

PARECER TÉCNICO CTNBio N° 5496/2017

Restrição no Processo: Possui Informações Confidenciais

Processo SEI: 01200.003788/2015-15

Requerente: Du Pont do Brasil SA. — Divisão Pioneer Sementes

CQB: 013/97

Assunto: Solicitação de parecer para liberação comercial de derivado de OGM

Extrato Prévio: 5012/2016, publicado no DOU em 11 de março de 2016

Reunião: 204ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de agosto de 2017

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação da Solicitação de parecer para liberação comercial do derivado de OGM alfa-amilase, 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.

1. Identificação do OGM

Designação do OGM: Bactéria

Espécie: *Bacillus licheniformis*

Característica Inserida: Produção de alfa-amilase

Método de introdução da característica: Tecnologia do DNA recombinante

Uso proposto: Enzima será utilizada em produtos de limpeza

Uso proposto: Uso comercial da enzima alfa-amilase, derivada de organismos geneticamente modificados, com aplicação na área de produtos de limpeza, tais como detergentes para lavanderia e louça para a remoção de manchas originadas por amido. Nas modalidades de manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, bem como quaisquer outras atividades relacionadas, e para fim único e exclusivo para aplicação em detergentes e similares, nos termos da Resolução Normativa N°5 de 12 de março de 2008.

O produto comercial contendo a enzima alfa-amilase é considerado um derivado de organismo geneticamente modificado por conter detritos celulares que permanecem no meio após a etapa de filtração parcial e não contém células vivas. Esses detritos celulares são mantidos, pois são utilizados no processo de granulação. As cepas de *Bacillus* não apresentam atividade toxigênica e não são patogênicas para o homem e animal e, foi concedido o status de QPS (Presunção Qualificada de Segurança).

2. Proteínas Expressas:

- α -AMILASE – que catalisa a endo-hidrólise de ligações alfa-1,4-D-glucosídicas em polissacarídeos que contêm três ou mais unidades α -1,4 ligadas a D-glucose.

3. Área de Restrição Ambiental: Conforme estabelecido no art. 10 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".

4. Confidencialidade:

A CTNBio informa, que de acordo com o parágrafo 5º do artigo 38 do Regimento interno da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança manteve o sigilo solicitado para algumas informações do processo.

5. Fundamentação Técnica:

A empresa DuPont do Brasil S.A. solicitou à CTNBio autorização para o uso comercial da enzima alfa-amilase, uma enzima derivada de organismo geneticamente modificado, com aplicação na área de produtos de limpeza, tais como detergentes para lavanderia e louça para a remoção de manchas originadas por amido. A empresa solicita autorização para manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, bem como quaisquer outras atividades relacionadas, e com fim único e exclusivo de aplicação em detergentes e similares. Esta solicitação foi analisada e aprovada pela CIBio da DuPont do Brasil S.A.

A enzima alfa-amilase hidrolisa polissacarídeos como o amido, com ampla especificidade para ligações alfa-1,4-D-glicosídicas para produzir oligossacarídeos e, posteriormente, açúcares redutores. Essa enzima é produzida por meio de técnicas de DNA recombinante, sendo seu gene pertencente ao micro-organismo *Bacillus sp.* e introduzido no cromossomo do hospedeiro *Bacillus licheniformis*. O produto comercial contendo a enzima alfa-amilase é considerado um derivado de organismo geneticamente modificado por conter detritos celulares que permanecem no meio após a etapa de filtração parcial e não contém células vivas. Esses detritos celulares são mantidos, pois são utilizados no processo de granulação.

O organismo hospedeiro, *Bacillus licheniformis*, foi considerado seguro pela Agência Europeia para Segurança Alimentar (European Food Safety Agency - EFSA) e pela agência americana UFDA (US Food and Drug Administration). A cepa de *B. licheniformis* GICC03299 é derivada de uma cepa laboratorial *B. licheniformis* Bra7. Esta cepa foi desenvolvida em uma cepa hospedeira pela Genencor Internacional, atualmente parte da DuPont Industrial Biosciences, desde 1989. Esta cepa também foi alterada para que não mais produzisse esporos.

A modificação genética envolve técnicas de DNA recombinante para introdução de múltiplas cópias do gene da alfa-amilase de *Bacillus sp.* no cromossomo do hospedeiro *B. licheniformis* (Bra7).

A cepa de *B. licheniformis* GM expressa uma alfa-amilase de *Bacillus*. Esta proteína é uma alfa-amilase (número IUB 3.2.1.1, número CAS 9000-90-2) que catalisa a endo-hidrólise de ligações α -1,4-D-glucosídicas em polissacarídeos que contêm três ou mais unidades α -1,4 ligadas a D-glucose.

A bactéria GM também produz uma enzima que confere resistência a cloranfenicol que é utilizada apenas para a seleção da cepa, mas não durante a produção da enzima. Portanto, a preparação enzimática não contém cloranfenicol.

A descrição detalhada do vetor, do cassete de integração, da construção gênica, incluindo regiões reguladoras e marcadores de seleção utilizados e cassete de integração utilizados, foi apresentada nos apêndices **como informação confidencial**.

O *Bacillus licheniformis* é onipresente no ambiente (solo, água, plantas e animais). Este organismo vem sendo utilizado há décadas na produção de enzimas alimentícias sem nenhum caso reportado de efeitos adversos causados à saúde humana ou ao meio ambiente. Uma vez que o hospedeiro está em vários *habitats*, como resultado, ele também pode ser encontrado em alimentos.

Cepas do *B. licheniformis* em geral têm sido usadas por mais de 20 anos para a produção industrial de alfa-amilase. A cepa parental *B. licheniformis* Bra7 e as cepas derivadas dele têm sido usadas para produção em escala industrial de alfa-amilase para aplicações em processamento de alimentos desde 1989. Como a cepa produtora não produz esporos, não se espera que o organismo produtor sobreviva no ambiente ou que cause algum efeito prejudicial ao solo, ar ou água. Ainda assim, esta avaliação foi realizada pela empresa e é apresentada no processo. A espécie *B. licheniformis* não é capaz de colonizar humanos ou animais com respostas imunes normais. Os micro-organismos não viáveis não causam efeito tóxico ou alergênico em humanos ou animais.

Apesar destes fatos, cepas de *Bacillus* derivadas da mesma origem foram testadas quanto a patogenicidade e toxicidade pela empresa. A conclusão da pesquisa foi que nenhuma substância tóxica foi produzida pela cepa e que não é tóxica ou patogênica.

Uma revisão da literatura revela que o *Bacillus licheniformis* não produz substâncias toxigênicas. Contudo, têm havido casos de gastroenterite aguda, autolimitada, associada ao isolamento de grandes quantidades desta espécie; entretanto, um efeito tóxico ou direto no epitélio intestinal não foi demonstrado. Uma série de espécies do gênero *Bacillus*, incluindo *licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. pumilus* foram capazes de produzir uma lecitinase, que é uma enzima que pode romper membranas celulares de mamíferos.

Porém, não há uma correlação entre a produção desta lecitinase com doenças humanas. Além disso, não se encontrou nada sugerindo que *B. licheniformis* seja um patógeno de plantas. Não há menção de qualquer atividade patogênica a plantas no *Manual of Systematic Bacteriology* nem na lista do Departamento de Agricultura dos EUA de patógenos mediante o *Federal Plant Pest Act* (7 CFR 330, et seq.). Uma vez que o único DNA no OGM não derivado do próprio hospedeiro é a alfa-amilase isolada de *Bacillus* sp. #707 (M202L), é altamente improvável que haja qualquer alteração, com respeito à patogenicidade comparada ao organismo hospedeiro. Apenas este gene sintético foi usado no organismo da produção final, portanto, nenhum efeito patogênico é esperado.

O produto, uma alfa-amilase, como qualquer outra proteína, pode causar reações alérgicas como a febre do feno, quando inalada. Sendo uma enzima, o produto é irritante para a pele e membranas mucosas. A DuPont construiu uma vasta experiência no controle de exposições a enzimas para proteger a saúde dos funcionários, clientes e consumidores. A indústria de enzimas e detergentes desenvolveu documentos orientadores sobre o manuseio seguro de enzimas no local de trabalho. A implementação de controles específicos de engenharia, práticas recomendadas para manuseio, uso e desenvolvimento de produtos com enzimas encapsuladas têm reduzido significativamente as exposições a enzimas no local de trabalho; adicionalmente, a redução no risco de sensibilização a enzimas, ao longo dos anos, é consistente com uma relação exposição-resposta.

Foi apresentado um estudo de impacto ambiental demonstrando que não há produção de esporos pelo OGM e tão pouco maior resistência a dessecação que o organismo parental. Observou-se também que o organismo pode ser inativado utilizando todos os métodos conhecidos para inativar *Bacillus licheniformis* (lisozima, aquecimento, hipoclorito 10%, UV, etc.).

A empresa também apresentou testes de sobrevivência da cepa GM utilizando amostras naturais de solo e água, e os resultados indicaram que o organismo tem menor capacidade de sobrevivência do que a cepa selvagem. A sobrevivência e dispersão do OGM na água, ar e solo foi avaliada. Como os nutrientes são limitados no ambiente comum, células de *B. licheniformis* são frequentemente encontradas em seu estado dormente, na forma de esporos. Como a cepa *B. licheniformis* Bra7 não pode formar esporos, isso limita severamente sua sobrevivência no meio ambiente.

Os resultados dos estudos de sobrevivência com cepas esporulantes e não esporulantes do *B. licheniformis* são totalmente consistentes com estudos independentes realizados com *B. subtilis*, ou seja, também foi observado apenas a sobrevivência de longo prazo em solo estéril da cepa com capacidade de esporulação. Em nenhum dos ambientes naturais, um efeito significativo ou duradouro na microflora endógena foi observado com a introdução de 10^6 células do *B. licheniformis*, o que indica que este micro-organismo não tem capacidade de competição.

Quatro estudos foram realizados para determinar a patogenicidade e a toxicidade de cepas derivadas da cepa selvagem *Bacillus licheniformis* Bra 7, utilizada para desenvolver as cepas de produção, e quatro estudos toxicológicos foram realizados com a cepa de produção. Em todos os estudos feitos, os resultados apresentados foram negativos para produção de toxinas sob as condições dos métodos e o organismo de produção não foi considerado mais tóxico, infeccioso ou patogênico do que a cepa igualmente não tóxica, não infecciosa e não patogênica, *B. licheniformis* Bra 7, da qual é derivada.

Este OGM é classificado como de Classe de Risco 1. *B. licheniformis* é aceito como hospedeiro seguro para a construção de Micro-organismos

Geneticamente Modificados em diversos países, como Alemanha e Países Baixos, reconhecido e certificado como hospedeiro de sistemas hospedeiro-vetor no *NIH Guidelines*(EUA).

Preparações de alfa-amilases de *B. licheniformis* são consideradas GRAS (Comumente Reconhecidas como Segura), inclusive para utilização em ingredientes alimentícios. A requerente cita várias outras enzimas produzidas a partir *B. licheniformis* e consideradas GRAS.

Risco à saúde humana e animal

O *B. licheniformis* é onipresente no ambiente (solo, água, plantas e animais). A cepa produtora não produz esporos, portanto, não se espera que o organismo produtor sobreviva no ambiente ou tenha algum efeito prejudicial no solo, ar ou água. Esse micro-organismo vem sendo utilizado há décadas na produção de enzimas alimentícias sem que nenhum caso relatado de efeitos adversos causados a saúde de humanos ou ao meio ambiente.

A cepa produtora foi testada quanto a sua capacidade de sobrevivência na água, ar e solo e os resultados mostraram que o organismo tem menor capacidade de sobrevivência do que a cepa selvagem. Como ela não produz esporos (limitado), não se espera que o organismo sobreviva no ambiente (água, ar, solo). Foi também realizado um estudo pela requerente que demonstrou que a capacidade de sobrevivência da cepa produtora é menor do que a da cepa selvagem.

A espécie *B. licheniformis* não é capaz de colonizar humanos ou animais com respostas imunes normais. Os micro-organismos não-viáveis não causam efeito tóxico ou alergênico em humanos ou animais. Cepas de *Bacillus* foram testadas quanto a patogenicidade e toxicidade e a conclusão do trabalho foi que nenhuma substância tóxica foi produzida pela cepa e que esta não é tóxica ou patogênica.

Estudos de patogenicidade e Toxicidade

Quatro estudos foram realizados para determinar a patogenicidade e a toxicidade de cepas derivadas da cepa selvagem *Bacillus licheniformis* Bra 7, utilizada para desenvolver cepas de produção. E quatro estudos toxicológicos

foram realizados com a cepa de produção. Os estudos mostraram que o micro-organismo não é patogênico e nem toxigênico e nenhuma substância tóxica é produzida por esse microrganismo. A enzima se destina a uso em detergente, não é para consumo, mas mesmo assim foram realizados testes de toxicidade. Ela é destinada para uso da enzima em detergente não é para liberação do OGM no meio ambiente, mas foram realizados testes que demonstram a segurança do microorganismo. Então mesmo em caso (improvável) de escape do microorganismo no meio ambiente, não são vislumbrados riscos significativos ao meio ambiente.

O primeiro teste foi o Estudo de Toxicidade Oral de 13 semanas em Ratos: micro-organismos testes foram administrados oralmente em ratos fêmeas e machos do tipo Sprague-Dawley com doses de 625, 1250 e 2500 mg/kg/dia por 13 semanas consecutivas. Animais adicionais foram utilizados como grupo de controle. Todos os animais sobreviveram até a data de sacrifício, exceto um animal fêmea que morreu na 10ª semana do estudo. Nenhuma lesão ou anormalidade foi encontrada na necropsia. Todos os outros animais foram sacrificados após o término do estudo e as necropsias foram realizadas. Nenhuma anormalidade foi encontrada e a conclusão foi de que a administração oral do micro-organismo teste não é toxicologicamente significativa.

O segundo foi o Estudo de Toxicidade Oral Aguda em Ratos: A toxicidade de uma única dose oral do micro-organismo teste foi avaliada em ratos Sprague-Dawley. As anormalidades observadas, como coloração de fezes e urina e acizentamento do baço, foram encontradas tanto no grupo de animais que receberam o micro-organismo teste quanto nos do grupo de controle que receberam apenas o padrão negativo. Concluiu-se que a toxicidade causada foi, provavelmente, devido à formulação e não ao micro-organismo teste. Sob as condições realizadas, o estudo LD50 oral agudo do micro-organismo foi estimado como sendo maior do que 5.000 mg/kg em ratos.

O terceiro foi o Ensaio de Mutação Reversa Bacteriana em cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 e TA1537, além da cepa teste E.coli WP2 uvrA na presença e ausência da fração S9 (homogeneizado de fígado de rato induzido por Aroclor), ou seja, da presença ou ausência de metabolização. Utilizou-se o método de incorporação de placas. Nas condições descritas, não foram observadas respostas positivas. A dose máxima do ensaio foi de 5000 µg por placa. A conclusão foi de que o micro-

organismo de teste é considerado negativo para o Ensaio de Mutação Reversa Bacteriana.

O quarto é o Teste de Citogenética de Mamíferos, aberração cromossômica, usando Linfócitos Periféricos Humanos *In Vitro*, também na presença e ausência de ativação metabólica, em que a dose máxima testada foi de 5000 µg/mL . Sob as condições do método utilizado e com base nos resultados do estudo, concluiu-se o micro-organismo teste utilizado é negativo para aberrações cromossômicas estruturais e numéricas em linfócitos de sangue periférico humano.

Aspectos Ambientais

Possível produção de esporos pelo OGM e sua possível resistência à dessecação

B. licheniformis é um *Bacillus* formador de esporos. Contudo, esta cepa é deficiente na produção de protease extracelular que limitará a sobrevivência no ambiente. Além disso, a cepa de produção geneticamente modificada apresenta uma exclusão de um dos genes da esporulação, tornando a cepa incapaz de formar esporos (Apêndice 3-INFORMAÇÃO CONFIDENCIAL).

Estudos de sobrevivência no microcosmos (solo, águas superficiais, e águas residuais) com um conjunto comparável de cepas de *B.licheniformis* (cepas alfa-amilase com cópias do gene alfa-amilase integradas no cromossoma, mas com uma mutação de esporulação menos estável, clássica) mostraram uma sobrevivência reduzida de cepas asporogênicas se comparadas com o tipo selvagem de *B. licheniformis* e a flora endógena (Apêndice 1).

O *B. licheniformis* Bra7 é um *Bacillus* que utiliza estruturas de esporos para sobrevivência em condições desfavoráveis (estresse). Contudo, a cepa desenvolvida é deficiente na produção de protease extracelular limitando sua sobrevivência no ambiente.

Além disso, a cepa de produção geneticamente modificada apresenta uma exclusão de um dos genes da esporulação, tornando a cepa incapaz de formar esporos. Estudos de sobrevivência no microcosmos (solo, águas superficiais, e águas residuais) com um conjunto comparável de cepas de *B. licheniformis* (cepas alfa-amilase com cópias do gene alfa-amilase integradas no cromossoma, mas com uma mutação de esporulação menos estável, clássica) mostraram uma sobrevivência reduzida de cepas asporogênicas se comparadas com o tipo selvagem de *B. licheniformis* e a flora endógena.

Quanto aos agentes esterilizantes efetivos contra o OGM, o *B. licheniformis* pode ser inativado por tratamento com lisozima, aquecimento, hipoclorito 10%, UV etc.

Possíveis efeitos do OGM na qualidade da água, ar e solo:

Os *Bacilli* formam um grupo de bactérias quimo-organotróficas, dotadas de mobilidade, em sua maioria Gram-positivas, em forma de bastonetes, que formam esporos, usando uma variedade de ácidos orgânicos e aminoácidos como fontes de carbono. A maioria das cepas são habitantes saprofíticos, aparentemente comuns do solo e da água que ocupam uma variedade de nichos ecológicos no mundo todo. O gênero compreende as espécies mesofílicas, termofílicas, acidofílicas e alcalofílicas.

Estudos de sobrevivência do microcosmo mostram que as células do *B. licheniformis* não são capazes de sobreviver em uma variedade de ambientes testados (consulte o Apêndice 1). Isso é verdade para cepas proficientes e deficientes em esporulação em ambientes aquáticos. Em solo estéril há evidências de que as cepas proficientes em esporulação podem crescer e sobreviver durante períodos de tempo mais longos, mais provavelmente atravessando o processo de esporulação. As células do *B. licheniformis* que não realizam esporulação são capazes de crescer em solo estéril, mas este período de crescimento é seguido por uma redução a níveis de inoculação dentro de 1 mês.

Em ambientes naturais nenhum efeito significativo ou duradouro na microflora endógena foi observado na introdução de 10^6 células do *B. licheniformis*, o que indica que o *B. licheniformis* não tem capacidade de competir. Os resultados dos estudos de sobrevivência com cepas de esporulação e não esporulação do *B. licheniformis* são totalmente consistentes com estudos independentes realizados com *B. subtilis*: neste caso, também foi observado apenas na sobrevivência de longo prazo em solo estéril da cepa de esporulação.

Sobrevivência e dispersão do OGM na água, ar e solo:

Os estudos de sobrevivência do microcosmo mostram que as células do *B. licheniformis*, se introduzidas em grandes números em uma variedade de ambientes, são incapazes de sobreviver. Esta conclusão se sustenta para cepas com esporulação proficiente e deficiente em ambientes aquáticos. Em solo estéril há evidências de que as cepas proficientes em esporulação podem crescer e sobreviver durante períodos de tempo mais longos, mais provavelmente atravessando o processo de esporulação. Células não esporulantes de *B. licheniformis* são capazes de crescer em solo estéril, mas este período de crescimento é seguido por uma redução a níveis de inoculação dentro de 1 mês.

Em nenhum dos ambientes naturais um efeito significativo ou duradouro na microflora endógena foi observado na introdução de 10^6 células do *B. licheniformis*, o que indica que o *B. licheniformis* não tem capacidade de competir.

Os resultados dos estudos de sobrevivência com cepas de esporulação e não esporulação do *B. licheniformis* são totalmente consistentes com estudos independentes realizados com *B. subtilis*: neste caso, também foi observado apenas na sobrevivência de longo prazo em solo estéril da cepa de esporulação.

6. Parecer:

Considerando que:

- A alfa-amilase é um derivado de um OGM, considerado como um produto da Classe de Risco I;
- Não haverá liberação ambiental do *B. licheniformis* geneticamente modificado;
- Que a cepa produtora apresenta um fenótipo estável de baixa capacidade de esporulação, sem reversão, o que limita fortemente a sua sobrevivência no ambiente;
- Que o *B. licheniformis* produtor foi utilizada em testes quanto a sua capacidade de sobrevivência na água, ar e solo e, os resultados mostraram uma menor capacidade de sobrevivência da cepa produtora comparada à cepa selvagem;
- Que, o produto final alfa-amilase não contém células do *B. licheniformis* produtor, mas apenas detritos celulares utilizados no processo de granulação.
- Que o produto não apresenta potencial patogênico ou toxigênico.
- O derivado de *B. licheniformis* será importado e não haverá manuseio de OGM vivo no país.

Sendo assim, somos favoráveis à liberação para uso comercial do produto alfa-amilase, derivada de micro-organismo geneticamente modificado, para a finalidade proposta de aplicação na área de produtos de limpeza, tais como detergentes para lavanderia e louça e para a remoção de manchas originadas por amido.

A CTNBio, após apreciação da solicitação de parecer para liberação comercial de Derivado de OGM alfa-amilase, 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.

7. Bibliografia

Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, pp. 1105-1139. In: P.H.A. Sneath et al.

(eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.

De Boer, A.S., F. Priest & B. Diderichsen. 1994. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 595-598

Edberg, S.C. 1992. US EPA human health assessment: *Bacillus licheniformis*. Unpublished, U.S.

Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

GRAS Notice 72. 2001. Pullulanase derived from *Bacillus licheniformis* carrying a gene encoding

pullulanase from *B. deramificans*.

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=graslisting&id=72>

GRAS Notice 265. 2009. Glycerophospholipid cholesterol acyltransferase (GCAT) enzyme preparation

from *Bacillus licheniformis* expressing a modified GCAT gene from *Aeromonas salmonicida* subsp.

Salmonicida.

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=265>

GRAS Notice 277. Maltotetraohydrolase enzyme preparation from *Bacillus licheniformis* expressing a

modified maltotetraohydrolase gene from *Pseudomonas stutzeri*.

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=grasListing&id=277>

Obi, S.K.C. 1981. Pectinase Activity of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria Associated With

Soft Rot of Yam *Dioscorea rotundata*. *Appl. Environ. Microbiol.* (41) 563-567.

Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., & DiNovi, M. J. 2006. Food-processing enzymes from

recombinant microorganisms—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* (45)144-158.

Dr. Edivaldo Domingues Velini

Presidente da CTNBio