

PARECER TÉCNICO Nº 2281/2010

Processo nº 01200.003590/2009-85

Requerente: Amyris Brasil S.A.

CNPJ: 09.379.224/0001-20

Endereço: Amyris Brasil S.A. Techno Park – Rodovia Anhanguera Km 104,5. Rua Rui James Clerk Maxwell nº 315 – CEP 13069-380 - Campinas – SP. Fone: (19) 37839457. Fax: (19) 37839450.

Assunto: Solicitação de Parecer para liberação comercial de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) geneticamente modificada para produção de farneseno cepa Y1979.

Extrato Prévio: 2014/2009, Publicado no D.O.U No. 191, 06 de outubro de 2009.

Decisão: DEFERIDO

Resumo: A CTNBio, após apreciação da solicitação de Parecer Técnico sobre a biossegurança de organismo geneticamente modificado da classe I de risco biológico para comercialização, produção industrial do composto químico farneseno e quaisquer outras atividades relacionadas a esse organismo geneticamente modificado e progênes dele derivados, conclui pelo DEFERIMENTO nos termos deste parecer técnico. A presidente da Comissão Interna de Biossegurança da empresa Amyris Brasil S.A., Dra. Luciana Di Ciero, solicita à CTNBio parecer técnico para liberação comercial de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) geneticamente modificada para produção de farneseno cepa Y1979. O organismo a ser liberado comercialmente são leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* transformadas com o gene da farneseno sintase da planta medicinal, não patogênica, a *Artemisia annua* L. para as finalidades de comercialização, produção industrial do composto químico farneseno e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e progênes dele derivados. A CTNBio considerou sigilosas as informações indicadas como tal pela proponente. No âmbito das competências conferidas pela Lei 11.105/05 e regulamentadas pelo Decreto 5.591/2005, a Comissão considerou que as informações prestadas pelo proponente atestam a biossegurança do produto e atendem às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Descrição inicial e considerações gerais:

A proposta se refere a liberação comercial de uma levedura de panificação que foi geneticamente modificada para a geração de farneseno, um produto natural ubíquo, produzido por inúmeras plantas mas não sintetizado naturalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A construção genética envolve vários genes naturais da levedura, com promotores modificados para que a via metabólica do mevalonato se torne altamente produtiva e apenas um gene de outro organismo, que codifica para a farneseno sintase, obtido da planta medicinal, não patogênica *Artemisia annua* L. Com esta adição a via, o farnesil pirofosfato (FPP) da levedura é convertido no farneseno, substrato para a

produção de um biodiesel sustentável já que esta levedura o produz fermentando o melão da cana-de-açúcar.

Por força da legislação brasileira, esta solicitação está sendo avaliada pelo setor responsável pela segurança relativa à saúde humana e animal embora esta levedura e o produto de sua utilização não se destinem ao consumo alimentar humano ou animal. O produto gerado é um substituto “verde” e renovável de um combustível fóssil de esgotamento previsível e não renovável na escala de tempo de interesse humano.

A empresa encaminhou documentação detalhada em 501(quinhetas e uma) páginas compreendendo o texto, 56(cinquenta e seis) figuras, 30(trinta) tabelas, índice, abreviaturas, sequências do DNA inserido, extenso detalhamento de 13(treze) métodos utilizados na geração do OGM e na investigação de possíveis efeitos adversos sobre organismos do meio ambiente, plano de monitoramento e 136(cento e trinta e seis) referências bibliográficas. Este parecer foi consolidado a partir da avaliação dos membros da CTNBio Francisco G. Nóbrega (9 refs.) e José Luiz de Lima Filho (36 refs.) e do parecer do especialista *ad hoc* Mario Henrique de Barros (8 refs.) sendo que todos recomendaram a aprovação da solicitação da Amyris.

Esta construção genética tem origem em um projeto de alta responsabilidade social, que acabou dando origem à empresa, apoiado pela Fundação Bill e Melinda Gates e que buscava a produção de artemisinina para tratamento da malária resistente, tratamento este limitado pelo custo e dificuldades de obter a quantidade necessária da planta que produz o princípio ativo (*Artemisia sp.*). O projeto teve sucesso e a produção será cerca de 90% mais barata que a extração convencional. O processo, sem finalidade lucrativa foi transferida para a Sanofi-Aventis com participação do Institute for OneWorld Health, para produção da artemisinina. No entanto a concepção da via produtora do sesquiterpeno, tem muitas outras aplicações comerciais, com enorme potencial para gerar outras moléculas de grande valor como produtos químicos complexos, medicamentos, combustíveis e lubrificantes, gerando produtos na área denominada biologia sintética. A empresa portanto está dedicada ao desenvolvimento de produtos que substituem material derivado de hidrocarbonetos não renováveis com redução do “carbon footprint”, gerando produtos químicos por meio da modificação do metabolismo de microrganismos.

Informações sobre o organismo geneticamente modificado:

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo utilizado pelo homem para processar alimentos e gerar comestíveis representando a biotecnologia mais antiga. Em sítio de uma aldeia neolítica chinesa, jarros com uma bebida fermentada de arroz, mel e frutas com 9.000 anos de idade foram encontrados (McGovern et al., 2004). Este organismo é um representante clássico da categoria GRAS (“generally recognized as safe”) sem restrição para o consumo humano, segundo o FDA, presente na produção de bebidas e pão. A confiança em sua segurança levou também o NIH a liberar experimentos com a levedura da maior parte de suas restrições, e a EPA a isentar a *S. cerevisiae* da maior parte das cláusulas previstas no Toxic Substance Control Act (legislação americana que regula a introdução de novos produtos químicos no mercado).

Tem sido também muito usada na alimentação animal, como fonte de proteína e outros nutrientes. Na alimentação humana, a levedura tem sido utilizada na forma de derivados, como aromatizante, para realçar sabor e como complemento nutritivo, possuindo proteína de alta qualidade, rica em lisina, vitaminas do complexo B e minerais importantes como selênio e zinco além de fonte de fibras, representadas por mananas e glicanas da parede celular. Mesmo leveduras modificadas por engenharia genética já foram aprovadas para o consumo humano na produção de vinho nos EUA e Canadá e no Reino Unido para a produção de cerveja e pão (Aldhous, 1990; Dequin, 2001) considerações que atendem ao item 1 da RN-5, anexo III. Como consequência de suas facilidades de cultivo e manipulação genética, tanto para genes nucleares como mitocondriais, a levedura *S. cerevisiae* tornou-se o organismo cientificamente mais bem estudado e caracterizado dentre todos os eucariotos, tendo sido o primeiro deles a ter seu genoma totalmente sequenciado (Goffeau, 1996) e sendo considerado um eucarioto unicelular modelo para pesquisas. Há mais de dez anos temos disponível uma coleção de cepas de *S. cerevisiae*, cada uma delas contendo uma mutação específica em um de seus 6.000 genes, permitindo estudos de função gênica de grande interesse (Brachmann, 1998).

Sua patogenicidade era considerada nula até que casos muito raros de presença de *S. cerevisiae* foram descritos em isolados clínicos de indivíduos com extrema deficiência imunológica. Também há raros relatos de alergia principalmente em trabalhadores em panificação. Além seu papel na produção de alimentos esta levedura está sempre à nossa volta, presente em cascas de frutas e superfície de grãos. Sua segurança e importância industrial é patente já que é responsável pelos 5 principais produtos industriais derivados de fermentação: cerveja, vinho, proteína celular, levedura de panificação e ácido cítrico. Seu efeito como probiótico na alimentação humana e animal foi comprovado em vários estudos (Gaioto, 2005 e Caballero-Cordoba e Sgarbieri, 2000). As demandas da RN-5, anexo III referentes aos itens 2 e 3 não se aplicam já que esta levedura ou o biodiesel resultante da fermentação industrial não se destinam ao consumo humano ou animal. A cepa Y1979 é derivada da linhagem PE-2, oriunda da Usina da Pedra, isolada e identificada em 1994. É utilizada na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil em cerca de 30% das usinas do país sendo responsável, portanto, por 10% do etanol produzido no mundo. A importância econômica desta linhagem estimulou sua caracterização genética completa sendo seu genoma recentemente sequenciado (Argueso *et al.*, 2009).

Resumo das manipulações moleculares envolvidas:

A cepa Y1979 é um diplóide, estado que bloqueia o cruzamento que se dá naturalmente entre as formas haplóides α e **a**. Adicionalmente foram inativados nesta cepa os genes STE5 e IME1 que impedem a produção de ascósporos haplóides, reduzindo a níveis insignificantes o potencial desta levedura de se combinar geneticamente com outras existentes na natureza e mesmo entre linhagens de laboratório. Estas modificações, juntamente com as alterações da via do mevalonato, tornam esta cepa um organismo de laboratório, altamente dependente de condições específicas para sua

proliferação e manutenção, de maneira análoga às plantas domesticadas pela humanidade ao longo de milhares de anos e garantindo a extrema dificuldade deste organismo em colonizar o meio ambiente, invadindo ou competindo com a microbiota natural.

Os cientistas da empresa desenvolveram uma plataforma eficiente para a construção modular de cassetes de integração, constituída por uma biblioteca de plasmídeos contendo elementos genéticos flanqueados por segmentos ligantes que são propagados em *E. coli*. Os elementos genéticos são promotores, terminadores, genes de interesse, loci alvo, marcadores de seleção, etc. Cada elemento genético ou “bit” é flanqueado por um dos diversos grupos de ligantes genéricos. “Bits” com sequências ligantes comuns podem ser conectados através da técnica de PCR “overlap”. Os ligantes encerram sítios de reconhecimento para enzimas de restrição do tipo II, que cortam o DNA adiante do sítio de reconhecimento gerando pontas coesivas específicas. Assim ficam simplificadas as construções genéticas para inserção na levedura.

A construção se iniciou com a cepa Y1198 (PE-2) e terminaram com a cepa Y1979 em nove etapas sequenciais. Por exemplo a etapa 3 da construção foi preparada por meio da união de 8 “bits” que foram ligados na ordem:

LEU2US-NatA-ERG12-tPGAL1,10-ERG8-PGAL4oc-GAL4-LEU2DS

A **etapa 1** foi a esporulação da PE-2 e isolamento de uma célula haplóide α para as construções subseqüentes.

Na **etapa 2** foi feita a integração de ERG10, ERG13, HMGR que foi integrada por recombinação homóloga (segmento de 11.077 bp) no locus GAL80 na cepa Y1664. As células transformadas foram selecionadas em meio higromicina B. Resultou a cepa intermediária Y1515. Os elementos genéticos são detalhados em tabela indicando o nucleotídeo de início e fim do elemento e a sequência nucleotídica completa é apresentada para cada etapa da construção. Para as transformações se utilizou o método químico (acetato de lítio) que torna as células de levedura competentes para receber DNA exógeno.

Na **etapa 3** foi integrada uma cassette contendo ERG8, ERG12, os transformantes selecionados em meio contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de nourseotocina. A integração é sempre verificada por ampliações usando PCR com os iniciadores diagnósticos apropriados antes de prosseguir na construção. Como exemplificado anteriormente, este cassette dirigiu a integração para o locus LEU2 e a linhagem resultante tornou-se dependente de leucina para crescer.

A **etapa 4a** consistiu em introduzir o gene AaFS (GenBankAAX39387.1) derivado da planta *Artemisia annua L.* em plasmídeo replicativo de alto número de cópias do tipo 2 μ para garantir boa expressão do produto deste gene, a β -farneseno sintase. O gene integrado no plasmídeo de expressão foi sintetizado com modificações apropriadas para adequar o uso de seus códons aos tRNAs isoceptores mais abundantes da levedura. O plasmídeo pAM404 porta o gene LEU2. Esta etapa é intermediária e necessária para evitar acúmulo do metabólito farnesil pirofosfato (FPP) tóxico para a levedura quando em grande quantidade. Esta Na **etapa 4b** a cassette S4b contém um marcador de resistência à

kanamicina (G418 em levedura), o gene ERG19, o gene isopentenil pirofosfato descarboxilase (IDI1), e o gene ERG20. Houve substituição do promotor nativo ERG9 pelo promotor CTR3 de forma que a expressão do ERG9 possa ser modulada por cobre. Transformantes contendo o plasmídeo pAM404 e o cassete S4b foram selecionadas em meio sem metionina e leucina e contendo G418 (Geneticina) e denominadas cepa Y1770.

Na **etapa 5** o gene URA3 foi especificamente nocauteado e a cepa modificada foi selecionada em meio contendo 5-FOA.

A **etapa 6** promoveu a integração de um cassete contendo o gene AaFS entre os marcadores GAL80US e tHMGR da cassete da etapa 2, eliminando o gene de resistência à higromicina. O marcador URA3 presente na cassete foi eliminado por seleção com 5-FOA. O gene de resistência NatA inserido na etapa 3 foi agora removido por integração de uma cassete contendo também o gene AaFS que recombinau com os genes flanqueadores e seu marcador URA3 foi removido com 5-FOA. Mais uma etapa intermediária integra outra cópia de AaFS (a 3ª) de tal maneira que o gene de resistência à canamicina (G118) é removido e o marcador URA3 depois removido como explicado acima.

Na **etapa 7** foi gerada a cepa Y1913 usando-se um cassete que nocauteou STE5 introduzindo uma cópia extra de tHMGR. Transformantes com este cassete e com pAM404 foram denominados cepa Y1913.

Na **etapa 8** a cepa Y1913 foi propagada em meio YEPD não-seletivo por 3 dias até perda do plasmídeo pAM404. Em seguida a cepa foi transformada com um cassete contendo mais uma (a 4ª) cópia do gene AaFS e o gene LEU2 preparada para integrar sobre o gene IME1 inativando-o.

Na **etapa 9** a cepa foi transformada temporariamente com um plasmídeo carregando o gene OH (para induzir troca do tipo de acasalamento) e outro carregando o gene STE5 para permitir o acasalamento dos haplóides isogênicos que vão aparecer. Diplóides são selecionados e em meio sem seleção induzidos a perder os plasmídeos contendo os genes HO e STE5. A cepa resultante é a Y1979, diplóide, com 4 cópias do gene FS e incapaz de esporular e acasalar. A via metabólica turbinada resultante funciona produzindo HMG-CoA (via ERG13), mevalonato (via HMG1), 5-fosfo-mevalonato (via ERG12), 3-fosfo-5-pirofosfo mevalonato (via ERG8), 3-isopentenil pirofosfato (via ERG19), dimetilalilpirofosfato (via IDI1) e farneseno (via FS).

Estabilidade da cepa construída e competitividade:

A cepa é diplóide com duas cópias idênticas de cada cromossomo. Efeitos adversos em função dos vários genes superexpressos e do gene heterólogo FS, pleiotrópicos e epistáticos não foram observados na cepa. A estabilidade do gene FS foi testada molecularmente por mais de 40 gerações e se revelou imutável. A inativação dos genes STE5 e IME1 torna a cepa incompetente para a meiose e o acasalamento. O teste de competitividade da cepa Y1979 em crescimento conjunto com 6 cepas usuais na produção de etanol como a PE-2, foi iniciado com 90% de Y1979 e 10% das

competidoras. Em todos os casos, após 3 dias houve inversão das contagens com 90% da competidora e apenas 10% de clones representando a Y1979.

Avaliação de risco à saúde humana e animal:

Apesar desta levedura se destinar exclusivamente à produção de biodiesel, a empresa realizou uma série de experimentos para examinar possíveis efeitos adversos face à possível exposição acidental de trabalhadores. A CanTox do Canadá foi contratada para um estudo dos genes expressos nesta levedura e do gene heterólogo, buscando sua possível semelhança com alérgenos e toxinas conhecidas. As bases de dados consultadas foram MedLine (1950-2009 Feb), ToxFile (1965-2009 Feb), Biosis Previews (1926-2009 Feb), Agrícola (1970-2009 Feb) e Embase (1974-2009 Feb). Não se encontrou qualquer indicação na literatura que sugira a associação entre a expressão dos genes da via do mevalonato e FS e um aumento de patogenicidade ou/e virulência ou alergenicidade da levedura notadamente inócua como vimos (atende ao item 10 do anexo III da RN-5 embora não se intenciona usá-la como alimento). A planta de origem da farneseno sintase é também, de longa data utilizada por vastas populações há séculos no tratamento de febres e malária. O próprio sesquiterpeno farneseno pertence a uma classe de produtos amplamente disseminados na natureza. Em dose elevadas pode ser tóxico. O laboratório independente MB Research foi contratado para avaliar aspectos de segurança relacionados ao farneseno resultante da fermentação realizada pela cepa Y1979. Foram avaliados a toxicidade oral aguda, toxicidade dérmica aguda, irritação aguda ocular, sensibilização dos linfonodos e mutagenicidade. Em todos os casos, os resultados sugeriram que o farneseno é, em geral, bem tolerado e não é mutagênico. A DL50 do farneseno em ratos foi determinada como sendo superior a 5000 mg/Kg de peso. A aplicação desta dose na pele foi feita em coelhos e não houve reação dérmica em 24 horas, com pequena resposta no sétimo dia e mais fraca ainda após 15 dias. Assim, quanto à substância pura farneseno e prevendo possíveis exposições acidentais, foram avaliados aspectos relacionados aos itens 7 (análise imunológica e histológica), 8 (possível efeito tóxico) e 9 (avaliação toxicológica). Os compostos deste grupo podem agir como feromônios de alarme em cupins e outros insetos e constituir parte substancial de substâncias odoríferas como as presentes no perfume de gardênia. Plantas atacadas por parasitas emitem compostos voláteis entre os quais o farneseno (Kannaste *et al.*, 2009). Estes compostos têm efeito inibidor da proliferação bacteriana. Os frutos que consumimos produzem o farneseno como maçãs, laranjas, e o composto está presente nos óleos essenciais de sândalo, manjeriço, mexericas, limões, limas, semente de cenoura, gardênia, gengibre, uva, e muitos outros.

Quanto às diferenças de composição química e nutricional entre o alimento oriundo do vegetal geneticamente modificado e do vegetal não modificado, *in natura* ou após processamento e a existência de equivalência substancial entre o OGM e seu organismo parental assim como a investigação da digestibilidade da levedura e suas frações, não há sentido em estabelecer comparações já que esta levedura não será utilizada como alimento humano ou incorporada à ração animal. Os estudos da CanTox demonstraram não haver base biológica para efeitos no sistema imunológico ou

toxicidade além do organismo não se destinar ao consumo como alimento. Portanto as recomendações do anexo III da RN-5 quanto aos itens 4 (desempenho nutricional), 5 (digestibilidade e estabilidade das proteínas expressas), e 6 (potencial teratogênico), não se aplicam a esta solicitação.

Para a inativação após a fermentação a empresa decidiu-se pelo uso de vapor superaquecido gerado com facilidade em sua planta e que efetivamente mata as leveduras e não deixa resíduos ambientalmente agressivos. Informa que 62°C por 90 minutos inativa completamente a cepa nas várias condições examinadas (em água ou vinhaça). Na produção a Amyris usará temperaturas bem superiores (120°C) garantindo completa segurança de inativação.

Avaliação de impacto ambiental da cepa GM:

Aspectos específicos da biossegurança ambiental da cepa Y1979.

O processo apresenta da página 11 à página 163, um grande conjunto de experimentos desenhados e realizados para avaliar aspectos indicativos da segurança ambiental da levedura recombinante.

Nível de risco do organismo receptor

Há muitas evidências de que a levedura de panificação é segura, sendo a principal delas a sua ampla utilização para a produção de pães, cerveja, vinho e um grande número de outros alimentos e suplementos alimentares, há séculos e, mais recentemente, para a produção industrial de etanol.

O órgão norte americano NIH (National Institutes of Health) considera este microrganismo tão seguro que dispensa certos procedimentos de avaliação de risco, conforme explicitado no Appendix C-III. *Saccharomyces Host-Vector Systems* (veja http://oba.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/NIH_Guidelines_Apr_02.htm).

Deteção

A detecção da levedura recombinante por PCR é simples e acurada. As leveduras nativas apresentam apenas uma banda de 270 pb, enquanto que as leveduras geneticamente modificadas poderão ser facilmente distinguidas pela presença duas bandas, uma de 279 pb e outra de 417 pb.

Estabilidade da construção

O gene para a FS está integrado no genoma de *S. cerevisiae* e a cepa Y1979 não contém plasmídeos, portanto é esperado que a estabilidade do gene seja mantida. Entretanto, para avaliar uma improvável instabilidade, a empresa desenvolveu um ensaio para detectar a presença do gene FS. Amostras foram isoladas a partir de cultivo em diferentes períodos e submetidas à técnica de PCR de colônia, na tentativa de detectar a presença do gene FS. Os iniciadores foram especificamente desenhados para as regiões flanqueadoras, fora do gene FS, para mostrar que, de fato, o gene permaneceu intacto durante a experimentação. Os resultados mostraram que o gene FS esteve presente em todas as etapas e que nenhuma instabilidade genética foi detectável na cepa Y1979 em

mais de 72 h de cultivo contínuo (~ 40 gerações); todas as 24 colônias testadas após 24 h, 48 h e 72 h de cultivo contínuo continham todas as 5 integrações genéticas. Este ensaio, portanto, sugere fortemente que a estabilidade genética da construção é mantida na cepa Y1979.

Variação da expressão gênica

Não há qualquer razão teórica para se esperar uma alteração da expressão gênica de genes não relacionados à via de produção do mevalonato. Não foi observada, nos resultados experimentais apresentados, qualquer indicação disso. Por outro lado, a expressão do gene, avaliada pela produção de farneseno, esteve sempre dentro da faixa esperada.

Destino da biomassa, gases e efluentes

Conforme instruído no Processo, a fermentação será procedida em sistema de reatores fechados, cujo objetivo é minimizar o risco ambiental. A biomassa produzida durante esse processo será inativada antes de ser descartada. A Amyris Brasil produzirá o farneseno em unidades próprias e pretende futuramente licenciar a tecnologia para terceiros.

Durante o processo fermentativo na indústria devem-se levar em consideração os riscos de escape da levedura GM ao ambiente. As células se multiplicam vegetativamente nos fermentadores e a empresa se propõe a adotar um protocolo no qual a linhagem GM é inativada por calor, gerado por vapor a altas temperaturas, após a fermentação. Isto visa minimizar a liberação de células vivas no ambiente industrial.

O processo produtivo, desde a alimentação do pré-fermentador (que é o tanque para multiplicação e preparo do inóculo), passando pela alimentação das dornas de fermentação, até as centrífugas de separação, é feito em sistema absolutamente fechado, cujo fluxo se dá por tubulações e bombas de alimentação. As leveduras oriundas do processo fermentativo são recicladas e retroalimentam as dornas. As células excedentes e todo o efluente de fermentação (que é conhecido por vinhaça) serão inativadas por calor. Dados apresentados no processo às folhas 112 a 114 mostram que Y1979 deixa de se multiplicar quando aquecida a 66°C por 120 s, independente se suspensas em água ou em vinhaça. Uma vez que o calor gerado no processo industrial é da ordem de 120°C, isto garante, na prática, a morte de 100% das células.

Fluxo gênico vertical

A cepa Y1979 foi incapacitada para a reprodução sexuada e a esporulação a quaisquer níveis detectáveis, por nocaute dos genes STE5 e IME1. STE5 é necessária para o acasalamento em *S. cerevisiae*. Cepas com ausência de STE5 mostram uma redução da reprodução sexuada em mais de seis ordens de magnitude (Elion, 2001). O gene STE5 codifica para uma proteína necessária para a reprodução sexuada em *S. cerevisiae* e reúne pelo menos três outros componentes necessários para a reprodução bem sucedida. Na ausência de STE5, células de levedura não conseguem detectar a presença de parceiros sexuais no ambiente. Por sua vez, o gene IME1 é o principal um

regulador transcricional da meiose e mutantes com a deleção deste gene não esporulam (Kassir et al., 1988). Medidas extras de precaução para reduzir ainda mais o evento já improvável de transferência de genes da cepa GM para outras leveduras foram tomadas. Sabe-se que leveduras diplóides não acasalam e a levedura cepa Y1979 é um diplóide.

Fluxo gênico horizontal

A probabilidade de fluxo genético de leveduras para organismos pertencentes a outras famílias filogenéticas é baixa. No caso da cepa Y1979, que não dispõe de plasmídeos, esta frequência é ainda menos. A frequência das transferências de genes horizontais entre espécies é prognosticada a ser de $\sim 2.0 \times 10^{-17}$, inferida a partir dos dados evolutivos (Schlüter *et al.*, 1995). Além disso, a cepa Y1979 é muito menos robusta quando comparada a PE-2 e outras leveduras de ocorrência natural, sendo rapidamente superada por estas quando na Natureza. Entretanto, o mais importante elemento desta análise de risco é que a levedura será morta pelo calor antes de qualquer liberação no ambiente. Assim, a transferência horizontal teria que ser passiva, a partir de restos celulares, o que é ainda mais improvável.

Competitividade com leveduras nativas

Em condições de fermentação controlada, a cepa recombinante não apresenta competitividade em relação às linhagens comerciais brasileiras mais comuns. Os resultados são muito claros e estão adequadamente apresentados no processo. O experimento em vasos contendo solo de área agrícola para cana também indicam que a sobrevivência da cepa Y1979 no solo não vai além dos 120 dias e que ela é menos competitiva do que as leveduras nativas.

Sobrevivência e resistência térmica

A cepa Y1979 é notadamente mais sensível ao calor em processos de esterilização que a cepa PE-02, apresentando sobrevivência de 3×10^{-5} % após 60 segundos a 66 oC, duas ordens de grandeza menor do que a cepa PE-02. Ambas as cepas são mortas com 90 segundos ou mais de exposição a 90 oC. Os resultados estão claramente indicados na página 113 do processo. Os resultados são confirmados por outro experimento descrito na página seguinte e em conjunto mostram que é viável a esterilização da vinhaça e do suspiro (sobre a dorna), que contém levedura.

Impacto sobre coleções de água

As cepas PE-02 e Y1979, quando adicionadas a água, afetaram vários parâmetros físico-químicos de forma essencialmente equivalente (páginas 115-116 do processo).

Impacto sobre o solo

Quando pellets de células das duas cepas ou suas respectivas vinhaças foram adicionadas a vasos com terra com plantas de cana-de-açúcar, não houve diferença significativa devido à aplicação das vinhaças das cepas Y1979 e PE-2 para quase todos os nutrientes avaliados. Contudo, após a adição dos pellets foram encontrados maiores

níveis de potássio e cálcio nos tratamentos com PE-2 em relação à Y1979. A adição de pellets de levedura à cultura da cana, contudo, não é um procedimento realizado de rotina nem sequer de forma excepcional, sendo apenas um artifício de experimentação. As diferenças observadas não têm, portanto, implicação negativa na segurança do ambiente. Os resultados estão claramente apresentados nas tabelas VII.6 e VII.7 das páginas 117 e 118 do processo.

Impacto sobre a biota

O solo é o principal ecossistema receptor de uma eventual liberação acidental de Y1979. Os resultados à página 133 do processo (Tabela VII. 12) mostram que a levedura Y1979 teve um efeito de toxicidade igual ou menor do que o PE-2 sobre *Daphnia similis*.

À página 136 a tabela mostra que a cepa Y1979 não é mais tóxica para indivíduos de *Dugesia tigrina* (uma planária de água doce) que a cepa da levedura controle PE-2. A mortalidade de *Danio rerio* associada à cepa Y1979 foi também equivalente à levedura controle, PE-02, como mostrado na tabela VII.15, à página 138 do processo.

Foi avaliado também o impacto da levedura e de sua vinhaça sobre duas espécies indicadoras utilizadas internacionalmente em testes de ecotoxicidade de solo, sendo a espécie de colêmbolo, *Folsomia candida*, usada como representante da mesofauna e a espécie de minhoca *Eisenia andrei*, como representante da macrofauna edáfica. Não houve qualquer diferença entre a cepa Y1979 e sua equivalente não modificada PE-02.

Em relação a microfauna, diferentes abordagens foram utilizadas. A abundância de bactérias em vasos mantidos em casa-de-vegetação onde foram aplicadas células e a vinhaça de Y1979, foi avaliada através de plaqueamento do solo em meio de cultura. A diversidade de bactérias, fungos e leveduras foi avaliada pela técnica DGGE em solos extraídos destes mesmos vasos. Testes de compatibilidade foram conduzidos em laboratório utilizando fungos e bactérias representantes de grupos funcionais importantes como os entomopatógenos, decompositores e antagonistas de fitopatógenos. Além disto, foi conduzida uma análise de um processo ecológico importante do solo que é a decomposição de matéria orgânica, processo este que é exercido por uma grande diversidade de organismos da fauna do solo. Esta é uma forma indireta de avaliar alterações na fauna do solo.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a cepa Y1979 em relação à levedura PE-2, no que se refere à alteração da diversidade microbiana ou da abundância de alfa-proteobactéria, actinobactéria ou fungos no solo durante um período de 60 dias.

A cepa Y1979 também não apresentou impacto significativo no modelo de microrganismos do solo que indicam as condições de saúde do solo, tais como o *Metarhizium anisopliae* (um entomopatógeno), o *Trichoderma harzianum* (um fungo fitopatogênico antagonista), o *Bacillus pumilus* CL16 (bactéria decompositora de celulose) e o *Pleurotus sajor-caju* (um fungo decompositor de lignina). Mais uma vez ressaltamos que a levedura não será lançada viva no meio ambiente, exceto em um cenário de acidente.

A cepa Y1979 também não apresentou impacto significativo em plantações de cana-de-açúcar ou nas taxas de decomposição do solo ou em suas propriedades químicas quando comparada à levedura nativa PE-2. Essas pesquisas foram simuladas em experimentos nos quais a vinhaça da cepa Y1979 foi empregada na rega (irrigação) de cana-de-açúcar, como é feito atualmente com PE-2 e outras vinhaças de levedura nas usinas de etanol no Brasil.

Também são apresentados os resultados de testes para avaliar os efeitos potenciais do farneseno na comunidade de insetos em geral, em razão de sua atividade com feromônios. Ao longo de um estudo de cinco meses, não foram identificados impactos na comunidade local de insetos quando se comparou as armadilhas que continham farneseno com as armadilhas de controle que não continham feromônios (herbívoros, parasitóides e predadores).

A presença do farneseno na vinhaça é, por fim, uma preocupação adicional. De fato, o farneseno se acumula tanto na parte líquida do fermentado quando no interior da levedura. A maior parte do farneseno da fermentação é retirada antes do descarte da vinhaça estéril. Na massa de levedo, a concentração pode ser consideravelmente maior. Mas este produto não será empregado para nutrição, a menos que novos estudos levem à sua recomendação. O descarte sobre o solo é o mais provável destino, de imediato, para este derivado.

Plano de monitoramento:

Seu objetivo será inicialmente garantir e acompanhar a eficiência da inativação do MGM no efluente industrial. Qualquer escape será monitorado para avaliar persistência do organismo no meio ambiente. O trabalhador não terá contato com o MGM. No entanto por meio do registro de ocorrências, haverá acompanhamento do padrão de saúde dos trabalhadores visando detectar qualquer efeito adverso. Os dados obtidos serão apresentados em relatório anual por 5 anos.

O uso da técnica de PCR de colônia será utilizado de rotina nas amostras de levedura recolhidas no ambiente da empresa para monitorar vazamentos. A metodologia molecular para acompanhamento no meio ambiente é descrita.

Conclusão:

Considerando que não existem efeitos adversos resultantes de interações indesejáveis entre os genes expressos em levedura e o transgene inserido ou que sua ação resulte em alteração do comportamento (virulência/patogenicidade/competitividade) desta levedura para o meio ambiente ou para humanos e animais; que a linhagem de origem é de uso corrente e segura; que o produto da fermentação é substância presente de maneira abundante na natureza, de toxicidade significativa apenas para insetos e que sua produção será em sistema fechado e que os métodos de inativação do efluente são eficientes e a proposta de monitoração adequada, concluímos que os riscos à saúde humana e animal são praticamente inexistentes e que esta produção industrial é segura, atendendo a legislação brasileira de biossegurança que visa a proteção do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio decidiu por dezoito votos favoráveis, um voto contra e duas abstenções pelo deferimento da liberação comercial da levedura Y1979 para a produção de farneseno.

Bibliografia:

- Aldhous, P. (1990) Genetic engineering: Modified yeast fine for food. *Nature* 344: 186
- Argueso *et al.* (2009) Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res.* 12:2258-2270.
- Brachmann C.B. *et al.* (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.*14:115-132.
- Caballero-Córdoba, G.M. and V.C. Sgarbieri (2000) Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 80: 341-351.
- Dequin, S. (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:577-588.
- Gaiotto, J.R. (2005) Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), in Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia 2005, Universidade de São Paulo: Pirassununga, SP. p. 87
- Goffeau, A. *et al.* (1996). Life with 6.000 genes. *Science* 274: 546, 563 – 567.
- Kannaste *et al.* (2009) Volatiles from a mite-infested spruce clone and their effects on pine weevil behavior. *J. Chem. Ecol.* Nov 10 Epub ahead of print
- McGovern *et al.* (2004) Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17593-17598.
- Elion, E.A. (2001) - The Ste5p scaffold. *J. Cell Sci.* **114** (Pt 22): 3967-3978.
- Kassir, Y., Granot, D. , Simchen, G. (1988) - IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* **52** (6): 853-862.

Karlsson MF, Birgersson G, Cotes Prado AM, Bosa F, Bengtsson M, Witzgall P. J. (2009) - Plant odor analysis of potato: response of guatemalan moth to above- and belowground potato volatiles. *Agric Food Chem.* **57**(13):5903-9.

Nieuwenhuizen NJ, Green S, Atkinson RG. (2010) - Floral sesquiterpenes and their synthesis in dioecious kiwifruit. *Plant Signal Behav.* **5**(1) [Disponível *online* antes da publicação]

PAN (Pesticide Action Network North America) (2009) - PAN Pesticide Database - Chemicals http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC37551

Rowan DD, Hunt MB, Alspach PA, Whitworth CJ, Oraguzie NC. (2009) - Heritability and genetic and phenotypic correlations of apple (*Malus x domestica*) fruit volatiles in a genetically diverse breeding population. *J Agric Food Chem.* **57**(17):7944-52

Schlüter, K., Fütterer, J., Potrykus, I. (1995) - "Horizontal" Gene Transfer from a Transgenic Potato Line to a Bacterial Pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) Occurs - if at all - at an Extremely Low Frequency. *Biotechnology* **13**: 1094-1098.

US Patent 5252326 - Farnesenes and related substances for mouse control. <http://www.patentstorm.us/patents/5252326/description.html>.

Webster B, Gezan S, Bruce T, Hardie J, Pickett J. (2009) - Between plant and diurnal variation in quantities and ratios of volatile compounds emitted by *Vicia faba* plants. *Phytochemistry*. [Disponível *online* antes da publicação]

Dr. Edilson Paiva
Presidente da CTNBio