

PARECER TÉCNICO Nº 5827/2018

Este Processo POSSUI Informações Confidenciais (não presentes nesse parecer)

Processo SEI nº: 01250.038925/2017-09

Requerente: Amyris do Brasil Ltda.

CQB: 255/08

Assunto: Solicitação de Liberação Comercial de OGM com Informações Confidenciais

Extrato Prévio: 5723/17

Reunião: 210ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em março/2018

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à biossegurança de produto para liberação comercial, 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.

PARECER TÉCNICO

EMENTA: A instituição requereu à CTNBio parecer técnico referente à biossegurança da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa Y22021) geneticamente modificada, bem como seus derivados para as finalidades de

transporte, comercialização, produção industrial de farneceno, descarte e quaisquer outras atividades relacionadas ao propósito do OGM em questão e progênes dele derivadas. A instituição solicitou ainda que as informações, figuras, tabelas ou fragmentos de texto contidos no Apêndice 1, Seção V— itens V.3; V.4; V.5; V.6; V.8, V.9, V.10, V.11 e V.14 e no Apêndice 2, Seção VI — texto complementar ao item VI.10 (contendo a sequência da proteína farneceno sintase), fossem consideradas de caráter CONFIDENCIAL, uma vez que se tratam de informações que envolvem segredo industrial e comercial da Requerente, além de apresentarem detalhes relacionados à construção genética da cepa Y22021, ainda não patenteados no Brasil. A confidencialidade foi aprovada pelo Presidente da CTNBio.

O OGM ao qual esse processo se refere é uma cepa da levedura *S. cerevisiae* modificada para a alta produção de β -farneceno à partir de biomassa. A produção de farneceno utiliza uma rota metabólica endógena da levedura, a via do isopreno, que produz farnesil difosfato. A proteína recombinante adicionada ao OGM, farneceno sintase originária de *Artemisia annua* L. (GenBank AAX39387.1), converte farnesil difosfato em farneceno. O farneceno é um sesquiterpeno consistindo de um conjunto de seis isômeros estruturais, que são encontrados naturalmente. Esse produto já é produzido pela empresa utilizando duas outras cepas já aprovadas para liberação comercial pela CTNBio, cepas Y1979 e Y5056. O farneceno é um intermediário de alto valor comercial, como por exemplo na produção de bioquerosene de aviação.

Para fins desse pedido de Liberação Comercial, a requerente apresentou documentação contendo informações descrevendo o OGM, bem como os resultados relativos às avaliações de risco à saúde humana e animal e ao ambiente. Vale ressaltar que toda a produção será feita em contenção, uma vez que as condições de fermentação utilizadas são assépticas devido à menor robustez das linhagens; e que não é possível detectar OGMs viáveis no produto final.

1. Informações Gerais:

A presente cepa (Y22021) foi geneticamente modificada para converter de forma eficiente e com alto rendimento açúcar em farneceno, um hidrocarboneto isoprenóide, não tóxico, um importante insumo da indústria química que pode ser utilizado como precursor para a produção de biocombustíveis, lubrificantes, solventes, cosméticos, adesivos, polímeros, nutracêuticos, entre outros produtos. As modificações genéticas realizadas na cepa Y22021 foram selecionadas com base na sua capacidade de aumentar a produção celular de farneceno a partir da sacarose. O trans-beta-farneceno é uma substância química naturalmente encontrada nos óleos essenciais e aromas de muitas plantas (como maçãs, kiwis, camomila, etc.). Os óleos

essenciais ricos em farneseno são utilizados como ingredientes de aroma e sabor, não tendo sido seu uso associado como causador de quaisquer efeitos adversos para a saúde humana, animal ou ao meio ambiente.

Outras duas linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para a produção de farneseno já foram analisadas pela CTNBio, tendo suas liberações para uso comercial aprovadas anteriormente.

2. Descrição do OGM:

O organismo receptor, *Saccharomyces cerevisiae*, é reconhecido pelo Food and Drug Administration, do USA, como GRAS - Generally Recognized As Safe; sendo também reconhecida pela comunidade científica e organismos reguladores internacionais como não patogênica ou não perigosa para humanos, animais e meio ambiente.

Todos os genes inseridos na cepa Y22021 estão presentes como integrações estáveis nos cromossomos naturais da cepa hospedeira, os padrões de herança genética dos genes inseridos são idênticos aos padrões de herança genética de todos os outros genes cromossômicos nativos em *S. cerevisiae*. Entretanto, tendo em vista que a cepa Y22021 teve os genes relacionados à capacidade de meiose e mating deletados, a capacidade de propagação dos genes inseridos é limitada em relação a cepas de *S. cerevisiae* que não foram alvo dos mesmos processos de transformação da cepa Y22021.

A documentação apresentada fornece informações detalhadas (classificadas pela CTNBio como informações confidenciais) sobre: as metodologias utilizadas nas transformações genéticas; sobre a caracterização molecular do inseto, incluindo a sequência completa de nucleotídeos e indicando as regiões flaqueadoras, elementos os reguladores presentes (promotores, elementos reguladores em cis, sítios de poliadenilação, íntrons e éxons e região de terminação da transcrição); a localização do inserto no genoma da levedura; as proteínas produto da transcrição do segmento inserto; as técnicas de identificação e análise do OGM; o grau de estabilidade fenotípica.

3. Biossegurança do Produto:

Testes de toxicidade oral em ratos e toxicidade dérmica *in vitro* da cepa Y22021 foram realizados pela empresa Envigo (localizada na Inglaterra) utilizando a levedura seca. O teste de toxicidade oral foi conduzido com ratos da linhagem Wistar, e a dose aguda oral letal mediana (LD50) foi estimada ser maior do que 2000 mg/kg de peso corporal. Não houve mortalidade dos animais, e não foram observados sinais de toxicidade sistêmica, sendo que

todos os animais apresentaram ganho de peso conforme esperado e nenhuma anormalidade foi observada na necropsia.

O teste para determinar o potencial irritante da levedura seca à pele foi conduzido utilizando o modelo tridimensional EPISKINTM, que consiste em epiderme humana reconstruída a partir de queratinócitos normais humanos cultivados em uma matriz de colágeno na interface ar-líquido. A viabilidade celular dos tecidos após exposição à cepa Y22021 seca correspondeu a 93,4%, portanto, a levedura seca foi classificada como substância não irritante. O teste foi conduzido de acordo com as diretrizes descritas em OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 439 e Method B.46. *in vitro* skin irritation: Reconstructed Human Epidermis Model Test as described in Commission Regulation (EC) No. 761/2009, of 23 July 2009, amending, for the purpose of its adaptation to technical progress, Regulation (EC) No 440/2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH).

Adicionalmente, foram realizados testes de toxicidade oral e dérmica agudas com o próprio produto produzido por esta levedura geneticamente modificada (farneceno), e os resultados mostraram que a dose letal do farneceno é superior a 5000 mg/kg de peso, sendo que até a dosagem testada de 5000 mg/kg de peso não houve mortalidade ou reação dos animais (dados apresentados na proposta de aprovação de liberação comercial da cepa Y5056 Processo nº 01200.003977/2011-56 - Extrato de Parecer Técnico N° 3.287/2012, já aprovado pela CTNBio).

Baseados na literatura científica a respeito da segurança envolvida no uso do organismo *S. cerevisiae*, e de acordo com o exposto acima e com os resultados dos ensaios desenvolvidos usando as cepas da Amyris, incluindo cepa Y22021, objeto da presente proposta de liberação comercial, pode-se concluir que a cepa Y22021 não apresenta interações com efeitos adversos que poderiam ser causadas pela introdução dos genes heterólogos, não havendo quaisquer indícios de que possa provocar risco adicional à saúde animal ou humana em comparação a uma cepa convencional da levedura *S. cerevisiae*, classificada como GRAS.

Quanto à segurança ambiental, foram realizados ensaios para verificar se a cepa Y22021 afetava negativamente o meio ambiente. Os ensaios foram realizados tanto pela equipe da Amyris e por laboratórios independentes (Laboratório Tecam). Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre a cepa Y22021 e sua isolinha Y969, no que se refere à sobrevivência em ambiente aquático e edáfico. Ademais, a cepa Y22021 não ocasionou efeito negativo aos fungos e bactérias bioindicadores do solo, aos organismos representantes da mesofauna do solo que agem como indicadores,

como as minhocas (*Eisenia andrei*) nem aos organismos representantes do ambiente aquático, como os peixes (*Danio rerio*). Adicionalmente, foram realizadas análises de água e solo utilizados nos experimentos e não foram identificados impactos prejudiciais na composição química das amostras dos componentes analisados, quando comparando aos resultados da cepa Y22021 com a cepa isolinha Y969.

Quanto ao risco de transferência gênica, a probabilidade de fluxo genético de leveduras para organismos pertencentes a outras famílias filogenéticas é baixa, em especial pelo fato de que a cepa Y22021 não dispõe de plasmídeos que contenham material genético heterólogo. A frequência das transferências de genes horizontais entre espécies é prognosticada a ser de aproximadamente 2.0×10^{-17} . Pelo fato de essa taxa ser excessivamente baixa, a transferência de genes horizontais não foi medida experimentalmente, mas sim inferida a partir dos dados evolutivos. Além disso, os genes de *mating* e esporulação foram deletados na cepa Y22021 e a mesma também se mostra menos robusta quando comparada a sua isolinha Y969.

4. Segurança Alimentar:

Estudos de inclusão de levedura na alimentação de aves, utilizando a cepa Y1979 que contem a mesma modificação genética da levedura em avaliação nesse processo, e já liberada para uso comercial pela CTNBio, demonstram que o uso da levedura é seguro e não causa quaisquer efeitos adversos à saúde dos animais.

Visando avaliar a especificamente a segurança da cepa Y22021 para a finalidade de alimentação animal, foram realizados estudos com inclusão de levedura seca na alimentação de suínos em diferentes níveis e em comparação à inclusão de uma levedura comercial *S. cerevisiae* não OGM, já utilizada para fins de alimentação animal. Os dados obtidos demonstraram que a saúde dos animais e seu desempenho foram mantidos, não sendo observados quaisquer efeitos adversos na saúde dos animais avaliados. Foram monitorados os parâmetros de ganho de peso, conversão alimentar, análises hematológicas (eritrograma e leucograma), análises histológicas (rins, fígado, pulmão, intestino, baço e linfonodos mesentéricos), função hepática e renal e morfometria intestinal.

5. Avaliação de risco ao meio ambiente:

Foram apresentados estudos para avaliar os riscos potenciais desta cepa caso liberada no meio ambiente. Os estudos avaliaram, também, o impacto potencial à segurança dos trabalhadores. Com base nos resultados dessas

análises, a cepa Y22021 mostra-se tão segura quanto à sua isolinha Y969 e outras leveduras convencionais já em utilização no Brasil e os resultados corroboram os dados previamente apresentados. Considerando-se os estudos relatados na literatura e conduzidos até o momento com *S. cerevisiae* geneticamente modificada inclusive os com as cepas Amyris Y1979 e Y5056 (aprovadas para uso comercial pela CTNBio), bem como os estudos descritos no processo em tela com a cepa Y22021, demonstram-se que as alterações genéticas nas leveduras resultam em menor capacidade de sobrevivência do que sua isolinha Y969 bem como em baixa adaptabilidade ao solo e à água. O processo de fermentação para produção do β -farneceno bem como o design do processo asséptico é diferente do convencionalmente utilizado na produção de etanol. Isso deve-se ao fato destas cepas serem menos competitivas do que as leveduras de fermentação alcoólica. Todo o processo para a produção do β -farneceno é realizado em tanques assépticos, do inóculo aos tanques de produção. A água residual e off-gas produzido durante o processo é coletado e tratado e inativado antes do descarte. Após o processo fermentativo, a separação do produto é realizada por centrifugação e o processamento do farneceno consiste no uso de altas temperaturas (durante processo de destilação, são atingidas temperaturas de aproximadamente 110°-115°C), não sendo possível encontrar células viáveis no produto final, o qual é considerado como sendo uma substância quimicamente definida. Todo o resíduo da centrifugação é conduzido por tubulação para tanques fechados para serem submetidos à inativação antes de seu descarte, reduzindo assim a possibilidade de escape de células OGM.

6. Plano de Monitoramento Pós Liberação Comercial:

Em relação ao Plano de Monitoramento Pós Liberação Comercial a requerente informou que, amparada pela Resolução Normativa N°09, artigo 3°, após publicação da decisão técnica favorável ao uso comercial da cepa Y22021 e seus derivados, a Amyris irá submeter um plano de monitoramento pós-liberação comercial, que contemplará as questões de biossegurança relevantes relacionadas ao uso comercial da cepa Y22021 para avaliação da CTNBio.

7. Parecer Final:

Considerando os dados apresentados e o conhecimento científico acumulado, concluímos que a exposição à levedura Y22021 e seu consumo alimentar é seguro para o ambiente, homem e os animais e, portanto, recomendamos o deferimento da solicitação de liberação comercial.

8. Bibliografia:

- Angov E, Hillier CJ, Kincaid RL, Lyon JA. Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS One*. 2008;3(5):e2189.
- Araújo LFJ, O.M.; Lopes, E.L.; Araújo, C.S. da S.; Ortolan, J.H.; Laurentiz, A.C. Utilização da levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. *Ciência Rural*. 2006;36:576-1582.
- Asadollahi MA, Maury J, Schalk M, Clark A, Nielsen J. Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through metabolic engineering of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2010;106(1):86-96.
- Da Silva NA, Srikrishnan S. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2012;12(2):197-214.
- Jensen NB, Strucko T, Kildegaard KR, David F, Maury J, Mortensen UH, et al. EasyClone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 2014;14(2):238-48.
- Liao P, Hemmerlin A, Bach TJ, Chye ML. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnol Adv*. 2016;34(5):697-713.
- Nevoigt E, Kohnke J, Fischer CR, Alper H, Stahl U, Stephanopoulos G. Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(8):5266-73.
- Phulara SC, Chaturvedi P, Gupta P. Isoprenoid-Based Biofuels: Homologous Expression and Heterologous Expression in Prokaryotes. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(19):5730-40.
- Trotta E. The 3-base periodicity and codon usage of coding sequences are correlated with gene expression at the level of transcription elongation. *PLoS One*. 2011;6(6):e21590.
- Wang C, Yoon SH, Shah AA, Chung YR, Kim JY, Choi ES, et al. Farnesol production from *Escherichia coli* by harnessing the exogenous mevalonate pathway. *Biotechnol Bioeng*. 2010;107(3):421-9.
- Zhuang X, Chappell J. Building terpene production platforms in yeast. *Biotechnol Bioeng*. 2015;112(9):1854-64.

Dr. Edivaldo Domingues Velini

Presidente da CTNBio

