



COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 354/2022/SEI-CTNBio - Membros
PARECER TÉCNICO Nº 7978/2022

Há Informação Confidencial no corpo deste Parecer?	
	SIM
X	NÃO

Processo SEI nº: 01245.019406/2021-99

Requerente: Amyris Biotecnologia do Brasil Ltda.

CQB: 255/08

Assunto: Solicitação de parecer técnico para liberação comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa 62840) geneticamente modificada da classe de risco 1.

Extrato Prévio: 8012/2021, publicado no Diário Oficial da União em 25 de novembro de 2021.

Reunião: 250ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 07 de abril de 2022.

Decisão: DEFERIDO

1. FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA (de acordo com informações do demandante)

O presidente da Comissão Interna de Biossegurança da Amyris Biotecnologia do Brasil Ltda., Sr. Cássio Barbosa, solicita parecer técnico da CTNBio para liberação comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa 62840) geneticamente modificada da classe de risco 1 e seus derivados, para a produção de vanilina, que é um componente extraído comumente orquídea *Vanilla planifolia* (baunilha). A proposta foi elaborada nos termos da Resolução Normativa Nº 21 de 15 de junho de 2018, cujas disposições prevalecem sobre as disposições da Resolução Normativa nº 5, de 12 de março de 2008, da CTNBio.

A CTNBio informa que de acordo com o inciso XIII do art. 9º da Portaria MCTI nº 4128/2020/SEI-MCTI - Regimento interno da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança e instruído pela **NOTA TÉCNICA Nº 118/2021/SEI-CTNBio - Membros**, o Presidente da CTNBio concedeu sigilo para as informações contidas no volume confidencial, processo 01245.016357/2021-32.

O parecer de aprovação da CIBio encontra-se à página 5 do documento SEI 8541963.:

"Com base nos resultados apresentados de estudos de avaliação de risco à saúde humana e animal e ao meio ambiente para a cepa Y62840, e dispondo a empresa de um processo industrial voltado à minimização de riscos ao trabalhador e ao meio ambiente, a CIBio da Amyris concluiu que as informações contidas na presente proposta de liberação comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, para a produção de vanilina (cepa Y62840), e seus derivados, demonstram que o referido evento é seguro para fins de alimentação animal e não apresenta risco à saúde humana e animal, assegurando que todos os ensaios foram realizados em conformidade com a Lei de Biossegurança de Nº 11.105, de 24 de março de 2005, bem como as Resoluções Normativas aplicáveis.

Desta forma, a CIBio da Amyris Biotecnologia do Brasil Ltda, aprovou a presente Proposta de Liberação Comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada (cepa Y62840) para a produção de vanilina, e seus derivados, e vem requerer a aprovação comercial da *Saccharomyces cerevisiae* cepa Y62840 e seus derivados junto à CTNBio para as finalidades de transporte, comercialização, produção

industrial de vanilina, descarte e quaisquer outras atividades relacionadas ao propósito do MGM em questão e progênie dele derivadas"

A Declaração de Veracidade das Informações Fornecidas encontra-se à página 7 do documento SEI 8541963.

2. DESCRIÇÃO INICIAL E CONSIDERAÇÕES GERAIS (de acordo com informações do demandante)

A presente proposta se refere à liberação comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (também conhecida como levedura de panificação), que foi geneticamente modificada (cepa Y62840) para a produção de vanilina, tendo sido apresentados estudos de biossegurança e dados vasta literatura científica disponível, apresentados ao longo do requerimento.

A Amyris Biotecnologia do Brasil Ltda. obteve entre os anos 2010 e 2021 aprovação de liberação comercial, pela referida Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), de 7 cepas de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas e seus derivados, sendo quatro delas cepas produtoras de **Farneceno**, a saber:

-Y1979 – EPT 2.281/2010

-Y5056 – EPT 3287/2012

-Y22021 – EPT 5827/2018

-Y27011 – EPT 6165/2018

E três delas cepas produtoras de **Glicosídeos de esteviol**, a saber:

-Y47220 – EPT 6551/2019

-Y63348 – EPT 6822/2020

-Y67383 – EPT 7663/2021.

A Amyris Biotecnologia do Brasil é uma filial da Amyris Inc., sediada em Emeryville, na Califórnia, Estados Unidos, e está presente no Brasil desde 2008. A Amyris atua na produção de produtos químicos renováveis para diversas aplicações como ingredientes cosméticos, fragrâncias, flavorizantes, adoçantes, nutracêuticos, combustíveis, solventes e lubrificantes. Com a tecnologia desenvolvida, é possível desvincular o processo de produção do preço e da volatilidade da oferta de moléculas naturais, permitindo o suprimento do mercado de forma constante, com custo mais acessível, e de forma sustentável.

Os produtos da Amyris são derivados da fermentação a partir de cana-de-açúcar e o processo precisa ser realizado de forma asséptica, diferindo do processo convencionalmente utilizado para a produção de etanol, porque **as cepas geneticamente modificadas da Amyris são menos robustas do que as leveduras convencionais de fermentação alcoólica e os microrganismos contaminantes precisam ser evitados**. O processo de produção de vanilina é realizado a partir do processo fermentativo de cepas geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*, como a cepa Y62840, utilizando como matéria-prima o açúcar (xarope e/ou VHP (very high polarity sugar)).

Após o processo fermentativo são realizados os processos de separação e purificação do produto produzido pela cepa Y62840, **uma molécula que confere aroma (vanilina)**, que estão descritos no apêndice confidencial por se tratar de segredo industrial.

Ao término da fermentação o caldo fermentado é submetido a um processo de aquecimento, que por sua vez inativa o OGM, e dessa forma, não são encontradas células viáveis em nenhuma etapa do processo downstream e o produto final também é livre de ADN e proteína de MGM. Ou seja, a vanilina produzida pela cepa Y62840 é considerada substância pura quimicamente definida, cuja definição encontra-se no Decreto Presidencial n. 5.591 de 22/11/2005 Art 3 parágrafo 2º: "Não se inclui na categoria de derivado de MGM a substância pura, quimicamente definida, obtida por meio de processos biológicos e que não contenha MGM, proteína heteróloga ou DNA recombinante." **Portanto, como o produto final não contém MGM, proteína heteróloga ou DNA recombinante, não é objeto de regulamentação pela CTNBio.**

A vanilina produzida através de processo fermentativo pela Amyris obteve aprovação da classificação GRAS (Generally Recognised As Safe) pelo Expert Panel of the Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA) of the United States em 2019 (ANEXO 3), o que significa que a vanilina produzida pela Amyris é consistente com a identidade da vanilina já considerada GRAS.

Além disso, todo o resíduo do processo, incluindo água residual e off-gas, é conduzido por tubulação para tanques fechados para serem submetidos à inativação térmica antes de seu descarte.

Atualmente, **a levedura separada pelo processo de centrifugação na etapa de recuperação do produto é inativada por calor e descartada juntamente com a vinhaça gerada para a ferti-irrigação**, conforme descrito no processo de obtenção de Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) para a unidade industrial da Amyris.

A Amyris busca continuamente um uso alternativo para estes co-produtos do processo de produção industrial, atualmente caracterizados como resíduo, para que possam ter uma destinação mais nobre, gerando menor descarte. Este derivado, que atualmente tem sido descartado, tem valor agregado para uso como um ingrediente em alimentação animal, analogamente às leveduras oriundas do processo para a produção de etanol da indústria canavieira, das cervejarias e vinícolas. Além do uso como fonte de nutrição animal, este produto, rico em nutrientes, poderá ser utilizado para outras diversas finalidades, como geração de energia, condicionador de solo e quaisquer outras aplicações relacionadas ao propósito deste MGM e seus derivados.

3. HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO SEGURA DA *Saccharomyces cerevisiae* (de acordo com informações do demandante)

A *Saccharomyces cerevisiae*, também conhecida como levedura de panificação, é utilizada, há séculos, na produção de pães, cerveja e vinho e, mais recentemente, na produção industrial de etanol, sobretudo no Brasil. É utilizada também na fabricação de produtos farmacêuticos e nutracêuticos, tais como aminoácidos, lipídios, proteínas, enzimas, vitaminas e hormônios. A levedura de panificação é também consumida em amplas quantias como parte da dieta de pessoas que a utilizam como fonte natural de vitaminas e como composto da alimentação de diversos animais como, por exemplo, porcos, frangos, coelhos e peixes.

A ampla utilização da levedura de panificação é uma evidência que comprova seu perfil de segurança favorável e bem estabelecido. Diversas agências governamentais estudam e aprovam a utilização da levedura de panificação. **O órgão americano responsável pelo controle de medicamentos e alimentos nos Estados Unidos (Food and Drug Administration - "FDA") classifica a *S. cerevisiae* como GRAS "Generally Recognized As Safe" (FDA, 1986), após estudar extensivamente este microrganismo.** O Instituto Nacional de Saúde Americano (National Institutes of Health - "NIH") considera a *S. cerevisiae* tão segura, que a maioria dos experimentos que a envolvem são isentas de suas orientações (Anexo C-III das Orientações do NIH, 2002). Da mesma maneira, a EPA isenta a *S. cerevisiae* da maior parte das cláusulas previstas no Toxic Substance Control Act (TSCA, legislação americana que regula a introdução de novos produtos químicos no mercado). **Portanto, a *S. cerevisiae* é empregada como organismo eucariótico modelo padrão em estudos nas áreas de microbiologia, biologia celular, bioquímica e genética.**

Mesmo *S. cerevisiae* geneticamente modificada que contenha transgenes múltiplos é considerada segura em muitos países, dentre eles o Reino Unido, os Estados Unidos e o Canadá. Um exemplo disso é o caso das cepas ML01 e ECMo01, denominadas GRAS pelo FDA americano em 2003 e 2006, respectivamente, cuja utilização foi aprovada para a produção de vinho nos Estados Unidos e no Canadá. Outros exemplos incluem duas cepas de leveduras geneticamente modificadas aprovadas no Reino Unido para o processo de fabricação de cerveja e de pão, respectivamente e três cepas geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* da empresa Novo Nordisk aprovadas na União Européia para a alimentação de suínos.

Com base nas evidências da segurança na utilização de *S. cerevisiae* em diferentes campos da pesquisa, inclusive sob modificação genética (levedura geneticamente modificada), a Amyris optou por esse organismo como sua plataforma tecnológica para a produção de um amplo e diversificado portfólio de produtos renováveis, que compreendem desde combustíveis até cosméticos e fragrâncias, dentre

outros produtos químicos. **O perfil de segurança de *S. cerevisiae*, somado à sua ampla utilização industrial no Brasil para a produção de etanol, torna-o o organismo receptor ideal para a produção de vanilina, uma molécula que confere aroma.**

4. RESUMO DAS MANIPULAÇÕES MOLECULARES ENVOLVIDAS:

As modificações genéticas realizadas na cepa Y62840 foram descritas detalhadamente no Apêndice Confidencial.

Estudos realizados mostraram que o genoma da cepa Y62840 é estável e o risco de transferência horizontal de genes é extremamente baixo.

5. AVALIAÇÃO DE RISCO DA CEPA Y62840 (de acordo com informações do demandante)

A proponente apresentou um resumo das avaliações de risco realizadas com a cepa Y62840, da qual a cepa Y67383 deriva diretamente, atendendo os requisitos do Anexo I da Resolução Normativa N° 21/2018, da CTNBio.

O organismo receptor da cepa Y62840 (*Saccharomyces cerevisiae*) é reconhecido pelo (Food and Drug Administration - "FDA") como GRAS – Generally Recognized As Safe (FDA, 1986), sendo reconhecida pela comunidade científica e organismos reguladores internacionais como não patogênica ou não perigosa para humanos, animais e meio ambiente. Os genes introduzidos na cepa Y62840 não estão associados à/ou esperam gerar quaisquer efeitos adversos em seres humanos ou animais, como toxicidade, alergenicidade, alterações hormonais ou resistência a antibióticos.

A cepa Y62840 não contém vetores. A cepa não contém plasmídeos manipulados ou outros elementos de DNA extracromossômico não nativo, conforme verificado por sequenciamento do genoma completo. Toda a engenharia genética em Y62840 está localizada como integrações estáveis nos cromossomos da cepa de levedura *S. cerevisiae*.

Conforme apresentado no item VII.2 e ANEXO 5, a análise *in silico* utilizando bioinformática revelou a ausência de evidências de identidade ou similaridade de tamanho completo entre as construções utilizadas na cepa Y62840 e alérgenos e metabólicos tóxicos conhecidos, sugerindo que as construções e, por consequência, a cepa *in si* têm baixo potencial de alergenicidade. Além disso, o produto produzido pela cepa Y62840, vanilina, foi classificado como GRAS, não havendo indícios de que a cepa Y62840 possa apresentar maior potencial de toxicidade do que cepas não geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*.

A Amyris apresentou anteriormente, nas propostas de aprovação de liberação comercial de cepas *S. cerevisiae* já aprovadas pela CTNBio (Y1979, Y22021 e Y47220), estudos de toxicidade oral aguda para ratos e de inclusão de levedura na alimentação de aves e suínos e 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. Nestes estudos, 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. Estes estudos comprovaram que o uso da levedura da Amyris é seguro e não causa quaisquer efeitos adversos à saúde dos animais. De forma a confirmar os resultados encontrados previamente foi realizado, pela empresa Tecam, um ensaio de toxicidade oral aguda com ratos utilizando caldo fermentado contendo células viáveis na concentração na ordem de 10^9 células/mL (concentração máxima de células atingida durante as corridas de fermentação). Para o ensaio foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*). **Não foram observados sinais clínicos de toxicidade e/ou mortalidade nos animais tratados com as doses de 2000 mg/kg de peso corporal da amostra. Ao final dos testes todos os animais apresentaram ganho de peso. Não foram detectadas alterações clínicas nos animais e no exame de necropsia não foram observadas alterações macroscópicas nos animais.** Dessa forma, a amostra contendo células viáveis da cepa Y62840, contidas no caldo fermentado (WCB Y62840 - Lotus) foi classificada como categoria 5, não classificada de acordo com o GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures, sendo que a dose oral letal mediana (DL50)

para ratos foi considerada maior que 2000 mg/kg de peso corporal. O valor estimado da DL50 (cut-off) foi de 5000 mg/kg de peso corporal. O relatório completo do estudo foi apresentado no ANEXO 6.

Adicionalmente, as análises do produto final vanilina gerado pela Amyris por processo fermentativo **confirmou que o processo da Amyris produz vanilina compatível com a vanilina classificada como GRAS e dessa forma, não há indícios de que as proteínas especificadas pelos transgenes possam se comportar na levedura de maneira diferente das encontradas na natureza e não há indícios de que sejam encontradas diferenças em relação à estabilidade ao processamento industrial ou digestão.**

Os resultados do ensaio de toxicidade oral aguda em ratos realizados com administração oral de células da cepa Y62840 em caldo fermentado, apresentados nesta proposta, mostraram que não houve nenhum efeito adverso nesses animais. Esses dados corroboram os resultados encontrados previamente para cepas da Amyris já aprovadas comercialmente pela CTNBio (ANEXO 1) nos estudos de inclusão da levedura seca na ração de aves e suínos que já haviam sido realizados previamente para cepas Amyris aprovadas comercialmente que mostraram que as cepas Amyris são seguras para este uso.

Dessa forma, e pelos resultados de avaliação de risco apresentados pela proponente, não há indícios de que a cepa Y62840 possa causar quaisquer efeitos deletérios em animais prenhes ou que tenha potencial teratogênico, sendo seu uso seguro para a saúde humana e animal.

6. PLANO DE MONITORAMENTO (de acordo com informações do demandante)

Uma vez que não foram identificados riscos não negligenciáveis com o uso da cepa Y62840 e seus derivados para a saúde humana, animal e ao meio ambiente, a CIBio da Amyris Biotecnologia do Brasil Ltda. propõe que o Plano de Monitoramento Geral Pós-liberação comercial consista na avaliação dos seguintes parâmetros:

1. Monitoramento de efeitos adversos não previstos e não intencionais sobre a saúde dos trabalhadores do laboratório e unidade industrial, para avaliar quaisquer ocorrências adversas aos exames de saúde periódicos estabelecidos para os funcionários. Os exames periódicos serão aqueles recomendados pela Portaria N° 3.214/78 - NR-07 do Ministério do Trabalho, e o monitoramento se aplicará aos funcionários do laboratório e unidade industrial da empresa compradora da cepa Y62840 ou seus derivados, e que estejam envolvidos diretamente nas atividades de manipulação destes produtos. O monitoramento da saúde dos trabalhadores será realizado através do Programa de Saúde Médico Ocupacional (PCMSO) já existentes nas empresas que comprarem a cepa Y62840 ou seus derivados. A cepa Y62840 não oferece riscos à saúde humana, aos animais e meio ambiente, conforme avaliado por esta conceituada Comissão e, portanto, não demandam quaisquer exames ou avaliação adicional além dos já previstos pelo PCMSOs determinados pelas potenciais empresas que irão comprar o produto da Amyris.

2. Comprovação da ausência de células de *S. cerevisiae* cepa Y62840 viáveis em 3 lotes independentes do sobrenadante gerado após as etapas de aquecimento e centrifugação - extrato), através de plaqueamento em meio de cultura ou metodologias previamente validadas pela Amyris. Este monitoramento terá como objetivo acompanhar a eficiência da inativação da levedura pela etapa de aquecimento do caldo fermentado, nos casos em que o produto a ser comercializado seja o derivado da cepa Y62840.

3. Monitoramento periódico da eficiência do sistema de inativação utilizado para inativar resíduos provenientes do processo fermentativo podendo conter a cepa Y62840. Este monitoramento terá como objetivo acompanhar a eficiência do sistema de inativação da levedura, nos casos em que o produto a ser comercializado seja o derivado da cepa Y62840, para evidenciar a eficácia do sistema de inativação do MGM. Este monitoramento poderá incluir a verificação dos parâmetros do sistema de inativação validados pela CIBio, tais como tempo de residência e temperatura aos quais a cepa deverá ser submetida para sua inativação. A frequência do monitoramento destes parâmetros dependerá da periodicidade da produção deste derivado e a frequência será estabelecida de acordo com a validação da CIBio. Este monitoramento terá duração de 6 meses ou enquanto houver a produção deste produto na unidade industrial no caso de períodos inferiores a 6 meses.

4. Relatório contendo sumário e referências a artigos científicos publicados sobre a *S. cerevisiae* cepa Y62840, em revistas com corpo editorial ("*peer-review*") ou relatórios de agências governamentais, quando houver. A CIBio sugere que o monitoramento pós-liberação comercial tenha duração de seis meses ou enquanto houver a produção deste produto na unidade industrial no caso de períodos inferiores a seis meses e terá seu início a partir do uso comercial da cepa Y67383 e/ou seus derivados. O relatório final será submetido para apreciação da referida Comissão após conclusão do período total de monitoramento pós-liberação comercial.

7. PARECER:

Diante da consideração que: a) 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 no meio ambiente ou em humanos e animais; b) que a linhagem de origem é de uso corrente e segura e c) que o produto da fermentação é substância presente de maneira abundante na natureza, **concluimos que os riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente são praticamente inexistentes e que a cepa Y62840 geneticamente modificada, bem como seus derivados e quaisquer progênies dela originadas, para qualquer tipo de uso pretendido pela proponente, são considerados seguros, atendendo a legislação brasileira de biossegurança que visa a proteção do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, pelo que somos de Parecer Favorável à sua liberação comercial, bem como somos Favoráveis ao Plano de Monitoramento apresentado.**

No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que as medidas de biossegurança propostas atendem às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal. Assim, atendidas as condições descritas no processo e neste parecer técnico, essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana.

Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso
Presidente da CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Augusto Vianna Barroso, Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**, em 26/04/2022, às 12:03 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.mcti.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **9658642** e o código CRC **C1754460**.