

PARECER TÉCNICO Nº 4675/2015

Processo nº: 01200.000950/2015-35

Requerente: Solazyme Óleos Renováveis e Bioprodutos Ltda.

CQB: 328/11

Prótons: Prótons 12739/15, 12748/15 e 14631/15

Endereço: Rua Pierre Simon de Laplace, 751. Technopark, Campinas. CEP: 13.069-320

Extrato Prévio: 4511/15 publicado em 07/04/2015.

Reunião: 184ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 05 de agosto de 2015

Assunto: Solicitação de parecer para liberação comercial de microrganismo *Prototheca moriformis* linhagem S5223 geneticamente modificado e de seus derivados para efeito de liberação no meio ambiente e uso em produção comercial, para a produção de triglicerídeos e bioproduto da classe I de risco biológico.

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação da Solicitação de parecer para liberação comercial de micro-organismo geneticamente modificado da classe I de risco biológico, concluiu pelo deferimento, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA

Informações Gerais

A empresa Solazyme Óleos Renováveis e Bioprodutos Ltda., detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança 328/11, solicita autorização relativa à segurança do microrganismo *Prototheca moriformis* linhagem S5223 geneticamente modificada e de seus derivados para efeito de liberação no meio ambiente e uso em produção comercial, para a produção de triglicerídeos e bioproduto. O óleo, considerado substância química definida, não é objeto de avaliação de segurança pela CTNBio por não conter o OGM vivo ou o ADN recombinante. O derivado, identificado pela requerente como “bioproduto” e com aplicações propostas para seu uso incluindo produção de plásticos e papel, insumo energético para caldeiras, ração animal, uso como condicionador de solo, exportação e outras aplicações industriais, já foi aprovado anteriormente pela CTNBio segundo Parecer Técnico Nº. 4203/2014. O processo descreve as condições de biossegurança do manuseio do derivado do microrganismo, bem como a declaração formal do responsável assegurando a veracidade das informações prestadas a CTNBio.

Avaliação do microrganismo geneticamente modificado *P. moriformis* S5223

Objetivo da submissão

Obter a autorização de liberação comercial do microrganismo geneticamente modificado *P. moriformis* S5223 para a produção de óleos triglicerídeos e bioprodutos.

Origem da linhagem S5223 de *P. moriformis*:

Prototeca moriformis é uma microalga unicelular, aclorofilada, considerada microrganismo devido ao tamanho (5 a 10 µm de diâmetro), que durante o ciclo evolutivo tornou-se heterotrófico obrigatório, por perda da capacidade fotossintética.

O microrganismo *Prototeca moriformis* foi adquirido originalmente da coleção de Culturas da Universidade do Texas (UTEX), designado como UTEX 1435, referenciado na American Type Culture Collection (ATCC) sob número de acesso 16525, classificado como classe de risco 1, o que constitui o menor nível de risco.

A Solazyme Inc. usou métodos de melhoramento genético clássico para otimizar a capacidade de acumulação de triacilgliceróis (TAGs), produtividade e produção de óleo de *P.moriformis* linhagem S376 (UTEX 1435),o que levou ao desenvolvimento da linhagem parental não GM S1331.

A linhagem S5223 é uma versão melhorada por genética clássica da linhagem intermediária S2655 que surgiu através da ruptura específica de um gene endógeno de uma dessaturase de *P. moriformis* que está envolvido na biossíntese de ácidos graxos, o que elevou o conteúdo de óleo láurico. Como parte do cassete de ruptura do gene, dois genes adicionais foram expressos. O primeiro é o gene *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica a sacarose invertase, serve como um marcador de seleção, e confere a capacidade de crescer em sacarose. O segundo gene é uma tiosterase da planta *Cuphea wrightii*, o que favorece a produção de óleos de triglicéridos ricos em ácidos graxos com comprimentos de cadeia entre 10 a 14 átomos de carbono (cadeia média de

ácidos graxos). A linhagem S5223 é similar à linhagem GM S2014 já aprovada para fins comerciais pela CTNBio em 2013 (Parecer Técnico 3.775 / 2013). Seu bioproduto também foi já aprovado pela CTNBio (Parecer Técnico Nº. 4203/2014).

O gene da sacarose invertase, *SUC2* (Gen. Bank Access NP 012104), isolado de *S. cerevisiae* tem histórico de uso comercial seguro na indústria de alimentos. Esta levedura tem sido utilizada há séculos na produção de pães, cerveja e vinho, e na produção industrial de etanol, sobretudo no Brasil. O gene da tioesterase é isolado da planta herbácea anual *Cuphea wrightii*, que é utilizada para fins medicinais na medicina tradicional.

As modificações genéticas introduzidas na *Prototeca moriformis* para obtenção da linhagem S5223 foram detalhadas no processo de liberação comercial e as informações contidas nesse anexo foram consideradas como confidenciais pela CTNBio em atendimento a solicitação feita pela empresa por representarem informações com interesse comercial ainda não patenteadas.

De acordo com a Resolução Normativa nº 2 de 27.11.2006 da comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), as linhagens de *Prototeca moriformis* utilizadas pela Solazyme Inc., incluindo a linhagem S5223, são consideradas como Classe de Risco 1 (baixo risco individual e coletivo).

Em conformidade com a classificação em classe de risco 1, a linhagem de *Prototeca moriformis* contém seqüências de DNA de organismo doador e receptor que não causam agravos à saúde humana e animal e efeitos adversos aos vegetais e meio ambiente.

Característica(s) inserida(s): A microalga *P. moriformis* foi modificada geneticamente com o gene da sacarose invertase proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (possibilitando a utilização da sacarose como fonte de carbono pelo OGM) e com o gene da tioesterase da planta herbácea *Cuphea wrightii* (alterando a produção do perfil de ácidos graxos do OGM). Estes genes, que codificam enzimas envolvidas na produção de óleo láurico, não demonstraram quaisquer efeitos adversos nos ensaios de alergenicidade e ecotoxicidade, e não afetaram negativamente a qualidade do ambiente aquático ou edáfico. Uma linhagem similar já foi aprovada para uso comercial pela CTNBio em 17 de outubro de 2013 (Parecer Técnico nº3775/2013);

A linhagem geneticamente modificada (S5223) será cultivada em contenção na fábrica industrial da SB usina Moema (Orindiúva- SP) – para a qual possui o Certificado de Qualidade em Biossegurança, CQB, NBGE - 1 (CQB 364/13 NBGE – 1).

Os óleos produzidos não são tóxicos ao ambiente nas concentrações remanescentes no bioproduto.

Este processo demonstrou de forma conclusiva, através de uma grande quantidade de resultados experimentais, que nenhum impacto adverso é esperado para a saúde humana e animal ou para o ambiente no caso de uma liberação não intencional de *Prototheca moriformis* no ambiente, seja a linhagem S5223 geneticamente modificada ou a linhagem parental.

Segurança

-**Inativação térmica:** o microrganismo *Prototeca moriformis* é altamente sensível ao calor. As células são inativadas no evaporador de três estágios, na temperatura acima de 60°C durante mais de 5 minutos, e seguem para um secador rotativo aquecido, e no contato com as superfícies metálicas quentes a mais de 140°C são submetidas a estágio adicional de inativação. A tecnologia de controle da exaustão de ar do secador inclui a passagem de vapor por um sistema de retirada de impurezas para capturar condensações e quaisquer células remanescentes, que serão removidas como descarte líquido e enviadas ao sistema de águas servidas para continuação de inativação térmica.

Para comprovação da inativação térmica de células da linhagem S5223, foram realizados ensaios de sensibilidade ao calor em escala de bancada, em escala piloto de 1.000 L e em escala comercial de 128 m³ para evidenciar o impacto da temperatura do evaporador na viabilidade das células de *P. moriformis*.

Amostras de fermentados foram retiradas no final da fermentação, antes do início da inativação por evaporação e em temperaturas de operação de evaporação e no final do processo de evaporação. As amostras foram plaqueadas em meio sólido nutritivo com 2% de glicose e 100 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol. Não foi observado crescimento em qualquer dos tratamentos, exceto dos controles sem o tratamento térmico.

Os dados do ensaio usando a linhagem S5223 repetem os resultados observados para o evento S2014 e apontam que os bioprodutos gerados do processo produtivo são livres de células viáveis de *P. moriformis*.

Todos os efluentes oriundos da fermentação ou da limpeza dos equipamentos, além de passarem pela limpeza industrial com cloro, seguem para o sistema de inativação térmica, a 90°C durante 30 min, o que assegura definitivamente a inativação de qualquer célula que porventura pudesse ter resistido aos tratamentos anteriores.

- **Estabilidade do material genético inserido:** a persistência dos genes integrados sob condições fermentativas foi estudada em maiores detalhes utilizando análise Southern blot e os dados obtidos comprovam que a integração é estável.

- **Avaliação dos riscos para a saúde humana e animal:** testes realizados em ratos e cobaias com *P. moriformis* S5223 geneticamente modificada comprovaram a **ausência** de efeitos danosos em humanos ou animais por meio de rotas mais comuns de exposição: por ingestão ou por contato com a pele. Foram realizados testes de

sensibilidade dérmica, toxicidade e patogenicidade oral aguda. Os resultados negativos dos testes indicam que a alteração genética na linhagem *P. moriformis* não a torna alergênica, tóxica ou patogênica.

Aspectos Ambientais

A Solazyme delineou seus processos para evitar a liberação de qualquer célula viva da linhagem S5223 no ambiente; já que a planta de produção foi construída em contenção e o processo é totalmente controlado. Ainda assim, a empresa realizou uma avaliação de risco com o auxílio de laboratórios independentes e universidades, sob a coordenação do prof. Italo Delalibera Júnior, da ESALQ/USP, que consideraram os riscos potenciais à saúde humana e animal e ao meio ambiente no caso de uma liberação não planejada. Estes estudos demonstraram claramente que tanto a linhagem GM S5223 como sua linhagem isogênica não transgênica, S1331 são seguras. A microalga *P. moriformis* não produz esporos e é sensível a dessecação. Observou-se o decaimento de 9 logs após 3 dias a temperatura de 4 a 54 °C. As informações apresentadas da avaliação do risco, mostram conclusivamente que, se houvesse liberação não intencional no meio ambiente, nenhum impacto adverso seria esperado. Isto já era esperado, já que S5223 tem os mesmos elementos genéticos da linhagem S2014 já aprovada pela CTNBio (Parecer Técnico 3.775/2013)

Conclusão final

Com base nos dados apresentados no relatório e dos conhecimentos descritos na literatura científica, o parecer desta assessoria é favorável à liberação comercial do microrganismo *Prototheca moriformis* S5223 e de seus derivados considerando-os tão seguros quanto à linhagem não seu equivalente convencional para o meio ambiente, para os homens e animais.

Considerando que:

- A microalga *P. moriformis* é um organismo classificado como da classe de risco 1;
- As modificações genéticas introduzidas não inserem características patogênicas ou tóxicas a *P. moriformis*;
- Não haverá liberação ambiental da *P. moriformis* viva e tanto os óleos triglicéridos como o derivado bioproduto não contêm o microrganismo GM vivo ou seu ADN recombinante;
- Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade realizados com as células e bioprodutos não mostraram efeitos negativos sobre os bioindicadores de qualidade de água e de solo internacionalmente padronizados, assim como não afetaram o crescimento das plantas e nem a qualidade da água ou do solo;

Parecer: ante aos dados apresentados pela proponente e a literatura consultada, concluímos que esse microrganismo geneticamente modificado não oferece riscos ambientais, à saúde humana ou animal e a CTNBio concluiu pela sua biossegurança e de seus derivados, não sendo causadores de significativa degradação ambiental.

Dr. Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio

Bibliografia consultada:

- ARNOLD, P.; AHEARN, D.G. The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamenta*. **Mycologia**, v. 64, p. 265–75, 1972.
- BHATTACHARYA, D; MEDLIN, L. Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plant Physiology**, v. 116, n.1, p. 9-15, 1998.
- SZABO, N.J.; MATULKA, R.A.; MARONE, P.A.; BAUTER, M.R.; CHAN, T.; FRANKLIN, S.; CARNEY, J.R.; MCQUAID, S.L.; RAKITSKY, W.; GREEN, R.; LICARI P. **Safety evaluation of oleic-rich triglyceride oil produced by a heterotrophic microalgal fermentation process. Food and Chemical Toxicology**, v.65, p.301-311, 2014.
- UNITES STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, *Saccharomyces cerevisiae* Final Risk Assessment – Biotechnology Program under the Toxic Substances Control Act (TSCA). 1997. Disponível em: <www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra002.htm>.