algodoeiro mocó e pertence a uma raça diferente da mesma espécie do herbáceo (*G. hirsutum* var. *marie galante* (Watt) Hutch.). É originária das Antilhas e não se sabe ao certo como foi introduzido no país, havendo hipóteses de que tenha sido trazido por holandeses ou africanos durante o período colonial [(63)]. O algodoeiro mocó foi muito cultivado no semi-árido do Nordeste até o final da década de 80, quando diversos problemas causaram abrupta interrupção no cultivo [(13)].

Pequena quantidade de algodoeiros arbóreos, principalmente híbridos inter-raciais de fibra branca e colorida produzidos pelo programa de melhoramento da Embrapa ainda são cultivados. Contudo, o cultivo destes materiais está em declínio, tendo sido colhidos 5.692 hectares na safra 2004/05 e apenas 1.326 hectares na safra 2005/06 [(49)]. As lavouras são cultivadas com um mínimo de insumos externos, sendo o mais importante o inseticida para o controle de insetos-praga. O controle de plantas daninhas é feito quase que exclusivamente com capinas manuais. Populações transientes de elevada importância biológica desta raça, derivadas de lavouras abandonadas, são encontradas no alto de serras em alguns municípios do Seridó Paraibano e Potiguar [(10)]. Tais populações estão geograficamente isoladas de lavouras de algodoeiro herbáceo e bem representadas nos bancos de germoplasma da Embrapa.

A planta de algodão é geralmente considerada anual, embora seja tida como perene em algumas partes do mundo, onde espécies como *G. hirsutum* são cultivadas comercialmente. No Brasil, o algodão pode ser cultivado durante quase todo o ano em regiões onde os invernos não são rigorosos, permitindo duas colheitas, apesar de se tratar de safra anual.

O algodão possui um ramo central e ramos de dois tipos (vegetativo e de frutificação), com altura que atinge 1,5 metro. As folhas são alternadas em uma distribuição em espiral ao redor dos ramos, pecioladas e possuem de três a cinco lóbulos claramente definidos, assim como pêlos e lâmina cordata ao longo de 7,5 cm a 15,0 cm de comprimento por lóbulo [(27)]. Na base de cada folha do ramo principal, no ângulo entre a folha e o ramo, existem duas ou três gemas axilares que originam os ramos vegetativos e de frutificação. Os ramos de frutificação produzem gemas florais que se desenvolvem em maçãs [(62)].

O florescimento inicia-se num prazo de 7 a 11 semanas após o plantio, com uma média de seis a oito flores em cada ramo fértil, todas grandes, de coloração branca ou amarela, presas por um cálice reduzido e com três a quatro brácteas verdes grandes franjadas. As flores possuem cinco pétalas separadas, assim como outros membros da família Malvaceae. A coluna estaminal circunda o estilete formado de 100 ou mais estames que terminam em anteras e normalmente produzem 45 mil grãos de pólen por flor [(86)]. Os grãos de pólen são

grandes, têm de 81 a 143 micra de tamanho e são recobertos com um material viscoso que promove a sua aderência, o que faz com que o pólen de algodão não seja transportado pelo vento. As pétalas possuem coloração que se altera durante o dia, atraindo polinizadores [61].

O ovário superior (maçã), que se desenvolve dentro da cápsula, é uma estrutura seca que, quando aberta, mostra uma divisão em três a cinco carpelos ou lóculos, os quais possuem de cinco a dez óvulos cada um. O fruto é uma cápsula de 4,0 cm a 6,0 cm de tamanho, esférica, de textura macia, verde-clara, com poucas glândulas de óleo. As sementes possuem 1,0 cm de tamanho, são ovóides, de coloração marrom-escura, em número de aproximadamente 36 por fruto. O peso de 100 sementes é por volta de 10,0 g a 13,0 g, com fibras de dois tipos em sua epiderme (longas e curtas) [27]. As sementes com as fibras encontram-se dentro dos carpelos. As fibras longas são conhecidas como línter, e as curtas, como penugem. A maioria das espécies de algodão não possui línter. Cada fibra é, na realidade, uma célula única de fibra que cresce na epiderme da casca da semente. A parede celular torna-se mais espessa pela adição de camadas de celulose. As maçãs maduras possuem diversos tamanhos e formas, dependendo da variedade e das condições ambientais, mas aquelas que se desenvolvem nas primeiras três semanas do florescimento são usualmente maiores e contêm as fibras de qualidade superior.

Nectários são normalmente encontrados em cinco diferentes partes da planta (floral, interna, externa, foliar e microscópica). Os nectários florais devem estar associados à polinização e os extraflorais, à atração de insetos [61]. O algodão possui ainda glândulas especiais em vários tecidos (incluindo caroço) que produzem um composto químico chamado gossipol, o qual constitui uma substância terpenóide biologicamente ativa que funciona como uma defesa contra herbívoros. O gossipol é um antioxidante e inibidor de polimerização, sendo tóxico para animais monogástricos como suínos e coelhos. Os sintomas principais são constipação, perda de peso e apetite, bem como efeitos no sistema circulatório. A toxicidade aguda é baixa, mas a ingestão de baixas quantidades por muito tempo pode ser letal. Considera-se que dietas de suínos e aves não devem conter mais de 100 mg de gossipol livre/kg de peso e que inclusões de caroço de algodão na ração devem estar entre 50 kg/t e 100 kg/t de ração. O processamento do caroço do algodão a altas temperaturas é um eficiente desativador do gossipol [76].

O algodão é usualmente apresentado como uma cultura de polinização cruzada parcial, embora muitos melhoristas considerem a planta como completamente autofértil e autopolinizadora, exceto por polinização cruzada, causada por insetos polinizadores. Freire [31] afirma que a planta de algodão apresenta um sistema reprodutivo intermediário entre aquele

encontrado nas plantas alógamas e nas autógamas, com taxas de polinização cruzada entre 5% e 95%. A polinização cruzada é chamada de cruzamento natural e mantém um grau de heterozigose a partir de F1 [76].

A autopolinização é a forma de hibridação que ocorre preferencialmente na cultura do algodão, embora o cruzamento natural possa ocorrer [66]. A polinização controlada no algodoeiro é simples e consiste em utilizar métodos que impeçam a abertura das flores. O cruzamento é também facilmente realizável, fazendo-se a emasculação e a proteção do estigma na véspera e a polinização no dia seguinte. A produção de caroço é de 20 a 30 por fruto quando o cruzamento e a autopolinização são bem realizados [35].

O tempo de florescimento do algodoeiro pode diversificar-se de acordo com a variedade e as condições ambientais, mas geralmente se inicia aos 50 dias após emergência e prolonga-se até 120 dias ou mais, com pico da curva ao redor de 70 ou 80 dias. Os procedimentos de autopolinização e cruzamento devem ser realizados na época mais propícia, com 30 a 40 dias de florescimento.

O combate a plantas daninhas é um dos principais tratos culturais realizados nas lavouras de algodão. As interações negativas de plantas daninhas com o algodoeiro, particularmente a competição, a alelopatia e interferência nas atividades agrícolas, causam reduções de produtividade e depreciação do algodão produzido. As perdas podem ser muito elevadas caso o controle não seja efetuado de modo correto e no momento adequado [18]. As principais plantas invasoras que ocorrem na cultura do algodoeiro no Brasil são: capim carrapicho (*Cenchrus equinatus*), capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*), capim colchão (*Digitaria horizontalis*), grama-seda (*Cynodon dactilon*), picão preto *(Bidens pilosa*), carrapicho de carneiro (*Acanthospermum hispidum*) e corda-de-viola (*Ipomea* sp.). O manejo das plantas daninhas é realizado com métodos culturais, mecânicos e químicos, sendo o controle por meio da aplicação de herbicidas o principal método de controle.

O Algodão Roundup Ready é comercializado nos Estados Unidos da América (desde 1995), Canadá (1996), Japão (1997), Argentina (1999), Austrália (2000), México (2000), África do Sul (2000), Coréia (2003), Filipinas (2003), China (2004) e União Européia (2005) [1].

III. Descrição do OGM e Proteínas Expressas

O Algodão Roundup Ready evento MON 1445 foi geneticamente modificado a partir da transformação da variedade comercial Coker 312 com o plasmídeo PVGHGT07, através do sistema mediado por *A. tumefaciens*. A transformação inseriu os genes *cp4 epsps, nptII, gox* e *aad* no genoma dessa variedade de algodão [75]. A linhagem resultante da transformação

expressa a enzima CP4 EPSPS (CP4 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase) proveniente da *Agrobacterium* sp. cepa CP4, que é naturalmente tolerante ao glifosato, o ingrediente ativo do herbicida Roundup. Essa linhagem expressa também a proteína NPTII (neomicina fosfotransferase tipo II), que confere resistência a antibióticos aminoglicosilados, possibilitando a seleção de células transformadas com o gene *cp4 epsps* em um meio de cultura contendo o antibiótico canamicina nas fases in vitro do processo de transformação. O terceiro gene introduzido, *aad*, codifica a proteína AAD (3"(9)-O-aminoglicosídeo adenililtransferase). Esse gene não é expresso em tecido vegetal por estar sob o controle de um promotor procariótico.

A metodologia de transformação genética utilizada para a produção do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 foi o sistema indireto mediado pela bactéria *A. tumefaciens*. Várias revisões sobre esse sistema de transformação de plantas, incluindo detalhes do mecanismo molecular desse processo, foram publicadas nos últimos anos [5, 15, 21, 44, 46, 83, 89].

A. tumefaciens é uma bactéria aeróbica, Gram-negativa, comumente encontrada no solo e é responsável por causar um tumor em plantas conhecido como "galha-da-coroa" [77]. A formação do tumor está associada a um processo natural de transferência de sequencias específicas de DNA (T-DNA, transferred DNA) presentes em um plasmídeo da bactéria chamado Ti, (tumor inducible plasmid) para o cromossomo nuclear das células vegetais infectadas, onde o T-DNA é integrado e expresso de forma estável.

As alterações fisiológicas causadas por linhagens selvagens de *A. tumefaciens* não permitem que estas sejam utilizadas na obtenção de plantas transgênicas. Para a utilização como metodologia de transformação, a linhagem de *A. tumefaciens* (A208) resistente ao antibiótico cloranfenicol foi modificada para não causar tumores em plantas. Para tanto, os genes da síntese dos hormônios presentes no plasmídeo Ti que causam a formação do tumor foram retirados e, em seu lugar, foi colocado o plasmídeo desarmado pMP9ORK [77]. Esse processo gerou uma linhagem de *A. tumefaciens* desarmada (ABI), sem a capacidade de formar tumor. Apesar de desarmado, o plasmídeo pMP9ORK foi construído com todas as funções necessárias para sua replicação autônoma e com os genes *vir,* que promovem a transferência do T-DNA para o cromossomo da planta. Esse sistema é capaz de transferir genes para células vegetais e manter a viabilidade de regeneração de células transformadas em uma planta, sem causar a formação do tumor [46, 55, 56].

O plasmídeo pMP90RK foi construído com elementos genéticos que possibilitam a replicação e transferência de plasmídeos entre *Escherichia coli* e *A. tumefaciens* (RK2 fatores de mobilização e de transferência) se os organismos hospedeiros contiverem funções RK2 auxiliares de replicação e mobilização. Os genes *vir* e os elementos RK2 envolvidos na

mobilização entre bactérias são capazes de agir em *cis* ou em *trans*, podendo estar presentes na mesma estrutura gênica que abriga o T-DNA ou em uma estrutura gênica distinta [45]. O único elemento que é necessário estar presente na mesma estrutura gênica que abriga o T-DNA são sequências de cerca 25 pb nas extremidades do T-DNA que delimitam a sua transferência. Utilizando *E. coli* como organismo hospedeiro, o T-DNA de interesse pode ser montado em um plasmídeo binário distinto (que contém elementos de funções RK2 auxiliares de replicação e mobilização com sinais específicos para a ação dos genes *vir*) e transferido para *A. tumefaciens* por conjugação. Subseqüentemente, o co-cultivo do *A. tumefaciens* ABI contendo o plasmídeo que carrega o T-DNA de interesse com o tecido vegetal pode resultar na transferência do T-DNA para o genoma nuclear da célula vegetal através das funções *vir* codificadas pelo plasmídeo pMP9ORK desarmado [52, 78]. Nesse processo, os genes *vir* não se transferem para as células da planta, permanecendo no *Agrobacterium*. A transferência do T-DNA é iniciada pelas proteínas codificadas pelos genes *vir*, que reconhecem as sequencias específicas nas extremidades do T-DNA. Essas extremidades são necessárias, mas não são totalmente transferidas, resultando em uma transferência irreversível do T-DNA [9, 48]. Portanto o DNA inserido deixa de ser um T-DNA, pois não contém mais as extremidades necessárias à transferência [9].

Para a geração do Algodão Roundup Ready evento MON 1445, o plasmídeo PV-GHGT07, que contém o T-DNA com os genes de interesse, foi construído em *E. coli* cepa MM-294 (derivada da *E. coli* cepa K-12) e transferido para a linhagem de *Agrobacterium* ABI por meio de uma conjugação triparental. A conjugação triparental envolveu três participantes: a linhagem *Agrobacterium* ABI desarmada, a *E. coli* contendo o plasmídeo pRK2013 que contém as funções RK2 auxiliares [26] e a *E. coli* contendo o plasmídeo PV-GHGT07 com o T-DNA que possui os genes a serem introduzidos.

A linhagem *Agrobacterium* ABI contendo o plasmídeo PV-GHGT07 foi selecionada e cultivada em meio de cultura contendo os antibióticos espectinomicina e estreptomicina. Subseqüentemente, a linhagem *Agrobacterium* ABI contendo o plasmídeo PV-GHGT07 foi co-cultivada com seções de hipocótilo de algodão da cultivar Coker 312. Além do gene *cp4 epsps*, o plasmídeo PV-GHGT07 contém o gene *nptII*, que permite a seleção de células transformadas em meio contendo o antibiótico canamicina. Posteriormente, células residuais de *Agrobacterium* no meio de cultura foram eliminadas com o uso de diferentes antibióticos e os hipocótilos foram transferidos para meio de cultura específico para iniciação de calos embriogênicos, contendo os antibióticos carbenicilina e canamicina. Subseqüentemente, as células geneticamente modificadas foram estimuladas para a regeneração de brotos e

plântulas. As plântulas foram cultivadas em solo, avaliadas para tolerância ao glifosato e desenvolvidas para eventual produção de sementes de acordo com metodologia descrita por Trolinder e Goodin [85].

O gene *cp4 epsps*, que faz parte da construção quimérica descrita acima (P-FMV/CTP2/*cp4 epsps* / E9 3'), codifica a proteína CP4 EPSPS, responsável pela tolerância do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 ao herbicida glifosato. A região codificadora do gene *cp4 epsps*, é derivada da bactéria de solo *Agrobacterium* sp. cepa CP4. Esta bactéria foi identificada em uma varredura de microrganismos resistentes à ação da molécula do glifosato [68, 69]. O *Agrobacterium* sp. cepa CP4, assim como outras bactérias e alguns fungos do solo, são resistentes à ação do glifosato por possuírem a enzima EPSPS pouco sensível à inibição desse herbicida [74]. A escolha dessa bactéria como fonte do gene de resistência ocorreu principalmente pelas características cinéticas da enzima CP4 EPSPS para a alta tolerância ao glifosato, isto é, constante de inibição (Ki) da ordem de 2,7 mM, mantendo ainda alta afinidade por fosfoenolpiruvato (PEP) (Km = 12 µM), um de seus substratos. Em outras palavras, a concentração de glifosato necessária para a inibição da enzima é cerca de 2000 vezes maior que a concentração de um de seus substratos, o PEP, o que significa que ela tem altíssima afinidade por esse substrato e baixíssima para o seu inibidor, o glifosato. Esses parâmetros se invertem quando a enzima é suscetível ao efeito inibitório do glifosato.

O gene *cp4 epsps* foi fundido com a seqüência codificadora do peptídeo de trânsito para o cloropasto derivada da EPSPS de *Arabidopsis thaliana*, CTP2 [53], complementada com as sequencias promotora e finalizadora para que pudesse expressar a enzima CP4 EPSPS e transportá-la para o cloroplasto de células vegetais [75].

O gene *nptII* codifica a proteína NPTII (neomicina fosfotransferase tipo II) e faz parte da construção quimérica descrita acima (35S /nptII/NOS 3'). A região codificadora do gene *nptII* é derivada do transposon procariótico Tn5 da bactéria *E. coli* [12], amplamente encontrada na natureza. A seqüência do gene *nptII* não foi modificada, apenas foi complementada com sequencias promotoras e finalizadoras para que pudesse expressar a proteína NPTII em plantas. O gene *nptII* funciona como um marcador dominante de seleção nos estágios iniciais em laboratório, identificando células vegetais transformadas [22, 47]. A enzima NPTII utiliza adenosina-trifosfato (ATP) para fosforilar e inativar antibióticos aminoglicosídicos (tais como neomicina e canamicina), o que evita que eles causem injúria nas células que expressam NPTII quando elas são cultivadas em meio de cultura contendo esses agentes seletivos. O único objetivo da inserção do gene *nptII* no Algodão Roundup Ready evento MON 1445 foi, portanto, a seleção de células transformadas que contivessem o gene *cp4 epsps* (uma vez que

os dois genes fazem parte da mesma construção gênica) na fase *in vitro*, sem nenhuma outra função [75].

O gene *aad* codifica a proteína AAD (3"(9)-O-aminoglicosídeo adenililtransferase). Esse gene, em conjunto com os seus elementos reguladores (promotor e finalizador), foi isolado do transposon Tn7, o qual é comumente encontrado em bactérias Gram-negativas como a *E. coli* [29]. A seqüência do gene *aad* não foi modificada em relação àquela encontrada na natureza. Como a seqüência promotora da expressão do gene *aad* é de origem procariótica, a expressão da proteína AAD ocorre somente em sistema microbiano e, por isso não foi detectada no Algodão Roundup Ready, evento MON 1445. Esse gene foi utilizado como marcador de seleção das bactérias *E. coli* e *A. tumefaciens* que continham o plasmídeo PV-GHGT07. Os antibióticos espectinomicina e estreptomicina foram adicionados como agentes seletivos no meio de cultura. O único objetivo da inserção do gene *aad* no algodão é a seleção de células bacterianas que contivessem o plasmídeo de interesse, não possuindo nenhuma outra função [75].

O gene *gox* codifica a enzima GOX (glifosato oxidoredutase) que é responsável por metabolizar o herbicida glifosato. A região codificadora do gene *gox* é derivada da *Ochrobactrum anthropi,* cepa LBAA, isolada em reservas de despejo e tratamento de afluentes de produção industrial de glifosato [11, 42]. A enzima GOX tem a capacidade de degradar o glifosato para aminometil ácido fosfônico (AMPA) e glioxilato. A conversão do glifosato para aminometil ácido fosfônico é a via principal da degradação do glifosato no solo [37, 72, 84].

O propósito original na utilização do gene *gox* foi obter um aumento na tolerância ao herbicida através de uma redução geral na concentração do glifosato na planta e impedir o acúmulo do glifosato a níveis tóxicos nos órgãos sensíveis da planta. A região codificadora do gene *gox* foi redesenhada e resintetizada para expressão em plantas dicotiledôneas, considerando os mesmos critérios descritos para o gene *cp4 epsps*. O gene foi ligado à seqüência codificadora do peptídeo de trânsito para o cloroplasto da subunidade pequena da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase da *Arabidopsis thaliana*, CTP1 [54], complementado com as sequencias promotora e finalizadora para que a enzima GOX pudesse ser expressa e transportada para o cloroplasto das células da planta. Apesar de estar presente no plasmídeo PV-GHGT07, o gene *gox* não foi transferido para o algodão, e consequentemente, a proteína GOX não foi detectada no Algodão Roundup Ready, evento MON 1445 [75].

IV. Aspectos relacionados à saúde Humana e dos Animais

A proteína CP4 EPSPS 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase pertence à família de enzimas presente em todas as plantas (inclusive no algodão) e em um grande número de microrganismos [29]. Estas enzimas têm sido isoladas de várias fontes, e suas propriedades têm sido amplamente estudadas [48]. As enzimas EPSPS bacterianas e vegetais são monofuncionais, com massa molecular de 44-48 kD [30] e catalisam a transferência do grupo enolpiruvil, de fosfoenolpiruvato (PEP) para a 5-hidroxi da shiquimato-3-fosfato (S3P), produzindo fosfato inorgânico e 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato [3].

Em virtude de rigorosa especificidade para os substratos, as enzimas EPSPS ligam apenas S3P, PEP e glifosato. O único produto metabólico resultante conhecido é o ácido 5-enolpiruvilshiquímico-3-fosfato, o que corresponde ao penúltimo produto da via do ácido shiquímico. O ácido shiquímico é um precursor para a biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), além de muitos metabólicos secundários, como o tetrahidrofolato, a ubiquinona e a vitamina K [39]. Embora a via do ácido shiquímico (ou shiquimato) e as proteínas EPSPS não ocorram em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos, elas são importantes em plantas. Calcula-se que as moléculas aromáticas, todas derivadas do ácido shiquímico, representem 35% ou mais do peso seco de uma planta [3, 30].

Estudos *in vitro* com fluidos digestivos simulados são ferramentas amplamente utilizadas como modelo da digestão animal. Este sistema simulado foi utilizado para investigar a digestibilidade de proteínas de plantas [60, 65], proteínas de animais [88] e aditivos de alimentos [81], assim como avaliar a qualidade da proteína [2] e o potencial de alergenicidade através da absorção das proteínas pelo sistema digestivo [6].

Adicionalmente, o conhecimento sobre o modo de ação, a especificidade e o histórico de uso seguro das proteínas EPSPS e NPTII, o potencial de efeitos tóxicos e alergênicos destas proteínas em humanos e outros mamíferos foi avaliado através de estudos de digestão *in vitro*. Os estudos utilizaram fluidos simulados gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 7,5). A taxa de degradação da proteína CP4 EPSPS (proteína madura, sem o peptídeo de trânsito) foi avaliada através de análises de *Western Blot*. O estudo mostrou que a proteína CP4 EPSPS e peptídeos se degradam em menos de 15 segundos após a exposição ao fluido gástrico. No fluido intestinal simulado, a degradação da proteína CP4 EPSPS ocorreu em um período inferior a 10 minutos [43].

A taxa de degradação da proteína NPTII foi avaliada através da atividade enzimática. O estudo mostrou que a proteína NPTII foi destruída após dois minutos de incubação no fluido

gástrico simulado e 15 minutos de incubação no fluido intestinal simulado [34]. Baseado nos resultados desses estudos, é previsto que as novas proteínas CP4 EPSPS e NPTII expressas no Algodão Roundup Ready evento MON 1445 sejam rapidamente digeridas no trato digestivo de mamíferos. As proteínas exógenas rapidamente digeridas constituem um risco mínimo de toxicidade ou alergia quando comparadas às demais proteínas dietéticas seguras [6, 7].

Estudos de toxicidade oral aguda das proteínas CP4 EPSPS e NPTII foram realizados utilizando camundongos albinos como indicadores [14, 34]. Resultados demonstraram que não houve evidência de toxicidade quando a proteína CP4 EPSPS foi administrada oralmente por gavagem aos camundongos, em doses de 572, 154 e 49 mg da proteína por kg de peso corporal. Particularmente não foram observados sinais clínicos anormais em nenhum dos animais durante o estudo, de modo que não houve diferença estatística significativa em peso corporal, peso corporal cumulativo ou consumo de alimentos entre os tratamentos e os grupos de controle. Todos os animais foram sacrificados no sétimo dia pós-dosagem e submetidos à necropsia, sendo que nenhum efeito patológico foi observado [14].

Baseado nos dados de expressão da proteína CP4 EPSPS no caroço do Algodão Roundup Ready evento MON 1445, a dose de 572 mg por kg de peso corporal equivale a um consumo entre 3,2 a 7,1 kg de caroço por kg de peso corporal. No estudo realizado com a proteína NPTII, doses de 5000, 1000 e 100 mg da NPTII por kg de peso corporal foram administradas oralmente por gavagem aos camundongos. Todos os animais foram sacrificados no sétimo dia pós-dosagem e submetidos à necropsia, sendo que nenhum efeito patológico foi observado [34]. Baseado nos dados de expressão da proteína NPTII no caroço do Algodão Roundup Ready, evento MON 1445, a dose de 5000 mg por kg de peso corporal equivale a um consumo de aproximadamente 700 kg de caroço por kg de peso corporal.

As análises composicionais (proteínas, lipídios, fibras, carboidratos, aminoácidos, minerais, teor calórico, α-tocoferol e gossipol) não mostraram diferenças significativas entre o evento MON1445 e o parental não-GM ou outras variedades comerciais.

Os resultados desses estudos confirmam que as proteínas CP4 EPSPS e NPTII não possuem toxicidade oral aguda para mamíferos. Os resultados são compatíveis com a ausência de qualquer similaridade de seqüência de aminoácidos com proteínas tóxicas conhecidas e com a rápida digestão destas proteínas nos fluidos gástricos e intestinais.

V. Aspectos Ambientais e Agronômicos

A agricultura moderna é uma atividade responsável por significativos impactos ambientais negativos [8, 17, 40, 71, 82] e, portanto, a avaliação de riscos de qualquer evento GM

deve ser realizada em relação ao impacto que já é inerente à agricultura convencional [13, 19, 64]. Assim, a análise da CTNBio objetivou avaliar se o impacto ambiental causado pelo Algodão Roundup Ready, evento MON 1445 é significativamente superior ao causado pelas variedades convencionais considerando as práticas agrícolas associadas a cada sistema.

A maioria dos mamíferos, tanto silvestres como de criação, evita o consumo do algodão, devido à presença do gossipol e de outros componentes dos tecidos da planta. O uso do caroço de algodão é, por isso também, bastante limitado na pecuária. Além disso, nos campos, a semente do algodão está coberta pela pluma, o que a torna pouco atraente para aves. Nos dois casos, portanto, é pouco provável que animais silvestres venham a se alimentar de quantidades significativas de sementes de algodão ou de outras partes da planta. Na pecuária, a exposição às proteínas recombinantes será necessariamente limitada. Na criação de peixes, a semente de algodão não é empregada. Não se espera que plantas de algodão e pólen alcancem rios e outras coleções de água em quantidades significativas para causar qualquer preocupação: no manejo desta cultura, a retenção da água de irrigação nos campos é vital e o escoamento das águas de chuva para córregos e rios próximos deve ser minimizada por razões ambientais (carreamento de herbicidas e outros defensivos agrícolas para as coleções de água). Por tudo isso, é pouco provável que peixes venham a ser regularmente expostos a quantidades significativas das proteínas recombinantes do algodão MON 1445, tanto na natureza, como em criação em açudes ou tanques-rede. Ademais, a proteína EPSPS é considerada ubíqua na natureza por estar presente em todas as plantas e em um grande número de microrganismos. Por isso, todos os seres vivos que se alimentam de plantas e microrganismos já são expostos às proteínas EPSPS.

Os invertebrados podem entrar em contato com as proteínas recombinantes diretamente consumindo o algodoeiro ou pela predação de insetos que dele se alimentaram. A exposição será maior para aqueles que se alimentam diretamente de folhas e outros tecidos. Polinizadores e consumidores de pólen podem ser expostos a quantidades pequenas de proteínas recombinantes, já que a expressão destas proteínas no pólen é muito inferior a dos demais tecidos, o que está amplamente documentado no processo.

Uma vez que as proteínas recombinantes são consumidas, não parece haver qualquer efeito sobre os insetos: embora não haja trabalhos publicados sobre isso, o algodão MON 1445 foi testado tanto nos EUA como no Brasil quanto à susceptibilidade a várias pragas agrícolas e não houve qualquer diferença de susceptibilidade entre a linhagem transgênica e a parental. É preciso ter em mente que a proteína EPSPS está presente em todas as plantas e também em bactérias, algas e fungos e que a diferença estrutural ou enzimática entre a CP4-EPSPS e a

EPSPS natural é desprezível. A proteína NPT-II, por sua vez, não possui qualquer propriedade que a distinga da mesma enzima em microrganismos [87]. As duas proteínas transgênicas estão na natureza, amplamente distribuídas entre os microrganismos de onde foram derivadas. Assim, a expressão destas proteínas na planta de algodão não deve ter qualquer efeito tóxico em invertebrados.

Embora a produção de antibióticos por bactérias não patogênicas do solo tenha sido associada à redução de certas doenças de plantas, não há evidência do envolvimento de neomicina ou canamicina. Ademais, estes antibióticos não são empregados na agricultura para o controle de doenças originadas do solo. Por isso, não é provável que a presença da proteína NPT-II no solo impacte a população microbiana nele presente. Além disso, a expressão desta proteína em diferentes cultivos transgênicos como algodão, canola, milho e tomate nunca foi relacionada ao aumento de nenhuma doença de plantas.

A transferência horizontal de genes é um evento possível, porém extremamente raro entre um eucarioto e um procarioto, ou mesmo entre um eucarioto e outro, quando entre eles não há nenhuma proximidade evolutiva. Apenas entre microrganismos a transferência horizontal pode ocorrer, embora ainda assim em taxas muito baixas. Os microrganismos que por transferência horizontal de genes ganhassem uma cópia do gene *cp4-epsps* teriam a capacidade de sintetizar aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos, mesmo na presença de glifosato. Ocorre, contudo, que a capacidade de degradar o glifosato está amplamente distribuída na comunidade microbiana, de forma que este novo caráter em nada contribuiria para a manutenção do gene transferido. Como citado anteriormente, a comunidade microbiana do solo não parece ser afetada por nenhuma das culturas expressando o gene *cp4-epsps*. Ademais, é importante lembrar que o gene *epsps* é ubíquo e a flora microbiana já é, naturalmente, tolerante ao glifosato.

Da mesma forma, microrganismos que recebessem o gene *npt-II* poderiam se tornar resistentes a neomicina e outros antibióticos relacionados. Entretanto, como discutido anteriormente, não haveria pressão seletiva sobre estes microrganismos, já que estes antibióticos não são empregados nos plantios comerciais. Também não há qualquer relato de mudança da flora microbiana do solo associada à expressão destes genes. A transferência de outros elementos da construção para a flora microbiana, como o promotor CaMV, poderiam eventualmente causar algum efeito, mas nada disso parece acontecer. Recentemente, Lo e colaboradores [59] mostraram que, de fato, isso é improvável para o gene *npt-II*, no solo de cultivos de mamão transgênico.

A probabilidade de transferência de genes entre organismos superiores filogeneticamente não relacionados é extremamente remota e a transferência entre uma planta

e um animal ainda mais improvável. Para o gene *cp4-epsps*, o ganho de tolerância a herbicida não daria qualquer vantagem ou desvantagem ao animal, seja ele vertebrado ou invertebrado. O mesmo ocorre para o gene *npt-II*. A transferência de sequencias regulatórias poderia ter efeitos imprevisíveis, mas elas estão presentes numa enorme gama de alimentos (assim como o gene *epsps*).

O algodoeiro (*G. hirsutum*) não tem se mostrado com qualquer potencial invasor no Brasil, assim como nos demais países do mundo onde é regularmente cultivado em grandes extensões. Nas margens das rodovias onde são transportados caroços e outros produtos de algodão, podem aparecer eventualmente plantas que se estabelecem apenas nos locais onde há, natural ou artificialmente, acúmulo de umidade. Não se nota, contudo, qualquer avanço destas plantas para outras áreas. Adicionalmente, dentro do gênero *Gossypium* não há relatos de qualquer potencial como planta invasora, exceto no caso de *G. tomentosum*, que não existe no Brasil [25, 36].

Alguns autores sugerem que o fluxo gênico de plantas GM para genótipos silvestres pode resultar em redução de biodiversidade. No entanto, a redução de variabilidade genética é decorrente do fenômeno de introgressão gênica que é um processo bem mais complexo do que a simples hibridação [19, 23, 41, 80]. A introgressão de um transgene para plantas silvestres de algodão só poderia ocorrer se este conferisse uma forte vantagem seletiva, superior às desvantagens conferidas pelos alelos que estão geneticamente ligados ao transgene [38, 50, 80]. No entanto, a característica de tolerância a herbicida é reconhecida como não sendo capaz de dotar os genótipos receptores de qualquer vantagem adaptativa fora de áreas agrícolas [20, 80], uma vez que fora destas áreas, os potenciais genótipos silvestres receptores não sofrem ação da pressão seletiva do herbicida e, portanto, a eventual polinização destes genótipos não resultaria em introgressão gênica. Desta forma, é extremamente improvável a transferência da característica de tolerância a herbicidas para fora de áreas agrícolas [20, 80].

Uma das questões levantadas a respeito de plantas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas (TH) é a possibilidade do cruzamento destas com plantas daninhas e a conseqüente geração de plantas invasoras TH com maior adaptabilidade [28, 38]. No entanto, para que ocorra a formação destas chamadas “super plantas daninhas”, é necessário que ocorra a hibridação da planta geneticamente modificada com uma espécie invasora e pressão seletiva (aplicação de herbicida) na área física onde se encontra o híbrido [80]. Dados experimentais disponíveis levantados a partir de regiões com plantio em larga escala de plantas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas confirmam que o desenvolvimento de resistência a herbicidas em plantas daninhas não está relacionada à modificação genética,

mas ao gerenciamento das culturas e dos herbicidas utilizados pelos agricultores [73]. Ademais, inexistem no Brasil espécies sexualmente compatíveis com *G. hirsutum* que apresentem características de plantas invasoras. Assim, conclui-se que é extremamente improvável que o transgene *cp4 epsps* do evento MON 1445 seja transferido para plantas daninhas tornado-as mais invasivas. Os cuidados habituais com gerenciamento e manejo de culturas e herbicidas, como a rotação de culturas e rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, deve ser o foco para mitigar o surgimento de plantas daninhas tolerantes a herbicidas.

Avaliações do fenótipo e desempenho agronômico do Algodão Roundup Ready evento MON 1445, cultivar DP50RR, como também avaliações de eficácia e tolerância ao glifosato foram realizadas no Brasil. As avaliações foram realizadas em estudos de campo em locais típicos para o cultivo do algodão, simulando a produção comercial brasileira durante as safras de 1999/2000 e 2002/2003.

As avaliações do fenótipo e do desempenho agronômico do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 cultivar DP50RR durante a safra de 1999/2000 foram realizadas em três locais (Ituverava, SP; Rondonópolis, MT; e Capinópolis, MG). O experimento seguiu as práticas agronômicas convencionais, tipicamente utilizadas em avaliações de novos cultivares e avaliou os seguintes parâmetros: número de nós, altura, posição do primeiro ramo, bolas por metro linear, suscetibilidade a doenças (*Colletotrichum* sp., *Ramularia* sp., Doença Azul, Vermelhão e *Alternaria* sp.), capulhos por metro, e produtividade. Diferenças significativas não foram observadas tanto no que se refere aos aspectos fenotípicos ou morfológicos como ao desempenho agronômico entre as cultivares DP50 (convencional) e DP50RR (Algodão Roundup Ready evento MON 1445) para os parâmetros avaliados.

Durante a safra de 2002/2003 os parâmetros fenotípicos, morfológicos e agronômicos foram novamente avaliados e expandidos. Os experimentos foram realizados em dois locais (Santa Cruz das Palmeiras - SP e Santa Helena de Goiás - GO). Esses experimentos compararam o desenvolvimento do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 cultivar DP50RR, o algodão convencional DP50 e oito cultivares comerciais, quatro em cada local. As parcelas plantadas com o Algodão Roundup Ready evento MON 1445 cultivar DP50RR foram tratadas com 1,5 Kg/ha do herbicida Roundup (formulação MON14445) em aplicação foliar no estádio V4 e complementado com 1,0 Kg/ha com aplicação dirigida entre linhas da mesma formulação 20 dias após a primeira aplicação. Para os demais cultivares, todas as parcelas foram tratadas igualmente com fertilizantes e agroquímicos para controle de doenças e insetos, utilizando os mesmos produtos e doses e seguindo praticas agronômicas convencionais, tipicamente utilizadas em cada região. Comparações entre o algodão geneticamente

modificado e as variedades convencionais foram realizadas durante a safra para os seguintes parâmetros: vigor da planta, ciclo de florescimento, altura da planta, precocidade de maturação, ciclo até colheita, retenção da pluma pela cápsula após a deiscência, peso do capulho, peso médio de 1000 sementes, porcentagem de fibras, suscetibilidade a doenças e pragas (*Colletotrichum* sp., *Ramularia* sp., Doença Azul, Vermelhão e *Alternaria* sp.), produtividade e qualidade de fibra. Diferenças significativas não foram observadas entre a cultivar geneticamente modificada, com ou sem aplicação de glifosato, e seu parental recorrente convencional nos parâmetros fenotípicos, morfológicos e agronômicos avaliados.

Os genes *gox* e *epsps* estão sob o controle do promotor do P-FMV do vírus do mosaico da *Scrophularia* [(70)] e o gene *nptII* está sob o controle do promotor do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) [(67)]. Esses dois promotores são funcionais em vegetais superiores e, portanto, se esperaria a presença das proteínas C4 EPSPS, NPTII e GOX em plantas transformadas com essa construção. De fato, as proteínas C4 EPSPS e NPTII foram detectadas por ELISA em várias partes da planta (0,02% e 0,028% da proteína total das sementes; 7 a 170 ng de EPSPS por mg de tecido foliar fresco), em condições de campo cultivadas nos EUA, Espanha e Brasil.

A presença de plantas daninhas causa reduções na produtividade e depreciação do algodão produzido [(18)], podendo acarretar em perdas de 68 a 95% [(24)] sendo, portanto seu manejo fundamental. As principais plantas invasoras que ocorrem na cultura do algodoeiro no Brasil são: capim carrapicho (*Cenchrus equinatus*), capim marmelada (*Brachiaria plantaginea*), capim colchão (*Digitaria horizontalis*), grama-seda (*Cynodon dactilon*), picão preto *(Bidens pilosa*), carrapicho de carneiro (*Acanthospermum hispidum*) e corda-de-viola (*Ipomea* sp.). O manejo das plantas daninhas é realizado com métodos culturais, mecânicos e químicos, sendo o controle por meio da aplicação de herbicidas o principal método de controle. O controle químico é o mais empregado no país, principalmente em grandes áreas. São realizadas pulverizações de herbicidas antes da semeadura, na pré e pós-emergência.

O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas. Esse herbicida encontra-se devidamente registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para fins agrícolas e no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA do Ministério do Ministério do Meio Ambiente para fins não agrícolas e possui monografia aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA [(4)]. O glifosato atua como um potente inibidor da atividade da 5-

enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e influencia também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido indolacético. Algumas moléculas de outros herbicidas, registradas e usadas durante o cultivo de algodão, apresentam ação residual no solo, podendo ocasionar fitotoxicidade ao algodoeiro e a outros cultivos subseqüentes, além de impactos ao meio ambiente.

Ante o exposto, conclui-se que as avaliações das características fenotípicas e agronômicas do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 cultivar DP50RR realizadas no Brasil têm resultados semelhantes aos encontrados em outras regiões do mundo em plantio experimental e comercial. Com exceção da tolerância ao herbicida glifosato, resultante da expressão do gene *cp4 epsps*, o Algodão Roundup Ready evento MON 1445 demonstra características fenotípicas e agronômicas equivalentes ao padrão de linhagens parentais convencionais e de cultivares comerciais de algodão convencional.

VI. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

Pareceres técnicos referentes ao desempenho agronômico concluíram que há equivalência entre plantas transgênicas e convencionais. Assim, as informações indicam que as plantas transgênicas não diferem fundamentalmente dos genótipos de algodão não transformado, à exceção da tolerância ao glifosato. Adicionalmente, não há evidência de reações adversas ao uso do Algodão Roundup Ready evento MON 1445. Por essas razões, não existem restrições ao uso deste algodão ou de seus derivados seja para alimentação humana ou de animais.

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”.

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

A tecnologia Roundup Ready evento MON 1445 mostrou-se passível de ser utilizada sob todas as práticas agrícolas comumente utilizadas nas diversas regiões e condições, seja disponibilidade de insumos, mão-de-obra, dentre outros, utilizados na cultura do algodão. Adicionalmente, essa tecnologia poderá permitir maior sucesso no uso de plantio direto.

Estudos realizados concluíram que a utilização das variedades geneticamente modificadas para o uso seletivo de glifosato não restringe nenhum procedimento na cultura

algodoeira. Não existem variedades crioulas de algodoeiros e as cadeias de algodoeiros especiais, convencionais e transgênicos têm convivido de modo satisfatório, sem que tenham sido divulgados relatos de problemas de coexistência.

VIII. Conclusão

A longa experiência com métodos tradicionais de melhoramento de plantas, a experiência de mais de três décadas em pesquisa e mais de uma década em comercialização de variedades transgênicas no mundo, além do avanço no conhecimento sobre a estrutura e a dinâmica dos genomas, indicando se um determinado gene ou característica é seguro, sinalizam que o processo de engenharia genética por si só apresenta pouco potencial para o surgimento de consequencias inesperadas que não seriam identificadas ou eliminadas durante o processo de desenvolvimento de variedades comerciais GM [(14)].

Considerando que o Algodão Roundup Ready evento MON 1445 pertence a espécie bem caracterizada (*Gossypium hirsutum*) e com sólido histórico de segurança para uso humano e que o gene *cp4 epsps* introduzido nessa variedade não codifica proteína tóxica, sendo inócua para seres humanos.

Considerando que a construção gênica utilizada para inserir esse gene em algodão resultou na inserção estável de uma cópia funcional do gene *cp4 epsps*, a qual proporcionou tolerância das plantas ao glifosato.

Considerando ainda que:

1- O Algodão Roundup Ready, evento MON 1445, apresenta estabilidade genética em várias condições ambientais determinadas em várias gerações de linhagens obtidas por retrocruzamento com cultivares elite, inclusive uma variedade adaptada para cultivo no Brasil.

2- As proteínas CP4 EPSPS e NPTII foram expressas em vários tecidos e estádios de desenvolvimento do Algodão Roundup Ready, evento MON 1445, em níveis extremamente baixos.

3- As análises de segurança do Algodão Roundup Ready, evento MON 1445 e de seus produtos comprovou que a variedade geneticamente modificada é segura tanto para o meio ambiente quanto para a utilização como alimento ou componente de ração animal em relação ao risco apresentado pelo algodão convencional.

4- As novas proteínas expressas nas plantas CP4 EPSPS e NPTII foram seguras em todos os aspectos avaliados.

5- A proteína CP4 EPSPS é degradada rapidamente no sistema grastrointestinal de humanos e animais, por ser uma enzima lábil; além disso, o seu modo de ação, especificidade e a ausência de homologia com sequencias tóxicas, faz com que esta proteína não represente risco à saúde humana ou ao ambiente.

6- A proteína NPTII foi avaliada pelo FDA em 1994, sendo considerada segura para uso em alimentos. É degradada rapidamente no sistema grastrointestinal de humanos e animais e, devido ao seu modo de ação, à sua especificidade e à ausência de homologia com sequencias tóxicas, conclui-se que esta proteína não representa risco de toxicidade.

7- Nos estudos de avaliação do potencial de alergenicidade, comprovou-se que as proteínas CP4 EPSPS e NPTII não são detectáveis nos produtos de algodão utilizados como alimento humano e animal e não oferecem risco significativo como alergênicos e não são derivadas de formas alergênicas.

8- As avaliações das características fenotípicas e agronômicas do Algodão Roundup Ready, evento MON 1445, cultivar DP50RR, realizados no Brasil têm resultados semelhantes aos encontrados em outras regiões do mundo em plantio experimental e comercial.

9- Experimentos de campo e plantio comercial com várias gerações e derivados do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 realizados desde 1993 demonstram um fenótipo estável de tolerância ao herbicida glifosato que ocorre como uma característica monogênica de alta herdabilidade e sofre pouco efeito do ambiente em sua expressão.

10- Estudos com animais demonstram que a pasta de caroço de Algodão Roundup Ready evento MON 1445 é tão segura e nutritiva quanto a pasta de caroço de algodão convencional.

11- É pouco provável que animais silvestres venham a se alimentar de quantidades significativas de sementes de algodão ou de outras partes da planta.

12- A proteína EPSPS está presente em todas as plantas e também em bactérias, algas e fungos sendo, portanto, amplamente distribuída na natureza. Por isso, todos os seres vivos que se alimentam de plantas e microrganismos já são expostos às proteínas EPSPS.

13- Os antibióticos neomicina e canamicina não são empregados na agricultura para o controle de doenças de plantas originadas do solo. Por isso, não é provável que a presença da proteína NPT-II no solo impacte a população microbiana do solo.

14- É extremamente improvável a transferência da característica de tolerância a herbicidas para fora de áreas agrícolas.

15- É improvável que o transgene *cp4 epsps* do evento MON 1445 seja transferido para plantas daninhas tornado-as mais invasivas. Os cuidados habituais com gerenciamento e manejo de culturas e herbicidas, como a rotação de culturas e rotação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação, devem ser o foco para mitigar o surgimento de plantas daninhas tolerantes a herbicidas.

16- Os dados apresentados e aqueles existentes na literatura mostram que os impactos gerados pela liberação no campo em escala comercial do evento de algodoeiro MON1445 são similares àqueles apresentados por seus parentais e outras variedades não-GM atualmente cultivadas no País.

17- O evento MON 1445 já foi aprovado em vários países, tais como EUA, Canadá, Japão, Austrália, México, África do Sul, Argentina, China, União Européia, Filipinas, Colômbia e Coréia do Sul, tendo sido cultivado comercialmente em alguns destes, sem mostrar efeitos negativos para a saúde humana, animal ou de meio ambiente.

Diante do exposto, a liberação comercial do Algodão Roundup Ready evento MON 1445 não é potencialmente causadora de dano à saúde humana e animal, nem de significativa degradação do meio ambiente.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; por consultores *ad hoc*; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; resultados de liberações planejadas no meio ambiente; palestras, textos e discussões da audiência pública, realizada em 17/08/2007. Foram também considerados estudos e publicações científicas independentes, realizados por terceiros.

IX – Bibliografia citada

1. AGBIOS. 2008. AGBIOS Database product description. http:// www.agbios.com.
2. AKESON, W.R.; STAHMANN, M.A. 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutrition. 83:257-261.
3. ALIBHAI, M.; STALLINGS, W.C. 2001. Closing down on glyphosate inhibition with a new structure for drug discovery. Proc Natl Acad Sci USA 98:2944-2946.
4. ANVISA. 2008. http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/g01.pdf.
5. ARMITAGE, P.; WALDEN, R.; DRAPER, J. 1988. Plant genetic transformation and gene expression - A laboratory manual. DRAPER, J.; SCOTT, R.; ARMITAGE, P. E WALDEN, R. (eds.) Oxford: Blackwell Scientific, p. 1-67.

6. ASTWOOD, J.D.; FUCHS, R.L. 1996. Allergenicity of foods derived from transgenic plants. In: WUTHRICH, B.; ORTOLANI, C. (Eds.) Highlights in Food Allergy. Monographs in Allergy, vol. 32. Karger, Basel, p. 105–120.

7. ASTWOOD, J.D.; LEACH, J.N.; FUCHS, R.L. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nat. Biotechnol. 14, 1269 – 1273.

8. AUMAITRE, A. 2004. Safety assessment and feeding value for pigs, poultry and ruminant animals of pest protected (Bt) plants and herbicide tolerant (glyphosate, glufosinate) plants: interpretation of experimental results observed worldwide on GM plants. Ital. J. Anim. Sci. 3:107-121.

9. BAKKEREN, G.; KOUKOLLKOVA-NICOLA, Z.; GRIMSLEY, N.; HOHN, B. 1989. Recovery of *Agrobaterium tumefaciens* T-DNA molecules from whole plants early after transfer. Cell *Agrobacterium*. 57:847-857.

10. BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C.; AMARAL, J. A. B. do; SILVA, M. T. 2005. Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies de *Gossypium* nativas ou naturalizadas. Campina Grande: Embrapa Algodão, 7 p. (Comunicado Técnico, 242).

11. BARRY, G.; KISHORE, G.; PADGETTE, S.; TAYLOR, M.; KOLACZ, K.; WELDON, M.; RE, D.; EICHHOLTZ, D.; FINCHER, K.; HALLAS, L. 1992. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants. SINGH, B. K.; FLORES, H. E.; SHANNON, J. C. (eds). American Society of Plant Physiologists, p. 139-145.

12. BECK, E.; LUDWIG, G.; AUERSWALD, E.; REISS, B.; SCHALLER, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19:327-336.

13. BELTRÃO, N. E. de M. 1999. Algodão brasileiro em relação ao mundo: situação e perspectiva, In: BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). O agronegócio do algodão no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, v. 1, p.17-27.

14. BRADFORD, K. J.; DEYNZE, A.V.; GUTTERSON, N.; PARROTT, W.; STRAUSS, S.H. 2005. Regulating transgenic crops sensibly: lessons from plant breeding, biotechnology and genomics. Nat. Biotechnol. 23: 439-444.

15. BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. 1999. Transformação genética de plantas. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas - Vol. 2. Eds.: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Brasília: Embrapa-SP/ Embrapa- CNPH, 1999. 354p.

16. BRUBAKER, C.; BOURLAND, E.M.; WENDEL, J.E. 1999. The origin and domestication of cotton. In: SMITH, C.W.; COTHREN, J.T. Cotton: origin, history, and production. New York: John Wiley & Sons, p. 3-31.

17. CHAPIN, F.S.; ZAVALETA, E.S.; EVINER, V.T.; NAYLOR, R.; VITOUSEK, P.M.; REYNOLDS, H.L.; HOOPER, D.U.; LAVOREL, S.; SALA, O.E.; HOBBIE, S.E.; MACK, M.C.; DIAZ, S. 2000. Consequences of changing biodiversity. Nature 405: 234–242.

18. CHRISTOFFOLETI, P. J.; MOREIRA, M. S.; BALLAMINUT, C. E.; NICOLAI, M. 2007. Manejo de plantas daninhas na cultura do algodão. In: FREIRE, E. C. (Ed.). Algodão no cerrado do Brasil. Brasília, DF: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, p. 523-550;

19. CONNER, A.J.; GLARE, T. E.; NAP, J-P. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Plant J. 33: 19-46.

20. DALE, P.J.; CLARKE, B.; FONTES, E. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops Nat. Biotech. 20: 567-574.

21. DE LA RIVA, G.A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; VÁZQUEZ-PADÓN, R.; AYRA-PARDO, C. 1998. *Agrobacterium* tumefaciens: a natural tool for plant transformation. Electr. J. Biotechnol. 1: Issue of December 15, 1998.

22. DEBLOCK, M.; HERRERA-ESTRELLA, L.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J; ZAMBRYSKI, P. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. EMBO J. 3: 1681-1689.

23. DEN NIJS, H.C.M.; BARTSCH, D.; SWEET, J.B. 2004. Introgression from genetically modified plants into wild relatives, CABI Publishing, Wallingford UK. 403p.

24. DEUBER, R. Manejo integrado de plantas infestantes na cultura do algodoeiro. In: Cultura do algodoeiro. CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. dos (Ed.). Piracicaba: POTAFOS, 1999. p. 101-119.

25. DILL, G.M.; CAJACOB, C.A.; PADGETTE, S.R. 2008. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. Pest Manag Sci. 64: 326-31.

26. DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINSKI, D. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:7347-7351.

27. DUKE, J.A. 1983. Handbook of energy crops. Disponível em: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Glycine_max.htm.

28. ELLSTRAND, N. C. 2001. When transgenes wander, should we worry? Plant Physiol. 125: 1543–1545.

29. FLING, M.; KOPF, J.; RICHARDS, C. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding aminoglycoside-modifying enzyme, 3”(9)-Onucleotidylyltransferase. Nucl. Ac. Res. 13:7095-7106.

30. FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. 1997. Glyphosate: A unique global herbicide. American Chemical Society (ACS), Washington, DC. ACS Monograph No. 189.

31. FREIRE, E.C. 2000. Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. Embrapa: Campina Grande, 22pp.

32. FRYXELL, P.A. 1979. The natural history of the cotton Tribe Malvaceae (Tribe Gossypieae). Texas A&M University Press, College Station;

33. FRYXELL, P.A., CRAVEN, L.A.; STEWART, J. MCD. 1992. A revision of *Gossypium* Sect. Grandicalyx (Malvaceae) including the description of six new species. Systemat. Bot. 17: 91-114.

34. FUCHS, R.L.; REAM, J.E.; HAMMOND, B.G.; NAYLOR, N.W.; LEIMGRUBER, R.M.; BERBERICH, S.A. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. BioTechnol. 11:1543-1547.

35. FUZATTO, M.G. 1999. Melhoramento genético do algodão. In: Cultura do Algodoeiro. FREIRE, E.C.; SANTOS, W.J. (eds.) Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 15-34.

36. GIANESSI L.P. 2008. Economic impacts of glyphosate-resistant crops. Pest Manag. Sci. 64:346-352.

37. GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. of Environ. Contam. Toxicol. 167:35-120.

38. GRESSEL, J. 1999. Tandem constructs: preventing the rise of superweeds. Trends Biotech. 17: 361–366.

39. GRUYS, K.J.; SIKORSKI, J.A. 1999. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology. (Ed. Singh, B.). New York: Marcel Dekker Inc., p. 357-384.

40. HAILS, R.S. 2002. Assessing the risks associated with new agricultural practices. Nature, 418: 685–688.

41. HAILS, R.S.; MORLEY, K. 2005. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. Trends in Ecol. Evol. 20: 245–252.

42. HALLAS, L. E.; HAHN, E. M.; KOMDORFER, C. 1988. Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. J. Indust. Microbiol. 3: 377-385.

43. HARRISON, L.A.; BAILEY, M.R.; NAYLOR, M.W.; REAM, J.E.; HAMMOND, B.G.; NIDA, D.L.; BURNETTE, B.L.; NICKSON, T.E.; MITSKY, T.A.; TAYLOR, M.L.; FUCHS, R.L.; PADGETTE, S.R. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. J. Nutrit. 126:728-740.

44. HINCHEE, M.A.W.; PADGETTE, S.R.; KISHORE, G.M.; DELANNAY, X.; FRALEY, R.T. 1993. Herbicide tolerant crops. In: Transgenic Plants Vol. 1. S-KUNG; RAY, W. (eds.) Orlando: Academic Press, Inc., p. 243-263.

45. HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.; SCHILPEROORT, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303:179-180.

46. HOOYKAAS, P.J.J., SCHILPEROORT, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molec. Biol. 19: 15-38.

47. HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, R.R.; LLOYD, A.; HOFFMAN, N. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. Science 223:496-498.

48. HUTTNER, S.L.; ARNTZEN, C.; BEACHY, R.; BREUNING, G.; NESTER, E.; QUALSET, C.; VIDAVER, A. 1992. Revising oversight of genetically modified plants. BioTechnol. 10:967-971.

49. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2008. http://www.ibge.gov.br.

50. JIANG, C. X.; CHEE, P. W.; DRAYE, X.; MORRELL, P. L.; SMITH, C. W.; PATERSON, A.H. 2000. Multilocus interactions restrict gene introgression in interspecific populations of polyploid *Gossypium* (cotton). Evolution 54: 798–814.

51. JOHNSTON, J.A.; MALLORY-SMITH, C.; BRUBAKER, C.L.; GANDARA, F.; ARAGÃO, F.J.L.; BARROSO, P.A.V.; QUANG, V. D.; CARVALHO, L.P. DE; KAGEYAMA, P.; CIAMPI, A.Y.; FUZATTO, M.; CIRINO, V.; FREIRE, E. 2006. Assessing gene flow from Bt cotton in Brazil and its possible consequences. 2006. *In* : HILBECK,A.; ANDOW, D.; FONTES, E.M.G. Environmental risk assessment of genetically modified organism: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. p. 261-299.

52. KLEE, H.J.; WHITE, F.F.; LYER, V.N.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. 1983. Mutational analysis of the virulence region of an *Agrobacterium* tumefaciens Ti plasmid. J. Bacteriol. 153:878-883.

53. KLEE, H.J.; ROGERS, S.G. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: plant transformation systems based on the use of *Agrobacterium* tumefaciens. Cell Cult. Somat. Cell Genet. Plants 6:1-23.

54. KREBBERS, I.; HERDIES, L.; DE CLERCQ, A.; SEURINCK, J.; LEEMANS, J.; VAN DAMME, J.; SEQURA, M.; GHEYSEN, G.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCKHOVE, J. 1988. Determination of the processing sites of an Arabidopsis 2S albumin and characterization of the complete gene family. Plant Physiol. 87:859-866.

55. LACORTE, C.; MANSUR, E. 1993. Transferência de gene por meio da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógenohospedeiro. ABCTP Notícias 21:2-7.

56. LACORTE, C.; ROMANO, E. 1998. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, p. 93-109.

57. LEE, J.A. 1984. Cotton as a world crop. In: Cotton. KOHEL, R.J.; LEWIS, C.F. (eds.). Madison: American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Chapter 1, p. 1-80.

58. LIMA, P.J.B.F. 2007. Algodões Transgênicos: grave ameaça ao algodão agroecológico e orgânico da Agricultura Familiar no Semi-árido nordestino. ESPLAR: documento apresentado em audiência pública da CTNBio sobre algodoeiros geneticamente modificados.

59. LO, C.C.; CHEN, S.C.; YANG, J.Z. 2007 Use of real-time polymerase chain reaction (PCR) and transformation assay to monitor the persistence and bioavailability of transgenic genes released from genetically modified papaya expressing nptII and PRSV genes in the soil. J. Agric. Food Chem. 55:7534-7540.

60. MARQUEZ, U.M.L.; LAJOLO, F.M. 1981. Composition and digestibility of albumins, globulins, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. J. Agric. Food Chem. 29: 1068-1074.

61. MCGREGOR, S.E. 1976. Insect pollination of cultivated plants. Agriculture Handbook No. 496. USDA, Washington, DC., p. 171-190.

62. METZER, R.B. 1996. The cotton plant. In: Identification, biology and sampling of cotton insects. In: BOHMFALK, G.T.; FRISBIE, R.E.; STERLING, W.L.; METZER, R.B.; KNUTSON, A.E. Texas A&M University System / Texas Agricultural Extension Service. http://insects.tamu.edu/extension/bulletins/b-933.html.

63. MOREIRA, J.A.N.; SANTOS, R.F. 1994. Origem, crescimento e progresso da cotonicultura do Brasil. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA / Brasília: EMBRAPA-SPI, 169p;

64. NAP, J.; METZ, P. L. J.; ESCALER, M.; CONNER, A. J. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part I. Overview of current status and regulations. Plant J. 33: 1-18.

65. NIELSEN, K.M.; VAN ELSAS, J.D.; SMALLA, K. 2000. Safety issues in antibiotic resistance marker genes in transgenic crops. Proc. of the 6th Internat. Feed Prod. Conf. p. 146-162.

66. NILES, G.A.; FEASTER, C.V. 1984. Cotton Agronomy. In: KOHEL, R.J.; LEWIS, C.F. (eds.), Wisconsin: Soil Science Society Of America Inc, No. 24, p. 205.

67. ODELL, J.T.; NAGY, F.; CHUA, N-H. 1985. Identification of DNA sequences required for the activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812.

68. PADGETTE, S.R.; RE, D.B.; BARRY, D.E. 1995. New weed control opportunities: development of glyphosate tolerant soybean. In: Herbicide resistant crops. DUKE, S.O. (ed.) Boca Ratoon: CRC Press.

69. PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. 1996. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci. 35: 1451-1461.

70. RICHINS, R.D.; SCHOLTHOF, H.B.; SHEPHERD, R.J. 1987. Sequence of figwortmosaic virus DNA (Caulimorvirus Group). Nuc. Acids Res. 15:8451-8466.

71. ROBINSON, R.A.; SUTHERLAND, W.J. 2002. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. J. Appl. Ecol. 39: 157–176.

72. RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B.B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J.T. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. Agric. Food. Chem. 25: 517- 528.

73. SANVIDO O.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. 2007. Ecological impacts of genetically modified crops: ten years of field research and commercial cultivation. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 107:235-78.

74. SCHULZ, A.; KRUPER, A.; AMRHEIN, N. 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. FEMS Microbiol. Lett. 28: 297-301.

75. SERDY, F.S.; NIDA, D.L. 1995. Petition for determination for non-regulated status, cotton with the Roundup Ready gene, lines MON 1445 and 1698. Petition submitted to USDA/APHIS/BBEP on February 10, 1995.

76. SIMPSON, D.M. 1954. Natural cross-pollinization in cotton. USDA Tech. Bul. 1094, 17 pp.

77. SMITH, E.F.; TOWNSEND, C.O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. Science, 25: 671-673.

78. STACHEL, S. E.; NESTER, E. W. 1986. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium* tumefaciens. EMBO J. 5: 1445-1454.

79. STEPHENS, S.G. 1967. Evolution under domestication of the new world cottons (*Gossypium* spp.). Ciênc. Cult. 19: 118-134.

80. STEWART, N. C.; HALFHILL, M. D.; WARWICK, S. I. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. Nat. Rev. Genet. 4: 806-817.

81. TILCH, C.; ELIAS, P.S. 1984. Investigation of the mutagenicity of ethylphenylglycidate. Mutat. Res. 138:1-8.

82. TILMAN, D.; CASSMAN, K.G.; MATSON, P.A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nat. 418: 671–677.

83. TINLAND, B. 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. Trends Plant Sci. 1: 178-184.

84. TORSTENSSON, L. 1985. Behavior of glyphosate in soils and its degradation. In: The Herbicide Glyphosate. GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (eds.). London: Butterworth, p. 137–150.

85. TROLINDER, N.L.; GOODIN, J.R. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep.6: 231- 234.

86. TSYGANOV, S.K. 1953. Remarks on the pollinating activity of honey bees. Uzbekistan Akad. Nauk Inst. Zool. I. Parasitol. Trudy 1:91-122.

87. US FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. 1994. Secondary food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals; aminoglycoside 3'phosphotransferase II; Food and Drug Administration, Final Rule Federal Register 59: 26700-26711.

88. ZIKAKIS, J.P.; RZUCIDLO, S.J.; BIASOTTO, N.O. 1977. Persistance of bovine milk xanthine oxidase activity after gastric digestion in vivo and in vitro. J. Dairy Sci. 60: 533-541.

89. ZUPAN, J.R.; ZAMBRYSKI, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiol. 107:1041-1047.

X. Bibliografia consultada:

Também foram consultados:

1. BRUBAKER, C. L.; BOURLAND F. M.; WENDEL J. F. 1999. The origin and domestication of cotton. In: Cotton: origin, history, technology and production. SMITH, C. W.; COTHEN, J. T. New York: John Wiley , p.3-32.

2. CALHOUN, D.S.; BOWMAN, D.T. 1999. Techniques for development of new cultivars. In: SMITH, C.W.; COTHREN, J.T. Cotton: origin, history, technology and production, p. 361-414. New York: John Wiley e Sons, p. 361-414.

3. DEMANÈCHE, S.; SANGUIN, H.; POTÉ, J.; NAVARRO, E.; BERNILLON, D.; MAVINGUI, P.; WILDI, W.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. Proc Natl Acad Sci USA. 105: 3957-3962.

4. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO. 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods Derived from Biotechnology. Geneva: WHO, 29pp.

5. ICOZ, I.; SAXENA, D.; ANDOW, D.A.; ZWAHLEN, C.; STOTZKY, G. 2008. Microbial populations and enzyme activities in soil in situ under transgenic corn expressing cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. J. Environ. Qual. 37: 647-62.

6. KONCZ, C.; SCHELL, J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. 204:383-396.

7. LEVIN, J.G.; SPRINSON, D.B. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate 5-phosphate. J. Biol. Chem. 239: 1142-1150.

8. LLEWELLYN, D.; FITT, G. 1996. Pollen dispersal from two field trails of transgenic cotton in Namoi Valley, Australia. Mol. Breed. 2: 157-166.

9. MUNRO, J.M. 1987. Cotton. 2nd New York: Ed. John Wiley & Sons.

10. NAP, J.P.; BIJVOET, J.; STIKEMA, W.J. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants: an overview. Transg. Res. 1: 239-249.

11. NIDA, D.L.; KOLACZ, K.H.; BUEHLER, R.E.; DEATON, W.R.; SCHULER, W.R.; ARMSTRONG, T.A.; TAYLOR, M.L.; EBERT, C.C.; ROGAN, G.J.; PADGETTE, S.R.; FUCHS, R.L. 1996. Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. J. Agric. Food Chem. 44:1960-1966.

12. OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 10. OECD ENV/JM/MONO(99)9.

13. PADGETTE, S.R.; DELLA-CIOPPA, G.; SHAH, D.M.; FRALEY, R.F.; KISHORE, G.M. 1989. Selective herbicide tolerance through protein engineering. Cell Culture and Somatic Cell. Genet. Plants 6: 441-476.

14. SABHARWAL, N.; ICOZ, I.; SAXENA, D.; STOTZKY, G. 2007. Release of the recombinant proteins, human serum albumin, beta-glucuronidase, glycoprotein B from human cytomegalovirus, and green fluorescent protein, in root exudates from transgenic tobacco and their effects on microbes and enzymatic activities in soil. Plant Physiol Biochem. 45: 464-469.

15. SANCHES JR, J.L.B.; MALERBO-SOUZA, D.T. 2004. Frequencia dos insetos e produção de algodão. Acta Scient. Agron. 26: 461-465.

16. SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. 1999. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. Nature 1999, 402: 480.

17. SHAN, G.; EMBREY, S.K.; HERMAN, R.A.; MCCORMICK, R. 2008. Cry1F protein not detected in soil after three years of transgenic Bt corn (1507 corn) use. Environ. Entomol. 37: 255-262.

18. UMBECK, P.F.; BARTON, K.A.; NORDHEIM, E.V.; MCCARTY, J.C.; PARROTT, W.L.; JENKINS, J.N. 1991. Degrre of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. J. Econ. Entomol. 84: 1943-1950.

19. WENDEL, J.F.; ROWLEY, R.; STEWART, J.M. 1994. Genetic diversity in and phylogenetic-relationships of the Brazilian endemic cotton, *Gossypium mustelinum* (Malvaceae). Plant Syst Evol 192: 49–59.

Walter Colli
Presidente da CTNBio

Votos divergentes:

O membro da CTNBio, Dr. José Maria Gusman Ferraz (Subcomissão Setorial Permanente Ambiental) votou contra a liberação comercial do Algodão Roundup Ready Evento 1145. Os membros da CTNBio, Drs. Graziela Almeida da Silva (Subcomissão Setorial Permanente de Saúde Humana), Kenny Bonfim (Subcomissão Setorial Permanente de Saúde Humana) e Leonardo Melgarejo (Subcomissão Setorial Permanente Ambiental), abstiveram-se de votar pela liberação comercial do Algodão Roundup Ready, Evento 1145.

O relator Dr. Paulo Yoshio Kageyama (Subcomissão Setorial Permanente Ambiental) emitiu parecer contrário à aprovação deste produto por entender que:

1. A entidade não demonstrou claramente que os herbicidas a base de glifosato têm propriedade favorável ao meio ambiente, não se movimentam para o lençol freático, têm baixa ecotoxicidade e ausência de efeitos residuais no solo.

2. Seria necessário um estudo de impacto ambiental, segundo as normas legais brasileiras para a entidade concluir que “a utilização do sistema Algodão Roundup Ready, Evento 1145, é segura e proporciona benefícios para o agricultor e não há evidência de que seja potencialmente poluidora ou causadora de significativa degradação ambiental”.

3. A ausência de estudos no relatório de pedido de liberação comercial não permite avaliar a toxicidade direta do glifosato que penetra nos tecidos vegetais, sobre os organismos não-mamíferos que dele se alimentam, quando este produto passa a ser utilizado sequencialmente durante várias vezes no ano.

4. Devem ser exigidos novos estudos de impacto ambiental usando algumas espécies-chave, espécies indicadoras, de diferentes ordens da classificação animal e vegetal para possibilitar *a posteriori* uma vigilância qualitativa e quantitativa dos efeitos adversos, ao longo do tempo.

5. No processo não foi considerada a presença de plantas daninhas resistentes ao herbicida glifosato.

6. A distância de visitação a flores de algodão por espécies de abelhas *Bombus* sp. foi de 1.750 metros do ninho. Portanto, a entidade tem que considerar a longa distância de vôo das mamangavas polinizadoras.

7. A entidade deve considerar os resultados dos estudos de Sanches Jr e Malerbo-Souza, valorizando a polinização por estes insetos.

8. Em relação aos efeitos do Algodão RR sobre organismos não-alvo, a entidade afirmou que “as avaliações de risco ecotoxicológico do ROUNDUP consideram efeitos diretos do herbicida e do surfactante sobre os organismos não-alvo e meio ambiental". Posteriormente em versão atualizada, apresentou os dados onde se baseiam em estudos não realizados no Brasil e também não consideraram a biota do solo.

9. Os estudos citados não respondem de maneira adequada o questionamento sobre o deslocamento do pólen e também não responde à pergunta "quais fatores que podem afetar a probabilidade do fluxo gênico intra e inter-específico em diferentes regiões e biomas brasileiros?".

10. O risco de dispersão do transgene com a flora e a fauna selvagem não deve ser descartado, posto que o gene de tolerância aos herbicidas pode conferir uma vantagem seletiva a organismo hospedeiro nos agrossistemas manejados pela tecnologia TH.

11. A ausência de estudos no relatório de pedido de liberação comercial não permite avaliar a toxicidade direta do glifosato que penetra nos tecidos vegetais, sobre os organismos não-mamíferos que dele se alimentam.

12. O algodão geneticamente modificado apresenta diferença em relação ao não-geneticamente modificado.

13. Não foram apresentados, no processo, resultados experimentais comprovando que o algodão geneticamente modificado tem maior rendimento que o convencional como sugerido na parte inicial.

14. É imprescindível que a requerente faça experimentos em cultivos sucessivos para avaliar a evolução de consumo do agrotóxico que é parte da tecnologia Algodão RR, Evento MON 1445, pois a experiência com soja RR só foi conhecida depois da liberação comercial.

15. A liberação de plantas transgênicas resistentes a herbicidas aceleram o aparecimento de plantas resistentes a estes agrotóxicos.