



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO - MCTI

PROCESSO: 01200.004293/2014-14

DATA DO PROCESSO: 15/09/2014

INTERESSADO(S):

BIOCELERE AGROINDUSTRIAL LTDA

CLASSIFICAÇÃO ARQUIVÍSTICA: 114.34 - LIBERAÇÃO COMERCIAL

ASSUNTO:

LIBERAÇÃO COMERCIAL DA LINHAGEM CELERE-2L DE LEVEDUEIRA DE CERVEJA SACCHARIMYCES CEREVISIAE.



OUTROS DADOS:

MOVIMENTAÇÕES

SEQ	SIGLA	CÓDIGO	DATA	SEQ	SIGLA	CÓDIGO	DATA
01			/ /	15			/ /
02			/ /	16			/ /
03			/ /	17			/ /
04			/ /	18			/ /
05			/ /	19			/ /
06			/ /	20			/ /
07			/ /	21			/ /
08			/ /	22			/ /
09			/ /	23			/ /
10			/ /	24			/ /
11			/ /	25			/ /
12			/ /	26			/ /
13			/ /	27			/ /
14			/ /	28			/ /

AS MOVIMENTAÇÕES DEVERÃO SER COMUNICADAS AO PROTOCOLO



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
Secretaria-Executiva
Subsecretaria de Planejamento, Orçamento e Administração
Coordenação-Geral de Gestão e Inovação
Divisão de Gestão da Informação e Documentação
Serviço de Protocolo Geral



SOLICITAÇÃO PARA FORMAÇÃO DE PROCESSO

NÚMERO DO PROCESSO NO PRÓTON
01200. 004293 / 20 14 - ____

1. Dados da Solicitação

1.1 - Nome do(a) Solicitante: Robério Tomás Cirqueira	1.3 - Assinatura e Carimbo do(a) solicitante: Robério Tomás Cirqueira Emp. Público/Nível Intermediário CTNBio/MCTI SAPE: 1761804
1.2 - Unidade do(a) Solicitante: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio	
1.4 - Data da Solicitação: <u>15 / 9 / 2014</u>	

2. Dados do Documento:

2.1 - Registro no PRÓTON: 00000. <u>41217/2014</u>	2.2 - Tipo de Documento: Carta	2.3 - Identificação (Nº - SIGLA): s/nº	2.4 - Data do Documento: <u>15 / 8 / 2014</u>
2.5 - Procedência: BioCelere Agroindustrial Ltda.			
2.6 - Interessado(a): BioCelere Agroindustrial Ltda.			
2.7 - Descrição do Assunto: Liberação Comercial da linhagem Celere-2L de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .			
2.8 - Classificação Arquivística: 114.34	2.9 - Palavras-chave: LC, Levedura		2.10 - Grau de Sigilo: Ostensivo/Sigiloso

3. Dados de Encaminhamento

Após sua formação em processo, deverá ser encaminhado ao(a) Sr.(a):	
3.1 - Nome: Allan Edver Mello dos Santos	
3.2 - Unidade: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança	3.3 - Sigla: CTNBio

4. Outras informações que julgar necessário

--



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral



De: Tassiana Fronza

Para: Setorial da Área de Saúde Humana & Área Animal

Número de controle: 41217/2014

- ☐ Acompanhar
- ☐ Abrir processo
- ☐ Agir
- ☐ Anexar cópia do expediente
- ☐ Anexar processo
- ☐ Atender
- ☐ Arquivar
- ☐ Criticar e revisar
- ☐ Analisar e opinar
- ☐ Dar ciência

- ☐ Dar parecer
- ☐ Dar sugestão
- ☐ Falar-me
- ☐ Informar
- ☐ Minutar resposta
- ☒ Providenciar
- ☐ Responder
- ☐ Sua informação
- ☐ Revisar
- ☐ _____

Observação: **Secretária: Cadastrar no controle interno e posterior envio a assessoria técnica.**

Esse documento é complementado pelo documento do prouton: 41223/14 que contém informações confidenciais

Tassiana Fronza

Data: 20 / Agosto / 2014

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Setor Policial Sul - SPO
Área 5 Quadra 3 Bloco B - Térreo
CEP - 70610-200
BRASÍLIA - DF



Ilmo. Dr. Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio

Assunto: Liberação comercial de OGM. Solicitação de Emissão de Parecer Técnico para proposta de liberação comercial da linhagem Celere-2L de *Saccharomyces cerevisiae*.

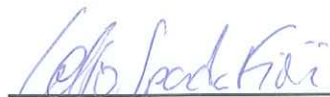
Pelo presente ofício, encaminhamos para apreciação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança o pedido de Emissão de Parecer Técnico para a proposta de liberação comercial da linhagem Celere-2L de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O documento aqui apresentado foi preparado conforme a Resolução Normativa Nº 5, de 12 de março de 2008, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. O documento é composto principalmente pelos seguintes itens:

- I - Requerimento de liberação comercial datado e assinado pelos responsáveis legais;
- II - Parecer técnico da CIBio sobre a proposta;
- III - Declaração de veracidade das informações fornecidas assinada pelos responsáveis legais;
- IV - Resumo executivo, contendo uma síntese da proposta;
- V - Informações relativas ao OGM, conforme o Anexo II da referida resolução normativa;
- VI - Avaliação de risco à saúde humana e animal, em conformidade com o Anexo III da referida Resolução Normativa;
- VII - Avaliação de risco ao meio ambiente em conformidade com o Anexo IV da referida resolução normativa;
- VIII - Plano de monitoramento em conformidade com a Resolução Normativa No 9 de 2 de dezembro de 2011.

A BioCelere Agroindustrial Ltda. permanece à disposição da CTNBio para esclarecimentos adicionais que se fizerem necessários.

Campinas, 15 de Agosto de 2014



Celso S. Fiori
Presidente da CIBio
BioCelere Agroindustrial Ltda.
celso.fiori@granbio.com.br



Proposta de Liberação Comercial



Saccharomyces cerevisiae **Linhagem Celere-2L**

*Proposta apresentada à
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CTNBio*

Campinas
Agosto/2014

EQUIPE TÉCNICA E CIENTÍFICA

Coordenação

Dr. Gleidson Silva Teixeira

Supervisão

Dr. Celso Fiori

Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira



Equipe BioCelere

¹Laboratório de Biologia Sintética

²Laboratório de Bioprocessos

³Laboratório de Química Analítica

Caracterização do transgene e do OGM

Dr. Gleidson Silva Teixeira¹

Me. Leandro Vieira¹

Ensaio de crescimento e fermentação

Dra. Jéssica Medina²

Me. Lucas Parreiras¹

Dra. Desireé Soares²

Avaliação de risco em relação ao uso pretendido

Dr. Osmar Carvalho Netto²

Dr. Gleidson Silva Teixeira¹

Processamento e quantificação de analitos

Me. Renan Pirolla³

Ensaio para análise da qualidade do solo

Dr. Eduardo Camargo¹

Ensaio para análise da qualidade do ar

Dra. Carolina Grassi¹

Ensaio de resistência a agentes esterilizantes e ao dessecamento

Dr. Gleidson Silva Teixeira¹

Me. Luige Calderón²

Angélica Gomes²

Instituição Parceira

⁴Laboratório de Genômica e Expressão | Bioinformática
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Análise da microbiota por metagenômica

Dr. Marcelo Carazzolle⁴

Dr. Gleidson Silva Teixeira¹

Sequenciamento genômico do OGM

Dr. Marcelo Carazzolle⁴

Revisão

Dr. Celso Fiori

Dr. Osmar Carvalho Netto

Dra. Silvia Missawa

Ma. Patrícia Magalhães de Toledo

MEMBRANCO

ÍNDICE DE CONTEÚDO



LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix

UNIDADE I

I. REQUERIMENTO DE LIBERAÇÃO COMERCIAL	13
II. PARECER TÉCNICO DA CIBIO	15
III. DECLARAÇÕES DE VERACIDADE	21
IV. RESUMO EXECUTIVO	25

UNIDADE II - Relatório de Avaliação de Risco | Parte I

1. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO OGM	33
1.1. A identificação do evento de transformação genética	35
1.2. Classificação taxonômica	37
1.3. O gene introduzido, organismo de origem e sua função específica	39
1.4. O vetor utilizado e seu espectro de hospedeiros	41
1.5. O mapa genético utilizado no processo de transformação	43
1.6. O resumo das construções para obtenção do OGM	45
1.7. A classificação de risco do organismo geneticamente modificado	47
1.8. Os métodos utilizados para a modificação genética	51
1.9. Caracterização molecular do inserto no organismo receptor	59
1.10. O produto da expressão do gene inserido no organismo receptor	61
1.11. As técnicas de detecção gerais e específicas do OGM	65
1.12. O padrão de herança genética do gene inserido	69
1.13. A descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos	71
1.14. O grau de estabilidade genotípica	75
1.15. A existência de interações com efeitos adversos	79
1.16. As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes	81
2. AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL	89
3. AVALIAÇÃO DE RISCO AO MEIO AMBIENTE	93
3.1. Sobre a possibilidade de o OGM produzir esporos e ser resistente ao dessecamento	101
3.2. Os agentes esterilizantes e antimicrobianos que possuem atividade contra o OGM ...	105
3.2.1. Efeito do hipoclorito de sódio sobre o OGM	106
3.2.2. Efeito do etanol sobre o OGM	107
3.2.3. Efeito da higromicina sobre o OGM	108
3.2.4. Efeito da geneticina sobre o OGM	109
3.2.5. Efeito da temperatura sobre o OGM	111
3.3. Os possíveis efeitos do OGM sobre a qualidade da água, do ar e do solo	115
3.3.1. Análise dos efeitos do OGM sobre a qualidade da água	115
3.3.2. Análise dos efeitos do OGM sobre a qualidade do solo	125
3.3.3. Análise dos efeitos do OGM sobre a qualidade do ar	133
3.4. Sobrevivência e dispersão do OGM na água e no solo	141

UNIDADE III - (Anexos) - Relatório de Avaliação de Risco | Parte II

4. MATERIAIS E MÉTODOS	147
4.1. Análise estatística	147
4.2. Transformação de leveduras pelo método de acetato de lítio	147
4.3. Expressão transiente da enzima Cre-Recombinase	148
4.4. Amplificação de regiões promotoras e terminadoras de <i>S. cerevisiae</i>	148
4.5. Montagem das construções pelo método de Gibson	149
4.6. Sequenciamento das construções	149
4.7. Extração de plasmídeos por lise alcalina	150
4.8. Quantificação do número de cópias do gene <i>xyIA</i> por qPCR	150
4.9. Extração de DNA total de leveduras	151
4.10. Análise da morfologia por microscopia de epifluorescência	151
4.11. Cultivo das linhagens Celere-2L e parental em diferentes fontes de carbono	151
4.12. Análise e quantificação de substratos e produtos por HPLC	152
4.13. Teste quantitativo da resistência ao dessecamento	152
4.14. Teste de toxicidade aguda com minhocas	153
4.15. Método semi-quantitativo para análise da resposta do OGM a diferentes condições	153
4.16. Teste da resistência a agentes químicos esterilizantes	154
4.17. Ensaio de resistência à temperatura	154
4.18. Preparo dos inóculos das linhagens OGM e parental	154
4.19. Análise metagenômica da microbiota da água e do solo	155
4.20. Montagem e análise do genoma da linhagem OGM	156
4.21. Coleta da água e solo de ambientes naturais	157
4.22. Inoculação e coleta de amostras para ensaios de sobrevivência e identificação da microbiota aquática	158
4.23. Inoculação e coleta de amostras para ensaios de sobrevivência e identificação da microbiota do solo	158
4.24. Ensaio fermentativo para análise de metabólitos gasosos	159
4.25. Análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) por GS-MS	159
4.26. Análise da sobrevivência do por qPCR	160
4.27. Extração de DNA total de amostras de água	160
4.28. Extração de DNA total de amostras de solo	161
4.29. Obtenção de açúcares a partir do material lignocelulósico	162
4.30. Lista dos meios de culturas	162
5. MATERIAL SUPLEMENTAR	165
5.1. Figuras suplementares	165
5.2. Tabelas suplementares	169
5.3. Relatório de ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	173
5.4. Relatório de ensaio de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i>	221
5.5. Método de ensaio de toxicidade aguda com minhocas	269
5.6. Relatório de ensaio: análise de compostos orgânicos voláteis (COVs)	287
5.7. Relatório de ensaio: perfil quali/quantitativo de compostos orgânicos voláteis (COVs)	323
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	347

UNIDADE IV

PLANO DE MONITORAMENTO.....357

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....359



EM BRANCO



INFORMAÇÕES RELATIVAS AO OGM

Figura 1: Mapa do vetor pRS304.....	41
Figura 2: Representação esquemática dos métodos utilizados para as modificações genéticas.	52
Figura 3: Resumo das etapas de desenvolvimento do OGM.	55
Figura 4: Representação esquemática do metabolismo de glicose e xilose para a produção de etanol.	56
Figura 5: Isomerização reversível de D-xilose a D-xilulose, catalisada pela enzima Xilose isomerase.....	61
Figura 6: Método específico para detecção do OGM.	67
Figura 7: Representação esquemática da inter-relação entre os metabolismos de glicose e xilose para produção de etanol e crescimento.....	72
Figura 8: Morfologia celular das linhagens OGM e parental.	73
Figura 9: Quantificação do número de cópias do gene xylA após 100 gerações.	77
Figura 10: Representação esquemática do metabolismo de sacarose pelo OGM.	82
Figura 11: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em sacarose.	83
Figura 12: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em glicose.	83
Figura 13: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em frutose.	84
Figura 14: Crescimento do OGM e parental em fontes de carbono não fermentescíveis.....	85
Figura 15: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em xilose.....	86
Figura 16: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em açúcares derivados da hidrólise de material lignocelulósico.	87

ANÁLISE DE RISCO AO MEIO AMBIENTE

Figura 17: Representação esquemática das principais etapas da produção industrial de etanol de segunda geração.....	97
Figura 18: Diferentes fases da divisão celular na espécie <i>S. cerevisiae</i>	101
Figura 19: Morfologia das células haplóides e diplóides da linhagem OGM.	102
Figura 20: Análise da resistência ao dessecamento das linhagens OGM e parental.	103
Figura 21: Efeito do hipoclorito de sódio no crescimento e viabilidade do OGM e parental. ...	106
Figura 22: Efeito do etanol no crescimento e viabilidade do OGM e parental.	108
Figura 23: Efeito do antibiótico higromicina sobre o crescimento e viabilidade do OGM e parental.	109
Figura 24: Efeito do antibiótico geneticina sobre o crescimento e viabilidade do OGM e parental.	110
Figura 25: Efeito da temperatura sobre o crescimento e viabilidade do OGM e parental.....	112
Figura 26: Efeitos do OGM sobre a comunidade bacteriana da água.....	121
Figura 27: Efeitos do OGM sobre a comunidade de microalgas da água.	122
Figura 28: Efeitos do OGM sobre a comunidade bacteriana do solo.	129
Figura 29: Efeitos do OGM sobre a comunidade de fungos do solo.	130
Figura 30: Crescimento e produção de CO ₂ pelo OGM a partir de glicose e xilose.	135
Figura 31: Representação esquemática da produção de CO ₂ a partir de metabolismo de glicose e xilose.....	136
Figura 32: Análise da sobrevivência do OGM na água.	142
Figura 33: Análise da sobrevivência do OGM no solo.	143

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S 1: Comparação do solo no início e final do experimento.	153
Figura S 2: Coleta da água para as análises de sobrevivência e efeitos do OGM e parental sobre a microbiota nativa.	157
Figura S 3: Coleta da água para as análises de sobrevivência e efeitos do OGM e parental sobre a microbiota nativa.	157
Figura S 4: Sistema para coleta de gases e quantificação da produção de CO ₂	159
Figura S 5: DNA total extraído de amostras da água e do solo tratadas com OGM e parental.	165
Figura S 6: Identificação das linhagens OGM e parental em amostras de solo e água.....	165
Figura S 7: Resumo dos resultados obtidos na análise da sobrevivência do OGM e parental por qPCR.	166
Figura S 8: Resumo dos resultados obtidos para o cálculo do número de cópias do gene xylA por qPCR.	166
Figura S 9: Curva de rarefação.	167



ANÁLISE DE RISCO AO MEIO AMBIENTE

Tabela 1: Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	117
Tabela 2: Análise do pH da água após testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	118
Tabela 3: Concentração do oxigênio dissolvido em testes de toxicidade com <i>Daphnia similis</i>	118
Tabela 4: Teste de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i>	119
Tabela 5: Análise do pH da água após testes de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i>	120
Tabela 6: Concentração do oxigênio dissolvido em testes de toxicidade com <i>Danio rerio</i>	120
Tabela 7: Teste de ecotoxicidade aguda com <i>Eisenia fetida</i>	126
Tabela 8: Propriedades físicas do solo antes e após o tratamento com o OGM	127
Tabela 9: Propriedades químicas do solo antes e após tratamento com o OGM	128
Tabela 10: Análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) durante a fermentação de glicose ou xilose pelo OGM	137
Tabela 11: Perfil qualitativo e quantitativo de compostos orgânicos voláteis produzidos pelas linhagens OGM e parental durante a fermentação de glicose e xilose..	138

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S 1: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento e montagem do genoma da linhagem Celere-2L.....	169
Tabela S 2: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região 16S de amostras de DNA total extraído da água.....	169
Tabela S 3: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS de amostras de DNA total extraído da água.....	170
Tabela S 4: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região 16S de amostras de DNA total extraído do solo.	170
Tabela S 5: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS de amostras de DNA total extraído do solo.....	171

Proposta de Liberação Comercial

Saccharomyces cerevisiae
Linhagem Celere-2L



UNIDADE I

- I. Requerimento de liberação comercial*
- II. Parecer técnico da CIBio*
- III. Declarações de veracidade*
- IV. Resumo executivo*

Proposta de Liberação Comercial

Este documento é de uso exclusivo do

Departamento de Comércio Exterior

EM BRANCO

I. REQUERIMENTO DE LIBERAÇÃO COMERCIAL

À

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Ilmos.



Considerando o relatório de avaliação de risco e o parecer técnico apresentados pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), os representante legais da BioCelere Agroindustrial Ltda (GranBio Celere) vêm por meio desta proposta solicitar junto a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) a liberação comercial da levedura Celere-2L.

Solicita-se a aprovação para as finalidades de transporte, comercialização, produção industrial de etanol, descarte e quaisquer outras atividades relacionadas ao propósito desse OGM, suas progênes e derivados.

O organismo é uma levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada com a introdução de um único transgene, cuja função está restritamente relacionada ao consumo do açúcar xilose. Outras modificações genéticas incluem a deleção ou o aumento da expressão de genes endógenos que participam desse metabolismo.

Seu uso pretendido é a produção de etanol de segunda geração (i.e., etanol lignocelulósico) e, por essa razão, será aplicado apenas em processos industriais dedicados à produção deste químico.

Campinas, 8 de agosto de 2014.

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Representante Legal

Manoel Carnaúba Cortez
Representante Legal

FRANCESCO
MAY 19 1964

II. PARECER TÉCNICO DA CIBIO



Comissão Interna de Biossegurança - CIBio
CQB 352/12



PARECER TÉCNICO

Levedura geneticamente modificada Celere-2L

Ilmos Srs.

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Manoel Carnaúba Cortez

Representes legais da BioCelere Agroindustrial Ltda.

Este documento refere-se às considerações da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da BioCelere Agroindustrial Ltda. sobre a proposta de liberação comercial do organismo geneticamente modificado (OGM) denominado Celere-2L.

Este parecer foi construindo a partir dos resultados e discussões apresentados no relatório de avaliação de risco elaborado para o OGM em questão. Em resumo, a CIBio considera a proposta completa e corretamente instruída, posicionando-se de forma favorável ao pedido de liberação comercial do OGM avaliado.

Desta forma, solicita-se que esta proposta seja encaminhada à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

DETALHAMENTO

Informações sobre o OGM

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem Celere-2L, objeto deste pleito, é um organismo geneticamente modificado por meio da inserção por recombinação homóloga do gene *xyIA*, codificador da enzima Xilose isomerase. Outras modificações genéticas produziram a deleção permanente de um gene e o aumento da expressão de genes endógenos, sem

introdução de sequências de DNA exógenas. Todas as modificações adicionais estão relacionadas ao metabolismo desse açúcar.

A modificação genética foi obtida por integração estável do transgene, por esse motivo não existe possibilidade de transmissão das características via plasmídeos. Utilizou-se para transformação o tradicional sistema de recombinação homóloga, que permite o direcionamento do inserto para locais pré-determinados e específicos do genoma. Este mecanismo de transformação assegura que o inserto não seja integrado no interior de outro gene, sequência regulatória, ou regiões ausentes de expressão, garantindo especificidade na integração e estabilidade na expressão do gene.

A Xilose isomerase, produto da expressão do único transgene, confere ao OGM apenas a capacidade de consumir o açúcar xilose. Esta característica permite o uso da linhagem em processos de produção de etanol comumente referidos como etanol de segunda geração ou lignocelulósico. Nestes, altas quantidades de xilose são disponibilizadas por diferentes métodos de processamento da biomassa vegetal.

Historicamente, leveduras da espécie *S. cerevisiae* são amplamente utilizadas há centenas de anos na produção de alimentos e bebidas, sem qualquer histórico consistente de efeitos indesejados à saúde humana, animal e ao meio ambiente. A utilização na produção de alimentos e bebidas, bem como a ocorrência natural em frutas, faz com que toda a população mundial tenha contato frequente e direto com este micro-organismo. Por estes motivos, diversas agências reguladoras em todo o mundo isentam este organismo de restrições regulatórias, como o exemplo da Agência Americana de Administração de Drogas e Alimentos (FDA, sigla do termo em inglês: *Food and Drug Administration*), que inclui a *S. cerevisiae* no grupo conhecido pela sigla "GRAS" (*Generally Recognized as Safe*).

Por outro lado, a Xilose isomerase é uma das enzimas mais utilizadas industrialmente devido a sua capacidade de isomerização de açúcares. Destaca-se a produção em larga escala de xarope de milho desde a década de 60, mercado que representa atualmente uma enorme parcela na indústria de alimentos. Por essa razão, a utilização desta enzima por muitos anos na indústria de alimentos comprova sua segurança para saúde humana e animal.

Adicionalmente, o organismo doador do transgene em questão é um fungo não patogênico, que estabelece uma relação de simbiose com seu hospedeiro.



Uso pretendido

A utilização deste OGM se dará exclusivamente em sistemas fechados de fermentação industrial para produção de etanol. Tais processos incluem impreterivelmente diferentes etapas que promovem a inativação da levedura *in loco* (i.e., no interior da indústria). Destaca-se a destilação para recuperação do etanol. Nesta etapa, o produto da fermentação é submetido a temperatura/tempo ($\sim 80^{\circ}\text{C}/15$ min) suficientes para promover a inativação completa do OGM, uma vez que este é suscetível a temperaturas consideravelmente inferiores às empregadas na destilação ($< 60^{\circ}\text{C}$).

Após a destilação, os subprodutos do processo incluem a lignina e a vinhaça. A lignina é separada do produto fermentado/destilado por sistemas de prensas (filtragem) e em seguida é totalmente queimada no interior da indústria para a geração de energia elétrica. A vinhaça, por sua vez, é direcionada para um sistema de concentração por evaporação, onde são aplicadas temperaturas de $67\text{-}103^{\circ}\text{C}$ por períodos superiores a 30 minutos.

Resumo da avaliação experimental do OGM

Diversos experimentos foram conduzidos sob a responsabilidade e supervisão da empresa BioCelere Agroindustrial Ltda. para compor o relatório de avaliação de risco. O documento inclui experimentos realizados no laboratório de pesquisa da empresa (CQB 352/12) ou por meio da prestação de serviços de outros laboratórios ou empresas especializados e idôneos como:

- 1) Laboratório de Genômica e Expressão (UNICAMP) – especialistas em bioinformática;
- 2) Laboratório de Microbiologia do Solo (USP/ESALQ) – especialistas no estudo de micro-organismos do solo;
- 3) *High Throughput Sequencing Facility* (HTSF) (Universidade da Carolina do Norte) – especialistas em sequenciamentos de DNA em larga escala;

- 4) Tecam Laboratórios – especialistas em análises de toxicidade ambiental (ecotoxicidade);
- 5) Athenas Consultoria Agrícola e Laboratório – especialistas em análises químicas e físicas do solo;
- 6) Tasqa Ambiental – especialistas em análises de qualidade ambiental.

Os experimentos do presente relatório demonstraram que as células de leveduras são completamente inativadas por tratamentos térmicos por tempo e temperatura consideravelmente inferiores àqueles que fazem já parte do processo industrial de produção de etanol celulósico.

Os experimentos também mostraram que a levedura não apresenta risco potencial e não difere de seu equivalente convencional para diversas avaliações como:

- 1) Sobrevivência e dispersão na água e no solo;
- 2) Efeitos tóxicos sobre organismos indicadores do solo e água;
- 3) Impacto nas características físico-químicas da água e do solo;
- 4) Impacto na microbiota da água e do solo;
- 5) Resistência a agentes esterilizantes físicos e químicos e;
- 6) Tolerância ao dessecamento.

Nos experimentos de ecotoxicidade aguda, em concentrações elevadas de até 300 mg/L de células puras, as leveduras da linhagem Celere-2L, bem como seu parental, não apresentaram efeitos tóxicos sobre organismos indicadores (peixes e microcrustáceos). Da mesma forma, os testes em solo com concentrações de 3 g/cm³ de células puras não demonstraram qualquer toxicidade para espécies indicadoras de qualidade do solo (minhocas). Além disso, a aplicação de células vivas não causou alterações nas propriedades físicas, químicas e diversidade microbiana da água e do solo quando comparada a seu equivalente convencional (parental).

Ainda, a levedura Celere-2L se mostrou igualmente sensível a diferentes agentes esterilizantes e antimicrobianos quando comparado a seu equivalente convencional.

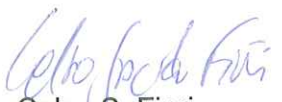
A avaliação da sobrevivência e potencial impacto de leveduras viáveis da linhagem Celere-2L em amostras naturais de solo e água demonstraram que a sobrevivência em água é equivalente e reduzida pra ambas as linhagens. No solo a equivalência também foi observada, de modo que a habilidade de consumir xilose não conferiu ao OGM vantagens adaptativas no ambiente natural em relação ao seu parental ou à microbiota nativa do solo.

Embora seja capaz de esporular, o mecanismo é passivo é multifatorial, ocorrendo em condições muito específicas. Além disso, devido à ausência de estruturas especializadas para dispersão, a esporulação não contribui para a disseminação ou sobrevivência. Adicionalmente, é bem descrito que para a espécie *S. cerevisiae* os esporos não compreendem estruturas de resistência como observado, por exemplo, em algumas bactérias ou fungos filamentosos.

Conclusão

A comissão Interna de Biossegurança da BioCelere Agroindustrial Ltda., tendo analisado o relatório de avaliação de risco da levedura Celere-2L, considera que a utilização industrial desta linhagem não é potencial causadora de efeitos adversos a saúde humana, animal e ao meio ambiente. Portanto, solicita-se que esta proposta seja encaminhada à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), requerendo a análise e a emissão do parecer técnico para a liberação comercial.

Campinas, 4 de agosto de 2014.


Celso S. Fiori
Presidente da CIBio

FRANCO

III. DECLARAÇÕES DE VERACIDADE



A quem se interessar

Eu, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, representante legal da BioCelere Agroindustrial Ltda. declaro que, no limite do meu conhecimento, todas os resultados aqui apresentados foram obtidos obedecendo todos os critérios de rigor científico.

As informações aqui apresentadas são completas, acuradas e verdadeiras.

Campinas, 8 de agosto de 2014.


Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Representante Legal

RTT FRANCO



A quem se interessar

Eu, Manuel Carnaúba, representante legal da BioCelere Agroindustrial Ltda. declaro que, no limite do meu conhecimento, todas os resultados aqui apresentados foram obtidos obedecendo todos os critérios de rigor científico.

As informações aqui apresentadas são completas, acuradas e verdadeiras.

Campinas, 8 de agosto de 2014.

Manoel C. Cortez

Manoel Carnaúba Cortez
Representante Legal



IV. RESUMO EXECUTIVO



Os setores químico e energético estão vivenciando uma transformação em seus processos industriais, baseada no emprego de micro-organismos para a produção de químicos de relevância econômica. Esta mudança é consequência do desenvolvimento de tecnologias que permitem o uso de fontes renováveis para a produção de diferentes químicos tradicionalmente derivados do petróleo. Inclui álcoois e ácidos utilizados como combustíveis (i.e., bioetanol ou biodiesel) ou como matéria-prima para diferentes fins em indústrias químicas (butanol, ácido succínico, entre outros).

No entanto, a viabilidade econômica de tecnologias dedicadas à produção industrial de “bioquímicos” é multifatorial. Depende, por exemplo, de despesas operacionais, do custo da matéria-prima e em grande parte da eficiência dos micro-organismos utilizados nos processos. Neste contexto, o advento da biotecnologia moderna tem permitido o desenvolvimento de micro-organismos geneticamente modificados de forma cada vez mais específica e segura. Em *S. cerevisiae*, por exemplo, as ferramentas de engenharia genética possibilitam manipulações precisas no DNA, eliminando o risco de modificações indesejadas no genoma. Dessa forma, genes de interesse podem ser inseridos ou silenciados de forma estável e sem o uso definitivo de marcas de resistência a antibióticos ou vetores plasmidiais.

Nesta proposta são apresentados os resultados e as discussões sobre a avaliação de risco da linhagem Celere-2L, cuja aplicação é restrita a processos industriais dedicados à produção de etanol celulósico. Neste contexto, a única característica atribuída ao OGM, ou seja, que o diferencia de seu parental, é a capacidade de converter o açúcar xilose em etanol. Esta nova função foi obtida pela integração estável de um único gene exógeno no genoma de *S. cerevisiae* e pela alteração na expressão de genes endógenos relacionados ao metabolismo da xilose.

A levedura *S. cerevisiae* (parental) é um micro-organismo ubíquo e sua segurança é notoriamente conhecida. Da mesma forma, o organismo doador do transgene é um fungo não patogênico que estabelece uma relação de simbiose com seu hospedeiro. Ambos não possuem histórico de patogenicidade ou efeitos adversos aos seres humanos, animais ou ao meio ambiente e, por essas razões, pertencem à classificação de risco I. Adicionalmente, o produto

do único transgene é amplamente utilizado na indústria de alimentos e não há relatos de efeitos adversos à saúde. Assim, potenciais riscos à saúde humana ou animal devem ser desconsiderados.

A produção industrial de etanol, por sua vez, possui invariavelmente diversas etapas que promovem a inativação das leveduras empregadas no processo. Destacam-se a assepsia dos equipamentos e a etapa de destilação, imprescindível para a recuperação do etanol. Estas e outros procedimentos pós-fermentação promovem a completa inativação das células e, por essa razão, contribuem significativamente para a segurança do processo.

Em relação aos riscos ambientais, diversas análises apresentadas neste documento demonstraram que as modificações genéticas empregadas no desenvolvimento da linhagem OGM não alteraram a capacidade de dispersão, reprodução, tolerância ao dessecamento ou resistência a diferentes agentes esterilizantes em relação ao seu parental. Especialmente a exposição a diferentes temperaturas demonstrou que ambas as linhagens são desvitalizadas em temperatura e tempo inferiores ao aplicado na destilação industrial. Estes resultados reforçam a prerrogativa de que a etapa de destilação é suficiente para inativar completamente as leveduras *in loco* (i.e., no interior do processo), garantindo que os produtos e subprodutos da indústria não contenham formas viáveis do OGM.

Efeitos negativos sobre a qualidade da água ou do solo também não foram observados quando estas matrizes foram avaliadas por três abordagens complementares: i) ensaio de toxicidade sobre organismos indicadores; ii) análise das propriedades físicas e químicas e; iii) análise dos efeitos sobre a microbiota nativa. Prejuízos para a qualidade do ar também são desconsiderados uma vez que o OGM não é capaz de produzir e nem se comporta como um poluente.

Embora seja capaz de esporular, os riscos ambientais relacionados à disseminação do transgene, dispersão ou resistência ao dessecamento são insignificantes. Em parte pela ausência de estruturas de dispersão especializadas, como também pelo fato do OGM e parental serem altamente suscetíveis a curtos períodos de exposição ao dessecamento.

Por fim, a capacidade de sobrevivência em ambientes naturais também foi avaliada e os resultados foram equivalentes para ambas as linhagens. Tanto o OGM quanto o parental

possuem baixa capacidade de sobrevivência em água. No solo, a habilidade de consumir xilose não conferiu vantagens adaptativas ao OGM em relação ao seu parental ou à microbiota natural.

Em resumo, o uso pretendido para a linhagem Celere-2L acrescenta diversas características que favorecem o desenvolvimento de uma linhagem segura. Além do processo incluir indiretamente diferentes etapas que promovem a inativação do OGM *in loco*, a demanda pelo consumo da xilose por meio do micro-organismo em questão pode ser obtida pela adição de apenas um transgene, cujo produto da expressão (neste caso) é amplamente aplicado na indústria de alimentos. Outra característica favorável é uso da levedura *S. cerevisiae* como organismo receptor. Pelo fato de ser um dos micro-organismos mais bem estudados, permite que as manipulações sejam feitas de forma racional e direcionada, eliminando os riscos associados à falta ou à limitação de ferramentas de engenharia genética. Explica também, a ausência de fenótipos não previstos e a equivalência entre OGM e seu parental nos testes que não se remeteram diretamente ao consumo da xilose.

Em conjunto, o organismo receptor, a origem do transgene, o uso pretendido e todos os resultados obtidos durante a avaliação de risco permitem concluir que a linhagem Celere-2L não é potencialmente causadora de efeitos adversos sobre a saúde humana, animal ou ao meio ambiente.



EM BRANCO

Proposta de Liberação Comercial

Saccharomyces cerevisiae

Linhagem Celere-2L



UNIDADE II

(Relatório de Avaliação de Risco – Parte I)

1. *Informações relativas ao OGM*
2. *Avaliação de risco à saúde humana e animal*
3. *Avaliação de risco ao meio ambiente*

Proyecto de Ley Orgánica

del Poder Judicial
de la Nación

Artículo 1º

El Poder Judicial de la Nación
se ejercerá por un
Presidente y un
Jefe de Sala.

Artículo 2º

Artículo 3º

CONSIDERAÇÕES SOBRE O FORMATO DA PROPOSTA



Esta proposta foi construída respeitando todas as exigências previstas na Resolução Normativa N°5, de 12 de março de 2008. No entanto, como objetivo de tornar a leitura mais agradável e fluente, as informações que se referem diretamente ao OGM (exceto as confidenciais), foram agrupadas em duas grandes unidades: II e III. Juntas, estas Unidades são referidas como relatório de avaliação de risco.

A Unidade II (págs. 33 a 144) inclui todas as informações relativas ao OGM bem como os resultados e as discussões relevantes para a sua análise de risco à saúde humana, animal ou ao meio ambiente. Em relação aos métodos experimentais, apenas os procedimentos necessários para compreensão dos resultados são mencionados.

A Unidade III ou anexos (págs. 145 a 354) inclui toda informação suplementar e metodológica em detalhes, para ser consultada sempre que necessário. Nesta seção, são encontradas figuras e tabelas suplementares, relatórios de ensaios realizados por empresas e instituições especializadas e toda referência bibliográfica citada na proposta.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

THE
OFFICE
OF
THE
ATTORNEY
GENERAL

Proposta de Liberação Comercial

Saccharomyces cerevisiae

Linhagem Celere-2L



1. Informações Relativas ao OGM

RN-5 | Anexo II

[illegible]

1.1. A identificação do evento de transformação genética, objetivo e utilização do OGM e seus derivados

O evento Celere-2L descrito neste relatório é uma levedura diplóide da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, desenvolvida a partir da linhagem selvagem Pedra-2 (PE2). Este OGM possui um único gene exógeno (*xyIA*) derivado de um fungo anaeróbico não patogênico. Ambos os micro-organismos, hospedeiro e doador, pertencem a classe de risco 1.

O transgene possui como única função a de codificar a enzima Xilose isomerase que catalisa a conversão do açúcar xilose em xilulose. Este é convertido em etanol através de reações sucessivas que compreendem as vias das pentoses fosfato, glicolítica e fermentativa.

Outras modificações genéticas incluem o aumento da expressão dos genes endógenos *XKS1* (*XyluloKinaSe 1*), *TAL1* (*TransALdolase 1*), *TKL1* (*TransKetoLase 1*), *RKI1* (*Ribose-5-phosphate Ketol-Isomerase 1*) e *RPE1* (*Ribulose 5-Phosphate Epimerase 1*), e deleção permanente do gene *GRE3*. Todas relacionadas à conversão de xilose a etanol. *URA3* (*URAcil 3*) e *LEU2* (*LEUcin 2*) foram transitoriamente deletados e utilizados como marcadores de seleção auxotrófica nos procedimentos de transformação (detalhes são apresentados na seção 1.8 pág. 51).

A utilização deste OGM se restringe a processos industriais de produção de etanol de segunda-geração, ou seja, a partir da fermentação de açúcares derivados da hidrolise da biomassa vegetal. A linhagem Celere-2L possui como única característica que a distingue de seu parental a capacidade de consumir o açúcar xilose, disponibilizado em abundância por diferentes métodos de processamento da biomassa (detalhes na seção 3, pág. 93).

EM BRANCO

1.2. Classificação taxonômica, a partir de família, até o nível mais detalhado do organismo a ser liberado, incluindo, quando apropriado, subespécie, cultivar, patovar, estirpe e sorotipo



A linhagem Celere-2L pertence à família: Saccharomycetaceae; gênero: *Saccharomyces*; espécie: *Saccharomyces cerevisiae*^{1,2}. Subespécie, cultivar, patovar, estirpe ou sorotipo não se aplicam à sistemática desta linhagem. Adicionalmente, táxons superiores são apresentados a título de ilustração:

Domínio: Eukaryota

Reino: Fungi

Sub-reino: Dikarya

Filo: Ascomycota

Sub-filo: Saccharomycotina

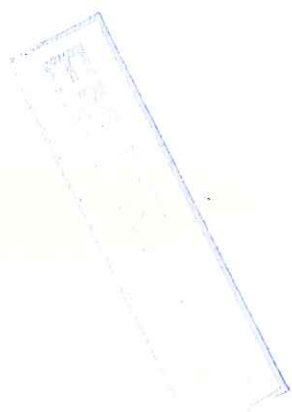
Classe: Saccharomycetes

Ordem: Saccharomycetales

Família: Saccharomycetaceae

Gênero: *Saccharomyces*

Espécie: *Saccharomyces cerevisiae*



1.3. O gene introduzido, organismo de origem e sua função específica



TÓPICO CONTENDO INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS: esta informação faz parte de um pedido de patente em elaboração que visa proteger, principalmente, **o processo de desenvolvimento da linhagem Celere-2L, o micro-organismo contendo o transgene *xyIA* e seu uso.** A origem do transgene, ou seja, o **organismo doador, remete diretamente à sequência do gene *xyIA*,** utilizada na modificação genética do micro-organismo objeto de proteção. Por essa razão, esta é considerada uma informação sensível que, se divulgada, poderá ser utilizada como anterioridade, inviabilizando o deferimento da patente.

W. BRANCO

1.4. O vetor utilizado e seu espectro de hospedeiros

Todos os eventos de transformação definitivos se deram pela recombinação homóloga de cassetes de expressão lineares (**sem vetor**). Estes foram montados no plasmídeo comercial pRS304^a previamente linearizado com a enzima de restrição *Bam*HI (Figura 1; método 4.5, pág. 149).

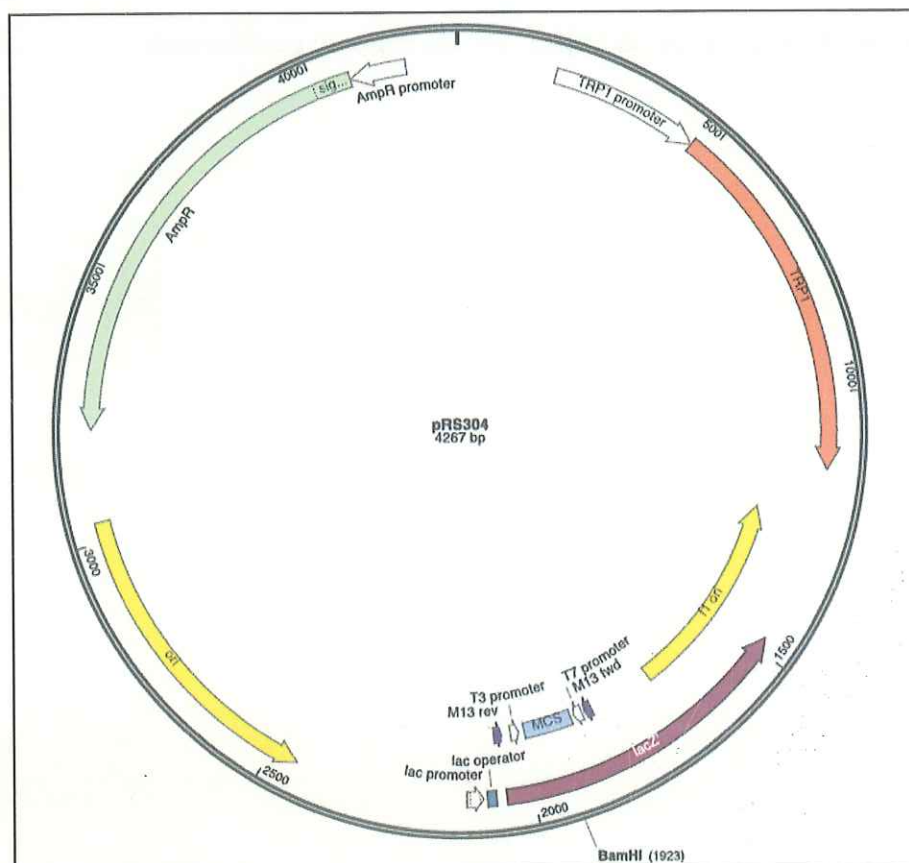


Figura 1: Mapa do vetor pRS304.

Plasmídeo utilizado para montar os cassetes de expressão inseridos na linhagem Celere-2L. É importante notar que esta foi sua única aplicação e que este foi inserido apenas em *E. coli* (linhagem DH10 β), como parte do procedimento utilizado para a montagem dos cassetes (método 4.5, pág. 149).

É importante notar que o uso deste vetor foi restrito à etapa de montagem das construções que antecede e é independente do procedimento de transformação. Para isto, utilizou-se apenas *Escherichia coli* (linhagem de laboratório DH10 β ^b) como hospedeiro. Cada construção foi amplificada por PCR e o produto da reação foi purificado e utilizado na transformação.

^apRS304. Como referência a AddGene pode ser consultada. Detalhes em: <http://www.addgene.org>.

^bCepa comercial, não patogênica, e amplamente utilizada em procedimentos de biologia molecular. Detalhes em: <https://www.lifetechnologies.com>.

O vetor pCRE^c contendo a região codificadora para a enzima Cre-Recombinase foi o único plasmídeo inserido na Celere-2L. No entanto, é importante destacar que a transformação com este plasmídeo foi **transitória**, apenas para expressar de forma **transiente** da enzima Cre-Recombinase, utilizada apenas para o resgate de marcadores de seleção (detalhes na seção 1.8 pág. 51). Este plasmídeo tem como hospedeiro a levedura *S. cerevisiae* e cepas de *E. coli* utilizadas em laboratório apenas para sua multiplicação. Os detalhes sobre o mapa e a sequência deste vetor são apresentados na seção 1.9 do material confidencial.

^cpCRE. Como referência a AddGene pode ser consultada. Detalhes em: <http://www.addgene.org>.



1.5. O mapa genético utilizado no processo de transformação (transgene/vetor), indicando as regiões que especificam função - promotores, elementos reguladores em *cis*, genes marcadores de seleção e origem de replicação

TÓPICO CONTENDO INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS: as informações referentes ao mapa genético utilizado no processo de transformação, bem como as sequências nucleotídicas, fazem parte de um pedido de patente em elaboração. Este visa proteger, principalmente, **o processo de desenvolvimento da linhagem Celere-2L, o micro-organismo contendo o transgene *xyIA* e seu uso.**

Os mapas genéticos de todas as construções utilizadas no desenvolvimento do OGM são apresentados juntamente com as sequências nucleotídicas e flanqueadoras no item 1.9 do material confidencial.

EMERACO

1.6. O resumo das construções para obtenção do OGM



TÓPICO CONTENDO INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS: as construções utilizadas no desenvolvimento do OGM incluem a combinação de regiões codificadoras e regulatórias que fazem parte de um pedido de patente em elaboração. Este visa proteger, principalmente, o processo de desenvolvimento da linhagem Celere-2L, o micro-organismo contendo o transgene *xyIA* e seu uso.

Todas as construções utilizadas no desenvolvimento do OGM são apresentadas em detalhes juntamente com as sequências nucleotídicas e flanqueadoras no item 1.9 do material confidencial.

ES
BRANCO

1.7. A classificação de risco do organismo geneticamente modificado de acordo com a Resolução Normativa n.º 2, de 27 de novembro de 2006



A Resolução Normativa Nº 2 de 27 de novembro de 2006 classifica como Classe de Risco I (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade) “o OGM que contém sequências de ADN/ARN de organismo doador e receptor que não causem agravos à saúde humana e animal e efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente”,

De acordo com a lista publicada pelo Ministério da Saúde^d, ambos os organismos, hospedeiro e doador, não pertencem à classificação de risco II, III ou IV. A segurança de *S. cerevisiae* (parental) é notoriamente conhecida e descrita a seguir. Da mesma forma, o organismo doador é um fungo não patogênico que estabelece uma relação de simbiose com seu hospedeiro (i.e., animais ruminantes) (detalhes na seção 1.3 do material confidencial). Além disso, é importante destacar que a enzima Xilose isomerase (produto do único transgene) é amplamente utilizada na indústria de alimentos e não há relatos de efeitos adversos à saúde humana ou animal (seção 1.10 pág. 61). Por essas razões, é factível classificar a linhagem Celere-2L como Classe de Rico I: baixo risco individual e coletivo.

Biologia e histórico da *S. cerevisiae* (organismo parental):

Devido a sua ampla aplicação na indústria alimentar (bebidas e pães) e farmacêutica há centenas de anos, a levedura *S. cerevisiae* é enquadrada na classificação GRAS (sigla do termo em inglês (*Generally Recognized As Safe*) e, por essa razão, não possui restrição para o consumo humano de acordo com agência americana *Food and Drug Administration* (FDA)^e.

S. cerevisiae é um micro-organismo eucarionte unicelular. Curiosamente, a linhagem de laboratório S288c foi o primeiro eucarioto a ter o genoma sequenciado, revelando uma estrutura composta por aproximadamente 6000 genes distribuídos em 16 cromossomos³. Devido ao reduzido tamanho de seu genoma (12 milhões de pares de bases) e a facilidade de manipulação, este micro-organismo se tornou um importante organismo modelo para diferentes áreas de pesquisa⁴.

^dMinistério da Saúde. Detalhes em: <http://portalsaude.saude.gov.br>.

^e*Food and Drug Administration*. Detalhes em: <http://www.fda.gov>.

Além das aplicações como modelo biológico, esta espécie é utilizada em uma variedade de processos biotecnológicos que envolvem a fermentação; habilidade descrita em 1860 por Louis Pasteur. Apesar do conhecimento bioquímico deste processo ser relativamente recente, há milhares de anos a humanidade explora a capacidade fermentativa das leveduras como um modo de preservar a qualidade de bebidas e alimentos. Não há registros precisos de quando o homem começou a adicionar intencionalmente leveduras selecionadas para fabricação de pão, cerveja ou vinho, mas as primeiras evidências da ocorrência da fermentação datam do período Neolítico^{5,6}.

Atualmente, sua aplicação na fermentação alcoólica vem ganhando uma grande notoriedade mundial, não apenas pela importância na indústria de bebidas (vinho, saquê, cerveja, cachaça, entre outros), mas principalmente como fonte de combustíveis renováveis como o bioetanol. Como descrito anteriormente, a possibilidade de utilizar também a biomassa vegetal vem se mostrando economicamente viável após muitos anos de pesquisa. Neste contexto, estima-se que cada vez mais linhagens geneticamente modificadas serão desenvolvidas para consumir o açúcar xilose.

Em relação à saúde humana e animal, as leveduras da espécie *S. cerevisiae* não representam riscos por não produzirem toxinas ou possuírem fatores de virulência. Apesar da grande exposição (especialmente de trabalhadores) esta espécie possui um histórico extremamente limitado de efeitos adversos de acordo com o *Final Risk Assessment of S. cerevisiae* (USA/EPA). Casos raros incluíram pacientes severamente imunocomprometidos, sem que estes fatos isolados tenham levado a qualquer restrição de uso alimentar ou industrial ao longo de muitas décadas^f.

Riscos ambientais também são desconsiderados para esta espécie, uma vez que a *S. cerevisiae* é um micro-organismo extremamente ubíquo, encontrado em uma grande variedade de ambientes como, por exemplo, no solo. Diferentes linhagens já foram isoladas de várias plantas, incluindo uma grande variedade de uvas e exsudado de carvalhos⁷⁻¹². A linhagem parental utilizada no desenvolvimento da Celere-2L, por exemplo, é uma levedura que habita a

^fUnited States Environmental Protection Agency (EPA). *Final risk assessment of S. cerevisiae*. Detalhes em: <http://www.epa.gov>.

cana-de-açúcar e foi naturalmente selecionada no ambiente industrial por possuir boas qualidades fermentativas¹³.



Como outros fungos, este é um micro-organismo séssil, porém, que não forma hifas ou apresenta estruturas especializadas para a dispersão de esporos como, por exemplo, basidiocarpos, ascocarpos e conidióforos. Por essa razão, sua dispersão é limitada e ocorre principalmente pela interação com insetos^{12,14}.

Embora seja capaz de esporular, este evento se dá por um mecanismo passivo que inclui apenas a ruptura do asco contendo quatro células haplóides. Os esporos de *S. cerevisiae* não são estruturas de resistências e, assim como a célula diplóide, são suscetíveis a temperaturas (mesmo moderadas) e a outros estresses como o dessecação. Além disso, as células são facilmente inativadas por agentes esterilizantes rotineiramente utilizados em laboratórios de microbiologia e ambientes hospitalares como o etanol e o hipoclorito de sódio¹⁴.

LEIPZIG

1.8. Os métodos utilizados para a modificação genética

A engenharia genética da linhagem Celere-2L foi baseada em quatro etapas: i) montagem das construções; ii) transformação com cassetes lineares (fragmentos de DNA amplificados por PCR); iii) integração gênica por recombinação homóloga e; iv) resgate dos marcadores (Figura 2).

Os procedimentos que envolveram a transformação da linhagem foram realizados de acordo com o método proposto por Gietz e Woods (2001) (Método 4.2 pág. 147). Resumidamente, inclui o preparo de células competentes, a incubação destas com o DNA de interesse, seguido do tratamento químico (PEG 4000) e choque térmico (15min a 42°C e 2min no gelo). Transformantes são selecionados em meios de cultura específicos.

Ao contrário da maioria dos organismos de interesse biotecnológico, as leveduras da espécie *S. cerevisiae* possuem um mecanismo de recombinação homóloga mitótica que possibilita sua transformação com construções de DNA lineares¹⁵⁻¹⁸. O mais interessante deste mecanismo é que as integrações são direcionadas a regiões específicas pré-determinadas, cujas sequências homólogas são posicionadas nas extremidades da construção que será utilizada durante sua montagem (Figura 2A-B). Do ponto de vista regulatório, esta é uma alternativa ainda mais interessante pois: i) evita o uso de vetores plasmidiais ou outras sequências replicativas; ii) possibilita o resgate de genes marcadores utilizados para seleção de transformantes e; iii) as construções são integradas no genoma de forma estável, específica e em posições conhecidas e pré-estabelecidas.

Para o resgate dos genes marcadores, foi utilizado o sistema Cre-Recombinase/LoxP^{19,20}. Cre-Recombinase é uma proteína monomérica que reconhece uma sequência específica de DNA conhecida como LoxP. Um sítio LoxP consiste em uma sequência assimétrica de 8 pares de base (sublinhadas) que separa duas extremidades repetidas e invertidas de 13 pares de base (ATAACTTCGTATAGCCATACATTTATACGAAGTTAT). Seu uso como ferramenta de manipulação genética é devido ao fato desta ser uma sequência inerte (não traduzida) e pela simplicidade do sistema de recombinação, que não requer proteínas acessórias. Enzimas Cre-Recombinase (monômeros) reconhecem dois sítios LoxP próximos e promovem a recombinação destes, excisando a sequência de DNA encontrada entres os dois sítios (Figura 2C). Além de *S.*

cerevisiae, este sistema é amplamente utilizado como ferramenta genética para estudos em ratos²¹, camundongos²², *Drosophila ssp.*²³, entre outros²⁴.

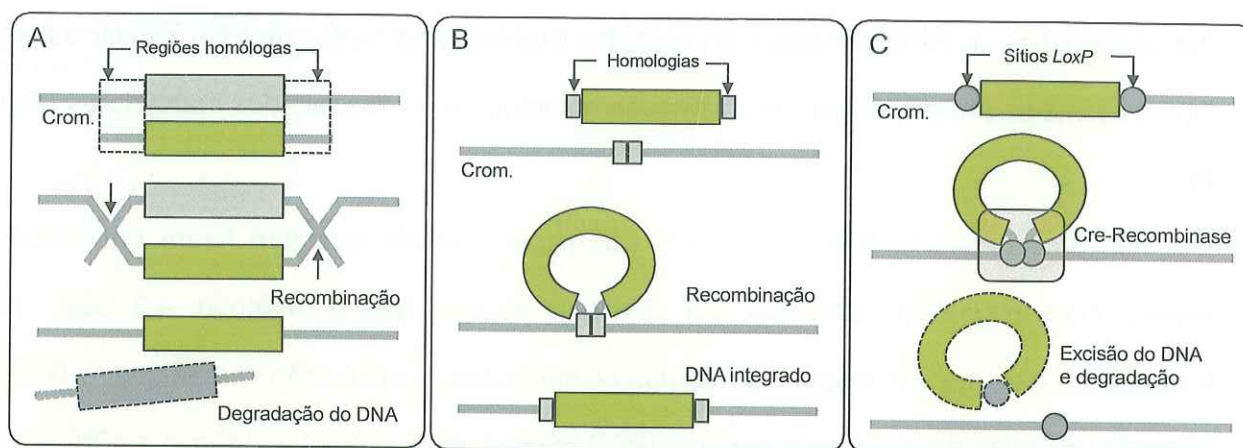


Figura 2: Representação esquemática dos métodos utilizados para as modificações genéticas.

A: Recombinação homóloga entre um cassete linear e o cromossomo resultando na substituição da sequência original. B: Recombinação homóloga resultando na inserção do cassete linear. Note que ambas as recombinações ocorrem entre sequências de DNA homólogas. Estas são previamente determinadas e utilizadas como sequências flanqueadoras dos cassetes lineares. C: Sistema Cre-Recombinase/LoxP. Regiões flanqueadas por sítios LoxP são excisadas quando a enzima Cre-Recombinase é expressa. Sistema utilizado para o resgate de genes marcadores de seleção. Crom.: cromossomo.

Quando necessário, a linhagem Celere-2L foi transformada com a construção pCRE para o uso do sistema Cre-Recombinase/LoxP. É importante notar que a expressão da enzima Cre-Recombinase é transiente (i.e., sem integração do gene no genoma) e induzida por galactose, uma vez que o gene é controlado pelo promotor *Gal1p*. Após a excisão da marca desejada, o plasmídeo contendo o sistema é facilmente perdido após o cultivo da linhagem em meio sem o antibiótico (Método 4.3 pág. 148).

Para facilitar a compreensão, as etapas de desenvolvimento da Celere-2L são descritas a seguir. Incluem: i) montagem dos cassetes de expressão; ii) domesticação da linhagem parental; iii) deleção do gene *GRE3*; iv) aumento da expressão de genes endógenos e; v) inserção do transgene.

Etapas de desenvolvimento da linhagem Celere-2L

A linhagem parental diplóide foi adquirida por meio do CBMAI (Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria⁹) (CBMAI-0959; PE2). Esta foi cultivada em meio apropriado

⁹CBMAI - Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria. Detalhes em: <http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cbmai>.

para a esporulação e um haplóide *mating type* α (alfa) foi arbitrariamente escolhido como plataforma. Para facilitar a compreensão, detalhes metodológicos como, por exemplo, meios de cultura e protocolos de transformação são apresentados em anexo (seção 4 pág. 147).



i) Montagens das construções genéticas:

Todas as construções utilizadas no desenvolvimento da linhagem Celere-2L foram montadas no plasmídeo pRS304, utilizando o método descrito por Gibson²⁵ (Método 4.5, pág. 149; exceto as construções pCRE e GEN detalhadas a seguir).

Os códons do transgene *xyIA* foram otimizados para *S. cerevisiae* e esta sequência foi sintetizada por uma empresa especializada^h. Regiões codificadora e regulatórias endógenas foram amplificadas a partir do DNA da linhagem parental (Método 4.4, pág. 148).

É importante notar que nos procedimentos de transformação foram utilizadas construções lineares, amplificadas a partir da montagem feita no plasmídeo pRS304. Apenas a expressão da enzima Cre-Recombinase foi feita pela transformação transiente da construção pCRE (i.e., sem integração no genoma) (Método 4.3, pág. 148).

ii) Domesticação:

A domesticação consiste na obtenção de uma linhagem otimizada para o processo de transformação genética, ou seja, que possua um bom sistema de seleção de transformantes. Genes de resistência a antibióticos são normalmente utilizados como marcadores, porém, no desenvolvimento da linhagem Celere-2L optou-se pelo uso de marcas auxotróficas, abordagem tradicionalmente utilizada em trabalhos com *S. cerevisiae*. Esta estratégia incluiu a deleção dos genes *URA3* (*URAcil 3*) e *LEU2* (*LEUcin 2*) para obtenção de uma linhagem cujo crescimento é dependente (i. e., auxotrófica) dos aminoácidos uracila e leucina, devido à incapacidade de sintetizá-los. Quando associados a uma construção genética, ambos os genes podem ser utilizados como marcadores na seleção de transformantes, criando uma condição onde os clones

^hDNA2.0. Detalhes em: www.dna20.com

positivos recuperam a capacidade de crescer na ausência de uracila ou leucina, devido ao restabelecimento da capacidade de sintetizar estes aminoácidos.

Como demonstrado na figura 3A e E, a domesticação foi realizada em dois momentos. Inicialmente, o gene *URA3* foi substituído pela construção GEN. Em seguida, esta construção contendo o gene de resistência ao antibiótico higromicina foi resgatada, por meio da expressão transiente da construção pCRE (Método 4.3 pág. 148). Clones positivos foram selecionados e confirmados para a ausência de resistência. Estes foram utilizados para as modificações subsequentes sem o emprego de genes de resistência a antibióticos como marcadores. No segundo momento, o gene *LEU2* foi substituído pela construção *URA3*, gerando ao mesmo tempo a auxotrofia a leucina e revertendo a dependência de uracila (Figura 3E).

iii) Deleção do gene *GRE3*:

O gene *GRE3* foi deletado para aumentar o rendimento produtivo de etanol. Este codifica uma enzima com atividade aldose redutase (EC 1.1.21)ⁱ, que converte inespecificamente a xilose em xilitol. Adicionalmente, o xilitol inibe a atividade de Xilose isomerases e, por essas razões, diminui significativamente a produção de etanol a partir da xilose²⁶. *GRE3* foi substituído pela construção *URA3*. Após a seleção de transformantes, a construção *URA3* foi resgatada através da expressão transiente da construção pCRE (Figura 3B).

ⁱEC Number. Enzyme Nomenclature. Detalhes em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>.

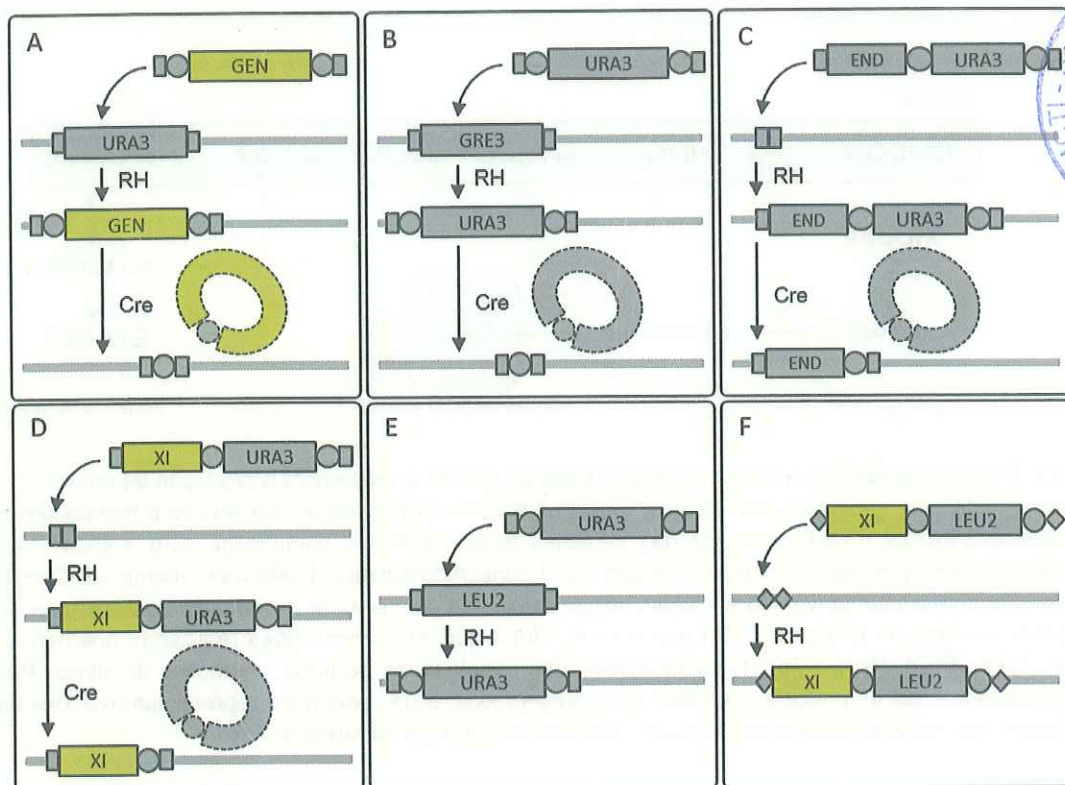


Figura 3: Resumo das etapas de desenvolvimento do OGM.

Cre: Enzima Cre-Recombinase. RH: Recombinação homóloga. XI: Xilose isomerase. END: genes endógenos. Em verde: construções contendo genes exógenos. Cinza: modificações de genes endógenos. A: Deleção do gene *URA3*. Este é substituído pela construção HIGRO que confere resistência ao antibiótico higromicina. Notar que após a deleção, a marca de resistência é retirada através da expressão transitente da enzima Cre-Recombinase. Este é o único procedimento que utiliza marca de resistência a antibiótico para seleção de transformantes. Nas etapas seguintes o gene *URA3* é utilizado como marcador auxotrófico de seleção. B: Deleção do gene *GRE3*. Este é substituído pela construção *URA3*, que é resgatada após expressão transitente da enzima Cre-Recombinase. C: Aumento da expressão de genes endógenos. Uma cópia de cada gene endógeno *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1* e duas cópias do gene endógeno *XKS1*, foram inseridas no genoma por recombinação homóloga seguida do resgate da construção *URA3* após a seleção de clones positivos. D: Inserção do transgene *xylA* em região específica do cromossomo V. E: Deleção do gene *LEU2* e restauração da auxotrofia a uracila. Notar que nesta etapa a construção *URA3* não é resgatada. F: Inserção do transgene *xylA* em região específica de *Ty1Δ*. as modificações foram feitas por integração estável através da recombinação homóloga entre as construções e posições do genoma previamente definidas.

iv) Aumento da expressão de genes endógenos

A eficiência da conversão de xilose em etanol é dependente da expressão de cinco genes endógenos chave: *XKS1* (*XyluloKinaSe 1*), *TAL1* (*TransALdolase 1*), *TKL1* (*TransKetoLase 1*), *RKI1* (*Ribose-5-phosphate Ketol-Isomerase 1*) e *RPE1* (*Ribulose 5-Phosphate Epimerase 1*). *XKS1* codifica a enzima Xiluloquinase (EC 2.7.1.17)^j que converte a xilulose em xilulose-5P, metabólito precursor da via das pentose fosfato (PPP)²⁷⁻³⁰, onde *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* e *RPE1* convertem D-xilulose-5P em frutose-6-fosfato (F6P) ou em gliceraldeído-3-fosfato (G3P). Na via glicolítica, F6P e G3P são convertidos em piruvato, precursor do etanol (Figura 4).

^jEC Number. Enzyme Nomenclature. Detalhes em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>.

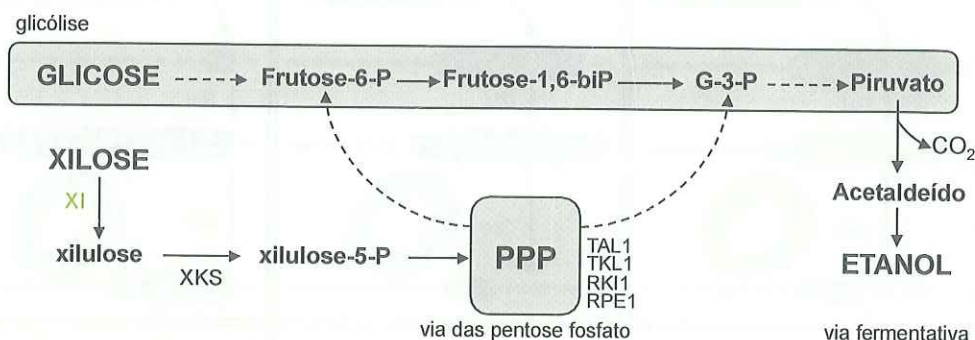


Figura 4: Representação esquemática do metabolismo de glicose e xilose para a produção de etanol. Pela via glicolítica a glicose é convertida a piruvato. A xilose é convertida em frutose-6-fosfato (Frutose-6-P) ou gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) pela via das pentoses fosfato (PPP) e compartilha com a glicose as etapas de conversão destes a piruvato. O piruvato, por sua vez, é convertido em etanol pela via fermentativa. O metabolismo da xilose se inicia pela sua conversão a xilulose, etapa catalisada pela enzima Xilose isomerase (XI), produto do único transgene presente na linhagem OGM (gene *xylA*). Notar que as manipulações realizadas nos genes endógenos (*XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* e *RPE1*) estão diretamente relacionadas ao fluxo metabólico da xilose. Para facilitar a compreensão apenas as principais reações são apresentadas. Setas contínuas representam reações diretas; setas pontilhadas representam passos que incluem mais que uma reação metabólica.

O aumento da expressão destes genes foi obtido por meio da adição de novas cópias, contendo regiões codificadoras fusionadas a promotores mais fortes/constitutivos e terminadores mais estáveis. Todas as sequências codificadoras, promotoras e terminadoras são derivadas da própria linhagem parental e foram amplificadas por PCR (Método 4.4, pág. 148). A inserção de cada nova cópia (construção END-URA3) foi feita sucessivamente pela recombinação homóloga na posição específica do genoma e subsequente resgate do marcador auxotrófico em clones positivos (construção URA3, Figura 3C).

v) Inserção do transgene.

Duas abordagens foram utilizadas na inserção do único gene exógeno. No primeiro evento de transformação a construção XI-URA3 foi inserida em posição previamente determinada do cromossomo 5 (apresentada em detalhes na seção 1.9 do material confidencial). Novamente, o marcador (construção URA3) foi resgatado pela expressão transiente da construção pCRE (Figura 3D). Como descrito anteriormente, após esse passo a construção URA3 foi inserida na posição do gene *LEU2* para gerar uma nova marca auxotrófica e restaurar a anterior (Figura 3E).

É bem conhecido que altos níveis de atividade de uma proteína em um sistema heterólogo depende, normalmente, da região promotora que controla a expressão do gene que codifica para tal. Para a Xilose isomerase, entretanto, níveis de atividades adequados são obtidos apenas quando se tem um alto número de cópias do gene que codifica esta enzima³¹.

Em *S. cerevisiae* é possível introduzir um alto número de cópias de um determinado gene utilizando vetores de expressão apropriados, contendo genes para resistência à antibióticos ou marcadores auxotróficos como, por exemplo, os vetores derivados da série pRS³². Na indústria, no entanto, a manutenção de condições de cultivo seletivas (presença de antibióticos ou meios sintéticos definidos) é normalmente impraticável devido aos altos custos do antibiótico ou da fonte de matéria-prima. Dessa forma, a utilização de vetores traz sérios problemas intrínsecos à sua instabilidade em meios não seletivos, levando à perda da informação genética (gene de interesse) após sucessivas divisões celulares.

Por essa razão, a segunda abordagem compreendeu a inserção de outras cópias do transgene. Assim como a primeira integração, as cópias adicionais foram inseridas em locais específicos, utilizando como sequência flanqueadora uma região presente em múltiplas cópias no genoma. A estratégia utilizada foi descrita em 2006 por Guerra e colaboradores³³ e consiste no uso de sequências flanqueadoras homólogas à região repetitiva Ty1Δ (delta) (construção Ty-XI-LEU2-Ty). Esta é a sequência repetitiva melhor caracterizada em *S. cerevisiae*, presente em 217 posições conhecidas do genoma³⁴⁻³⁷. Esta abordagem possibilita a recombinação do cassete com algumas destas posições, promovendo um maior número de integrações no genoma em um único evento de transformação.

Transformantes foram selecionados em meio apropriado e avaliados quanto a capacidade de converter xilose em etanol. O evento com melhor desempenho fermentativo foi selecionado e o número de inserções do gene *xyIA* foi posteriormente analisado por meio do sequenciamento genômico da linhagem e pela quantificação por qPCR (detalhes na seção 4.8, pág. 150).

É importante notar, que todos os eventos de transformação foram realizados em leveduras haplóides *mating type* α (alfa). Dessa forma, a última etapa de desenvolvimento foi a obtenção do diplóide Celere-2L, por meio do cruzamento da linhagem geneticamente modificada com um haplóide *mating type* a selvagem gerando, conseqüentemente, o diplóide *mating type* a/α.

EM BRANCO



1.9. Caracterização molecular do inserto no organismo receptor, fornecendo informações relacionadas a: (1) número de cópias inseridas; (2) localização do inserto no genoma, quando possível; (3) sequências flanqueadoras do gene; (4) sequência nucleotídica do transgene inserido no OGM, indicando os elementos reguladores presentes – promotores, elementos reguladores em *cis*, sítios de poliadenilação, íntrons e éxons e região de terminação da transcrição.

TÓPICO PARCIALMENTE CONFIDENCIAL: a sequência do transgene, as sequências flanqueadoras e as combinações entre regiões regulatórias (promotores e terminadores) e codificadoras constituem diferentes reivindicações de um pedido de patente em elaboração. Este visa proteger, principalmente, **o processo de desenvolvimento da linhagem Celere-2L, o micro-organismo contendo o transgene *xyIA* e seu uso.** Por essa razão, são apresentadas no item 1.9 do material confidencial. Informações referentes ao número de cópias do transgene não são confidenciais e são descritas em detalhes a seguir.

O sequenciamento do genoma e a quantificação por qPCR foram as abordagens utilizadas para quantificar o número de cópias do transgene *xyIA* na linhagem Celere-2L. Para o sequenciamento, os principais procedimentos incluíram: i) a extração do DNA total (Método 4.9, pág. 151) e ii) o sequenciamento utilizando a tecnologia Miseq (Illumina)³⁸⁻⁴⁰. Os dados foram analisados pela equipe de bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão da Universidade Estadual de Campinas (Método 4.20, pág.156).

A partir da montagem e análise do genoma foram preditos os genes e a estrutura parcial do genoma da linhagem Celere-2L. A partir destas informações, trinta e oito cópias do gene *xyIA* foram identificadas (Tabela S 1, pág. 169). Uma cópia encontra-se inserida no cromossomo cinco, próximo ao centrômero, enquanto as trinta e sete restantes estão inseridas de forma estável em regiões Ty1Δ específicas.

É importante ressaltar que a metodologia de transformação utilizada, empregando o elemento Ty1Δ, teve como objetivo obter o maior número de inserções para maximizar a expressão do gene *xyIA*; e que estas inserções ocorrem exclusiva e especificamente nos elementos Ty1Δ presentes no genoma (dirigida pelo mecanismo de recombinação homóloga). Desta forma, não há possibilidade de ocorrer inserções em locais indesejados, premissa

confirmada pelo sequenciamento genômico da linhagem.

O número de cópias encontrado pelo sequenciamento foi confirmado por qPCR. Em resumo, este procedimento incluiu: i) extração de DNA da linhagem OGM (Método 4.9, pág. 151); ii) construção da curva padrão utilizando uma sequência cópia única como referência (Figura S 8, pág. 166; iii) amplificação e cálculo do número de cópias do gene *xyIA* (método 4.8, pág. 150).

As sequências flanqueadoras e todas as construções também foram confirmadas pelo sequenciamento e são detalhadas no material confidencial (item 1.9). Como apresentado na seção 1.1, foram utilizadas duas construções genéticas para integração direcionada do gene *xyIA*. As integrações foram feitas por recombinação homóloga e, por essa razão, as sequências que flanqueiam o inserto são iguais às utilizadas nas construções.

Adicionalmente, são apresentados também os mapas e as sequências de todas as construções utilizadas para aumento da expressão dos genes *XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* e *RPE1*.

1.10. O produto da expressão do gene inserido no organismo receptor, descrito em detalhes



O produto do transgene *xylA* é a enzima denominada Xilose isomerase (XI) (EC 5.3.1.5). Esta catalisa a reação reversível de xilose a xilulose (Figura 5), mas também tem sido foco de pesquisa por realizar a isomerização de glicose e frutose. Por esse motivo, é uma das enzimas mais utilizadas industrialmente e aplicada em larga escala na produção de xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS – *High Fructose Corn Syrup*)⁴¹.

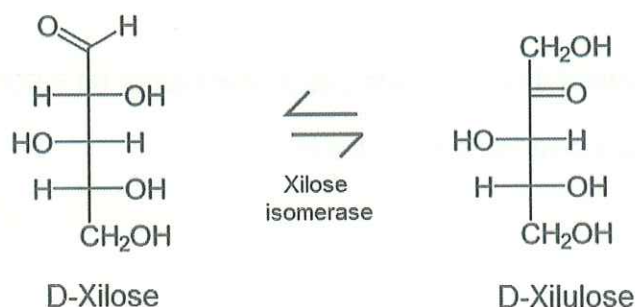


Figura 5: Isomerização reversível de D-xilose a D-xilulose, catalisada pela enzima Xilose isomerase.

A descoberta por Marshall e Kooi em 1957 de uma enzima isolada de *Pseudomonas hydrophila* capaz de realizar a isomerização de glicose, foi o ponto de partida para a exploração dessa enzima na produção de HFCS. Apesar da afinidade dessa enzima ser 160 vezes maior para xilose do que para glicose, foi suficiente para ser comercialmente aplicável. O processo de isomerização foi realizado em escala industrial pela primeira vez em 1967 pela *Clinton Corn Processing Corporation* nos Estados Unidos, e sua forma imobilizada foi lançada comercialmente em 1974. Com uma demanda impulsionada pelo crescente mercado de HFCS, a produção dessa enzima representa hoje uma enorme parcela na indústria de alimentos⁴². Por essa razão, a utilização desta enzima por muitos anos na indústria de alimentos indica sua comprovada segurança para saúde humana e animal.

Devido a sua grande aplicação comercial as propriedades enzimáticas da XI de diversos micro-organismos têm sido extensivamente estudadas. Tais pesquisas forneceram a descrição de várias sequências que codificam para Xilose isomerase em diversos organismos e informações estruturais como: mecanismo catalítico e termoestabilidade^{43,44}.

Cofatores e inibidores:

A isomerização pela XI requer cátions bivalentes como Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} ou a combinação desses cátions para máxima atividade. Apesar de Mg^{2+} ser superior ao Co^{2+} como ativador, esse último é responsável pela estabilidade e conformação da enzima, principalmente de sua estrutura quaternária. A atividade catalítica da enzima é inibida por metais como Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} e pelos compostos xilitol, arabitol, sorbitol, manitol e xilose⁴².

Temperatura e pH:

A temperatura ótima da maior parte das XI varia entre 60 e 80°C e aumenta na presença de Co^{2+} , enquanto o pH ideal varia entre 7 e 9⁴².

Atividade:

Em geral, possuem maior K_m (constante de Michaelis-Menten) e menor K_{cat} (constante catalítica) para D-glicose do que para D-xilose⁴⁴. A isomerização de xilose a xilulose ou de glicose a frutose ocorre no sítio ativo e requer uma transferência de hidrogênio entre os carbonos C1 e C2 do substrato. Evidências experimentais indicam um mecanismo de dois passos, no qual a enzima se liga ao substrato e promove a abertura do anel aromático. Diversos mecanismos já foram propostos sugerindo que os resíduos K182, H53 e D56 teriam um importante papel na abertura do anel. O sítio ativo é formado pelos resíduos D56, 216, 244, 254, 256 e 286, H53 e 219, E180 e dois cátions bivalentes como cofatores, todos bem conservados entre diferentes espécies⁴⁵.

Uma comparação de sequências de XI de diferentes organismos revelam que os números de resíduos de asparagina (D) e glutamina (E) diminuem com o aumento da termoestabilidade da enzima, presumidamente como estratégia para diminuir o potencial para desnaturação através de desaminação em altas temperaturas⁴³.

Baseado em sequências de nucleotídeos, Xilose isomerases são divididas em duas famílias: a família I inclui *Actinomycetes* e *Thermus* sp. que possuem genes *xyIA* com alto conteúdo GC e proteínas contendo 40 a 50 resíduos a menos na extremidade N-terminal. A

família II tem baixo conteúdo GC, com extensão na região N-terminal e forma um grupo mais heterogêneo, agrupando *xyIA* de muitas bactérias e eucariotos^{43,46-52}.

Grandes esforços têm sido dedicados na prospecção e engenharia de proteínas para obter XI, visando especialmente a obtenção de enzimas com maior atividade e termoestabilidade em altas temperaturas⁵³⁻⁵⁵.

Por várias décadas, diversas tentativas de expressão heteróloga de XI bacterianas em *S. cerevisiae* não foram bem sucedidas. A tentativa de expressão do gene *xyIA* de *Escherichia coli* em *S. cerevisiae* resultou em baixa atividade de XI, menor que a produzida no organismo original. Entre as causas apontadas se destacam o incorreto enovelamento da enzima, valor de pH intracelular sub-ótimo e a falta de cofatores específicos⁵⁶.

Posteriormente, as tentativas de expressar as XI de *Clostridium thermosulfurogenes*⁵⁷, *Bacillus subtilis* e *Actinoplanes missouriensis*⁵⁸ também falharam em produzir uma enzima ativa em *S. cerevisiae*⁴¹. Uma exceção foi a Xilose isomerase de *Thermus thermophilus*, que foi funcionalmente expressa em *S. cerevisiae*, porém com baixa atividade na temperatura de crescimento da levedura (30°C). A 85°C, a atividade dessa enzima foi superior a 1,0 µmol/mg proteína/min, enquanto que a 30°C a atividade foi de apenas 0,04 µmol/mg proteína/min⁵⁹.

Sendo *S. cerevisiae* um micro-organismo mesofílico, com pH citosólico levemente abaixo de 7 e temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C, a expressão heteróloga de genes que codificam XI nessa levedura tende a não alcançar atividade ótima, considerando as características dessa enzima descritas anteriormente⁴¹.

Em 2003, Kuyper³¹ e colaboradores obtiveram as primeiras linhagens de *S. cerevisiae* expressando XI de fungos anaeróbicos de forma eficiente, ou seja, capazes de crescer em xilose como única fonte de carbono. A expressão do gene *xyIA* derivado de *Piromyces* sp. resultou em valores de atividade superiores a 1,1 µmol de proteína/min. A partir de então, novas linhagens de *S. cerevisiae* expressando diferentes Xiloses isomerases de modo eficiente foram desenvolvidas por diversos grupos de pesquisa^{41,60-63}.



FBI BRANCO

1.11. As técnicas de detecção gerais e específicas do OGM, apresentando metodologia pertinente



Diferentes métodos gerais ou específicos podem ser empregados para identificar a linhagem Celere-2L em diferentes matrizes. Três exemplos de detecção geral ou específica são apresentados a seguir, podendo ser empregados de maneira independente ou complementar.

Método 1: Detecção da linhagem Celere-2L em meio de cultura específico.

Consiste no isolamento de colônias da levedura. Pode ser aplicado a amostras de solo, água, entre outros. Amostras devem ser diluídas (se necessário) e transferidas para meios de cultura apropriados. WLN (*Wallerteins Nutrient*) é o meio de cultura apropriado para o isolamento de leveduras, empregado em testes microbiológicos na indústria de bebidas e de etanol. Placas devem ser mantidas a 30°C por 48-72 horas. Após este período, bactérias e leveduras serão observadas. No entanto, a aparência das colônias de bactérias pode ser desde não-pigmentadas a brancas, com textura lisa ou áspera. Por outro lado, colônias de leveduras são maiores, cremosas e brancas.

Para distinguir a linhagem Celere-2L de outras leveduras selvagens, basta transferir as colônias para novas placas contendo meio de cultura definido, utilizando xilose como única fonte de carbono. Placas devem ser mantidas a 30°C por 18-48 horas. Apenas o crescimento da linhagem Celere-2L deve ser observado, uma vez que esta possui a habilidade de consumir xilose (Figura 15, pág. 86), formando colônias com aspecto típico de leveduras (cremosas e brancas).

Ambos os meios de cultura podem ser facilmente preparados em laboratório. Alternativamente WLN pode ser adquirido por meio de empresas especializada (Merck-Millipore Cód. MHA000P2N).

YNBx (esterilizar por autoclavagem):

- 1,7g/L YNB (*Yeast Nitrogen Bases*)
- 1,6g/L SDO (*Synthetic Drop-out*)
- 5mg/L Sulfato de amônia
- 20g/L D-Xilose
- 20g/L Ágar

WLN (*Wallerstein Laboratories Nutrient*) (esterilizar por autoclavagem):

4g/L Extrato de levedura
5g/L *Trypticase*
50g/L Glicose
50g/L Fosfato de Potássio Monobásico
0,25g/L Cloreto de Potássio
0,125g/L Cloreto de Cálcio
2,5mg/L Cloreto de Ferro
2,5mg/L Sulfato de Manganês
22mg/L Verde de Bromocresol
20g/L Ágar

Método 2: *Deteção da linhagem Celere-2L por PCR (qualitativo)*

Consiste na detecção por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de um ou mais genes específicos desta linhagem. Pode ser aplicado a amostras de solo, água, processos industriais, leveduras previamente isoladas (como proposto no método 1, por exemplo), entre outros. O DNA total da amostra em questão deve ser extraído e utilizado como molde para a amplificação por PCR. Para amostras de solo ou água é sugerido o uso de kits comerciais (Métodos 4.27 e 4.28, págs. 160 e 161). Para culturas ou colônias podem ser utilizados protocolos básicos de extração de DNA de leveduras. Bons exemplos incluem os métodos propostos por Loöke e Ausubel (Método 4.9, pág. 151). A integridade do DNA extraído deve ser avaliada em gel de agarose 0,7% (ou técnica equivalente).

A reação de amplificação deve conter^k:

1x Tampão de amplificação
2mM MgCl₂
0,2mM dNTP
0,1uM *Primer* direto (BCO_001)
0,1uM *Primer* reverso (BCO_002)
0,02U Taq Polymerase
5-10ng DNA

^kUtilizar como referência GoTaq® Flexi DNA Polymerase (M829). Detalhes em: <https://www.promega.com.br>.

Os parâmetros para amplificação são:

Desnaturação inicial: 95°C por 2 min

35 ciclos de: desnaturação: 95°C por 30s

anelamento: 60°C por 30s

extensão: 72°C por 30s

Extensão final: 72°C por 5min



Como exemplo, este método foi utilizado na detecção específica do OGM em amostras contendo alta diversidade de micro-organismos. Para isto, foram utilizados DNAs totais extraídos das mesmas amostras utilizadas para avaliar a sobrevivência e os efeitos do OGM sobre a microbiota da água e do solo (seção 0, pág. 141). É importante notar que os *primers* utilizados distinguem a linhagem Celere-2L de todos os outros micro-organismos presentes em ambos os ambientes, uma vez que não há amplificação nas amostras onde esta linhagem não foi inoculada (Figura 6).

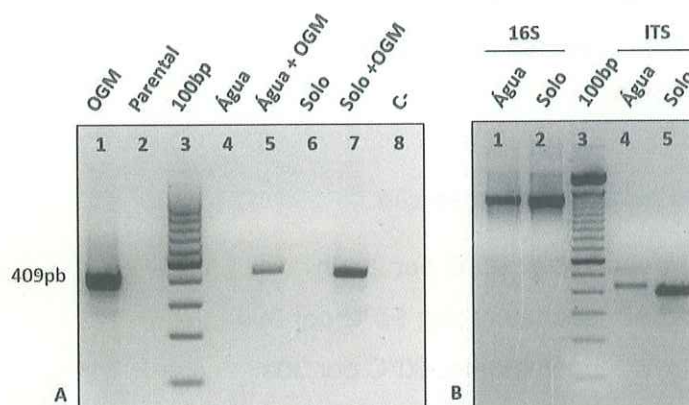


Figura 6: Método específico para detecção do OGM.

A: Resultado obtido a partir da amplificação (por PCR) de uma sequência específica do OGM. 1: Reação contendo DNA da linhagem Celere-2L. 2: DNA da linhagem parental. 3: Marcador (GeneRuler 100bp DNA Ladder – Thermo Scientific). Banda mais intensa corresponde a 500 pares de base (pb). 4-7: Detecção em amostras não estéreis. Reações utilizando os DNAs totais obtidos a partir das amostras utilizadas nos experimentos que avaliaram a sobrevivência do OGM e seu efeito sobre a microbiota da água e do solo. 4: DNA total da água sem aplicação do OGM. 5: DNA total da água contendo o OGM. 6: DNA total do solo sem aplicação do OGM. 7: DNA total do solo contendo o OGM. 8: Controle negativo (sem DNA). 409pb: tamanho esperado. Nota-se que a detecção é efetiva uma vez que os *primers* utilizados distinguem a linhagem Celere-2L de seu parental (1-2) e de todos os outros micro-organismos presentes na água ou no solo, uma vez que não há amplificação quando o OGM não está presente (4 e 7). B: Amplificação controle utilizando os *primers* específicos para as regiões 16S e ITS utilizados na abordagem de metagenômica. Nota-se que ambas as matrizes possuem micro-organismos.

Por remeterem diretamente à sequências específicas da linhagem OGM que se encontra em processo de patenteamento, os *primers* utilizados são apresentadas na tabela S1 do material confidencial.

Método 3: Detecção da linhagem Celere-2L por qPCR (método quantitativo)

Assim como o método 2, este consiste na detecção pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) de um ou mais genes específicos desta linhagem. Pode ser utilizado para quantificar o OGM e acompanhar sua sobrevivência em amostras de solo, água, processos industriais, entre outros. O DNA total da amostra em questão deve ser extraído e utilizado como molde para a amplificação. Para amostras de solo ou água é sugerido o uso de kits comerciais (Métodos 4.27 e 4.28, págs. 160 e 161). Para culturas ou colônias podem ser utilizados protocolos básicos de extração de DNA de leveduras, bons exemplos incluem os métodos propostos por Loöke e Ausubel (Método 4.9, pág. 151). A integridade do DNA extraído deve ser avaliada em gel de agarose 0,7% (ou técnica equivalente).

A reação de amplificação deve conter¹:

- 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix
- 0,1uM *Primer* direto (BCO_005)
- 0,1uM *Primer* reverso (BCO_006)
- 10ng de DNA

Os parâmetros para amplificação são:

- Desnaturação inicial: 95°C por 2 min
- 35 ciclos de: desnaturação: 95°C por 30s
 - anelamento: 60°C por 30s
 - extensão: 72°C por 30s
- Extensão final: 72°C por 5min

Esta foi a abordagem utilizada nos experimentos que avaliaram de forma quantitativa o número de cópias do gene *xyIA* na linhagem OGM (Método 4.8, pág. 150) e a sua sobrevivência em água e solo não estéreis (Método 4.26, pág. 160).

Por remeterem diretamente à sequências específicas da linhagem OGM que se encontra em processo de patenteamento, os *primers* utilizados são apresentadas na tabela S1 do material confidencial.

¹Utilizar como referência 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) (REF 4367659). Detalhes em: <http://www.lifetech.com>.

1.12. O padrão de herança genética do gene inserido

Todas as cópias do gene *xy/A* encontram-se integradas no genoma, de modo que o padrão de herança é equivalente a qualquer outro gene endógeno. Em relação ao uso pretendido, a reprodução da linhagem Celere-2L é exclusivamente de forma vegetativa (i.e., por mitose), gerando células idênticas geneticamente.



ALL BRANCO

1.13. A descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados



Por definição, pleiotropia é o fenômeno no qual um simples *locus* (um gene) afeta uma ou mais características fenotípicas geralmente não relacionadas. Consequentemente, a mutação ou qualquer manipulação genética em um gene pleiotrópico induz alterações fenotípicas inesperadas⁶⁴⁻⁶⁶. Epistasia, por outro lado, refere-se à interação gênica na qual a expressão de um gene depende da presença de outros (um ou mais). O gene cuja expressão é dependente, é hipostático ao gene epistático, aquele que regula^{67,68}.

Diversas funções biológicas são governadas por interações gênicas pleiotrópicas ou epistáticas. Os mecanismos que controlam o desenvolvimento em leveduras, por exemplo, são altamente pleiotrópicos. Praticamente todas as vias conhecidas contribuem para a regulação das diversas etapas do desenvolvimento⁶⁹. Em relação ao metabolismo, diferentes fluxos metabólicos produzem diferentes conjuntos de interações epistáticas, uma consequência da complexa interação entre redes metabólicas, as quais incluem múltiplas redes ramificadas compartilhando conjuntos de metabólitos e um alto nível de interconexões entre diferentes processos^{70,71}.

Como detalhado previamente, as manipulações genéticas empregadas no desenvolvimento da linhagem Celere-2L estão diretamente relacionadas à conversão do açúcar xilose em etanol. Este novo metabolismo compartilha com a glicose reações que constituem duas vias metabólicas chave para o crescimento celular e produção de etanol: i) a glicólise, conjunto de reações que convertem a glicose em piruvato; ii) via das pentoses fosfato (PPP), que produz pentoses (frutose e gliceraldeído-3-fosfato) e cofatores (NADPH) utilizados na produção de biomassa (i.e., no crescimento)²⁶ (Figura 7).

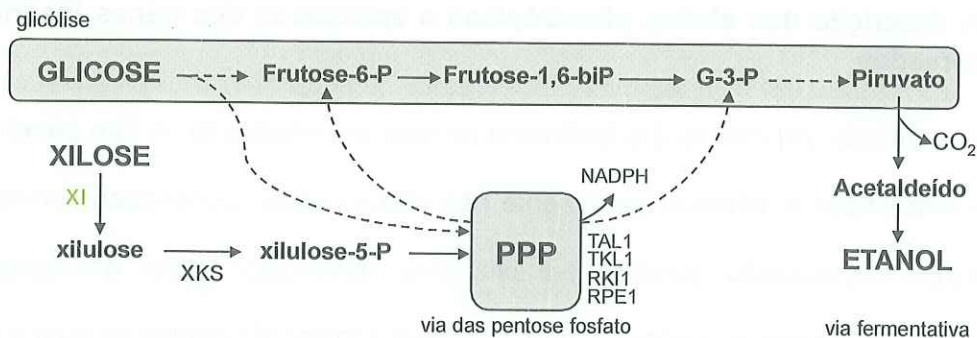


Figura 7: Representação esquemática da inter-relação entre os metabolismos de glicose e xilose para produção de etanol e crescimento.

Pela via glicolítica a glicose é convertida a piruvato. A xilose é convertida em frutose-6-fosfato (Frutose-6-P) ou gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) pela via das pentoses fosfato (PPP) e compartilha com a glicose as etapas de conversão destes a piruvato. O piruvato, por sua vez, é convertido em etanol pela via fermentativa. Invariavelmente parte da glicose intracelular é sempre direcionada para a via das pentoses fosfato e é utilizada para produção de pentoses (Frutose-6-P e G-3-P) e regeneração do cofator NADPH, utilizado no metabolismo de crescimento celular. O metabolismo da xilose se inicia pela sua conversão a xilulose, etapa catalisada pela enzima Xilose isomerase (XI), produto do único transgene presente na linhagem OGM (gene *xylA*). Notar que as manipulações realizadas nos genes endógenos (*XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* e *RPE1*) estão diretamente relacionadas ao fluxo metabólico da xilose. Para facilitar a compreensão apenas as principais reações são apresentadas. Setas contínuas representam reações diretas; setas pontilhadas representam passos que incluem mais que uma reação metabólica.

De certa forma, essa interação entre os metabolismos de glicose e xilose poderia ser diretamente influenciada pelas modificações genéticas realizadas na construção da linhagem OGM. No entanto, diferentes análises fenotípicas comparando o OGM com a linhagem parental demonstraram que não houveram efeitos adversos (ou inesperados) que pudessem ser atribuídos a interações pleiotrópicas ou epistáticas do gene *xylA* com os da glicólise ou PPP.

Como demonstrado nos experimentos descritos no item 1.16 (pág. 81), o crescimento e o metabolismo das linhagens OGM e parental é equivalente em sacarose, frutose e glicose, açúcares convertidos naturalmente em etanol por leveduras da espécie *S. cerevisiae*^{72,73}.

A morfologia de ambas as linhagens também é equivalente. Células do OGM e parental apresentam o mesmo formato e tamanho médio: $23,62 \pm 0,043$ e $23,64 \pm 0,038 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Além disso, as paredes celulares de ambas apresentam o mesmo padrão/intensidade de marcação com corante específico para quitina, demonstrando ausência de alterações no principal componente da parede celular (Figura 8; método 4.10, pág.151).

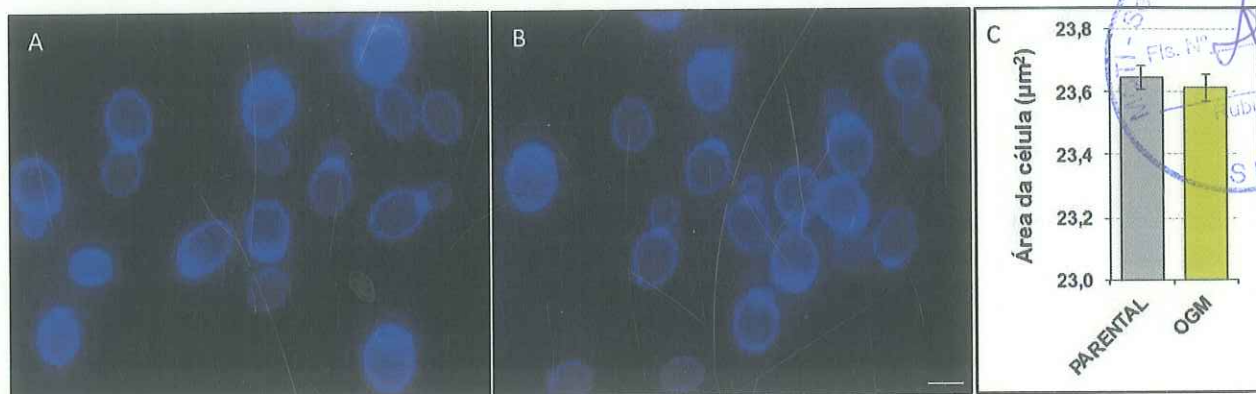
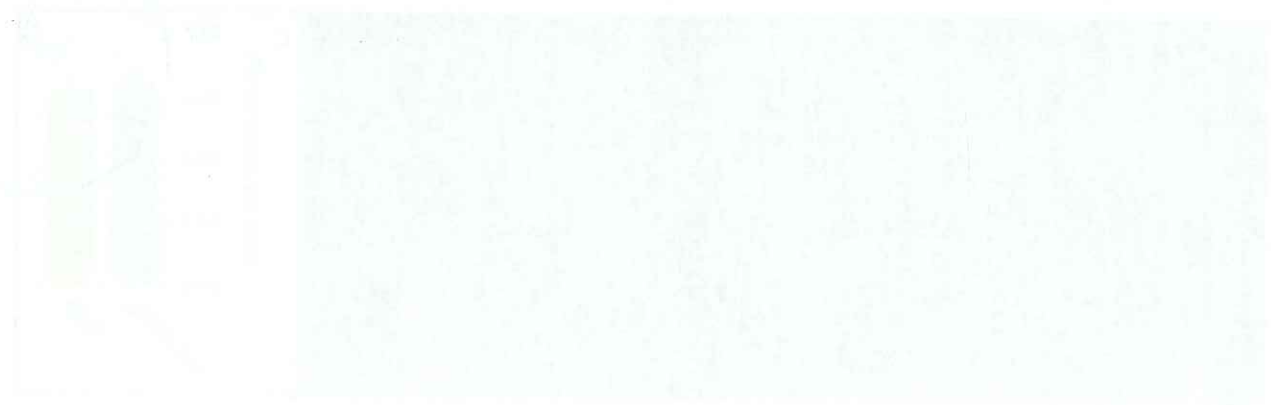


Figura 8: Morfologia celular das linhagens OGM e parental.

Células observadas em microscopia de epifluorescência e marcadas com Calcofluor White. A: linhagem parental. B: linhagem OGM. Este é um corante de alta afinidade para quitina, principal componente da parede celular de *S. cerevisiae*. Notar a semelhança no tamanho, forma e na intensidade da marcação. A equivalência entre parental e OGM comprovam a ausência de alterações na composição da parede celular. Imagens capturadas em microscópio de epifluorescência Olympus-BX51 com câmara digital DP72 acoplada. C: Tamanho das células, dado pelo área média de 100 células calculada utilizando o *software* ImageProPlus. Barra=5 μm .

Além disso, a alta equivalência observada entre OGM e parental em testes com agentes esterilizantes, tolerância ao dessecamento e sobrevivência reforçam as evidências de ausência de interações pleiotrópicas ou epistáticas. De certa forma, efeitos adversos não são esperados, uma vez que não existem relatos da relação dos genes manipulados (especialmente do *xyIA*) com aqueles que determinam os fenótipos observados em diferentes testes.

Por fim, todos os testes relacionados às etapas de desenvolvimento da linhagem OGM, aliados aos experimentos de avaliação de risco apresentados neste relatório, representaram uma ampla oportunidade de observação fenotípica desta linhagem. É razoável assumir que na hipótese de ocorrência de efeitos resultante de interação gênica, estes já teriam sido observados no decorrer dos experimentos. A ausência de efeitos adversos resultantes de interações gênicas ou proteicas é dada não só pela eficiência e precisão dos métodos de manipulação genética utilizados, com também pela especificidade funcional do único gene exógeno inserido.



Faint, illegible text lines, possibly a header or introductory paragraph.

Faint, illegible text lines, possibly a paragraph.

EM BRANCO

Faint, illegible text lines, possibly a paragraph.

1.14. O grau de estabilidade genotípica, especificando a metodologia utilizada e o número de gerações avaliadas



Leveduras da espécie *S. cerevisiae* são micro-organismos que possuem genomas compactos (~6.000 genes) porém altamente dinâmicos e moduláveis. A modularidade se dá pelo fato de *S. cerevisiae* possuir um mecanismo de recombinação homóloga mitótica descrito em 1976^{15,16}. Embora seja importante para reparar quebras ou erros no DNA que ocorrem durante a replicação, a recombinação ocorre frequentemente entre sequências de DNAs homólogos (alelos, por exemplo), DNAs repetitivos encontrados em cromossomos homólogos ou heterólogos e, também, entre DNAs lineares como cassetes de expressão¹⁸. Ao acaso, a recombinação homóloga mitótica pode promover deleções ou duplicações de um gene ou de grandes sequências de DNA (de 50 a 1 milhão de pares de base), evento definido como CNV (sigla do termo em inglês: *Copy Number Variation*)⁷⁴.

O melhor exemplo desta dinâmica foi descrito por Argueso e colaboradores em 2009⁷⁵. O trabalho descreve o genoma da principal levedura industrial utilizada na produção de etanol no Brasil, conhecida como Pedra-2 (PE2). As análises demonstraram que esta linhagem possui um genoma altamente heterozigoto e cromossomos cujas extremidades são altamente variáveis, apresentando genes relacionados às diferentes condições toleradas por esta linhagem (estresse oxidativo e altas temperaturas). O trabalho sugere ainda que esta arquitetura genômica pode contribuir com a capacidade competitiva em ambientes industriais observada em PE2, oferecendo mecanismos alternativos para as células diplóides ajustarem o número de cópias de genes relacionados ao estresse através da recombinação homóloga mitótica ou reparos induzidos por quebras no DNA.

Em relação ao uso pretendido, no entanto, é importante considerar que o processo fermentativo ocorre com alta concentração de leveduras. Células que por recombinações ao acaso sofrerem deleções de cópias de *xyIA* são selecionadas negativamente na presença de xilose (i.e., na segunda metade da fermentação). Em outras palavras, a incapacidade de crescer faz com que a frequência destas linhagens diminua até que estas sejam eliminadas da população. Por outro lado, as células que mantiveram o número de cópias de *xyIA*, continuam aptas a metabolizar a xilose disponível e mantêm sua frequência.

Por essa razão, o grau de estabilidade da linhagem Celere-2L pode ser indiretamente inferido pelo consumo da xilose observado durante a fermentação. Embora submetida a diversos testes que incluem etapas nas quais a Xilose isomerase é dispensável, a regularidade no consumo da xilose sempre foi observada durante todos os ensaios com a linhagem Celere-2L.

Dois experimentos discutidos na seção 1.16 ilustram estas observações. No primeiro deles (Figura 15, pág. 86), células são cultivadas em meio contendo apenas xilose como fonte de carbono. No segundo (Figura 16, pág. 87), a linhagem Celere-2L é cultivada na condição que mimetiza o processo industrial, contendo glicose e xilose. Ambas as fermentações são precedidas de uma etapa de propagação em meio contendo apenas glicose como fonte de carbono, no entanto, em ambos os casos a xilose é consumida pelo OGM, sugerindo que todas as cópias do gene *xylA* se mantêm estáveis.

Para confirmar esta premissa, o número de cópias do gene *xylA* foi quantificado após aproximadamente 100 gerações em meio não seletivo, ou seja, contendo apenas glicose como fonte de carbono. Nesta análise foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR) empregando o método de quantificação absoluta baseado em curva padrão^{76,77}. Para isto, dois controles foram previamente estabelecidos: i) uma linhagem contendo apenas uma cópia do gene *xylA* (linhagem de referência – Celere-1L) e; ii) definição de uma sequência de DNA cópia única (sequência de referência).

Além dos controles, os principais procedimentos da análise incluíram: i) extração de DNA total (Método 4.9, pág. 151); ii) construção e validação de *primers* específicos para amplificação do *xylA* e do gene de referência; iii) construção da curva padrão e (Método 4.8, pág. 150); iv) análise do número de cópias após 100 gerações (Figura S 8, pág. 166).

Analisando os resultados obtidos pela ampliação da sequência de referência, é possível observar que para ambas as linhagens o sinal de amplificação observado é equivalente a uma cópia (Figura 9A). No entanto, quando os *primers* específicos para o gene *xylA* são utilizados o sinal de amplificação na linhagem Celere-2L é $37 \pm 0,96$ vezes maior que o observado para a linhagem de referência (Figura 9B).

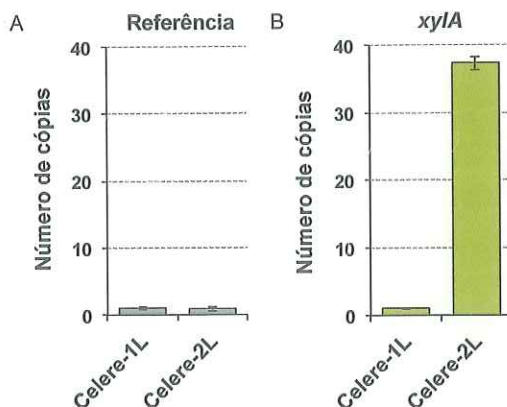


Figura 9: Quantificação do número de cópias do gene *xyIA* após 100 gerações.

A: Confirmação do número de cópias da sequência de referência. B: Quantificação do número de cópias do gene *xyIA*. Nota-se que o valor da amplificação obtido para *xyIA* na linhagem Celere-2L é aproximadamente 38 vezes maior que na linhagem de Celere-1L, utilizada com referência por possuir apenas uma cópia do gene *xyIA*.

Como demonstrado pelo sequenciamento genômico da linhagem Celere-2L (seção 1.9, pág. 59), esta possui 38 cópias do gene *xyIA*. Dessa forma, os resultados obtidos pela análise por qPCR indicam que o número de cópias se mantém estável após 100 gerações, mesmo em uma condição na qual a atividade da Xilose isomerase (produto do transgene) é dispensável.

Outra observação importante é que o número de gerações avaliado é superior ao encontrado no processo industrial. Ao contrário da produção de etanol convencional (i.e., de primeira geração) no qual as leveduras são recicladas por até 10 meses, o etanol de segunda geração geralmente não possui reciclo e as leveduras são substituídas a cada fermentação, cuja duração é de aproximadamente 50 horas, o equivalente a 25 gerações.

COMPTON

1.15. A existência de interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo OGM, por técnicas de ADN recombinante e suas possíveis consequências



Nenhum efeito adverso foi observado. Apenas um gene exógeno foi introduzido na linhagem Celere-2L. Outras modificações incluíram o aumento da expressão ou deleção de genes endógenos (seção 1.8 pág. 51).

FRANCO

1.16. As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes



Todas as manipulações genéticas realizadas na construção da linhagem Celere-2L estão diretamente relacionadas às etapas de consumo e conversão de xilose em etanol^{27,41}. Além disso, não existem evidências de que tais modificações possam alterar a capacidade de reprodução, disseminação ou transferência gênica em relação à linhagem parental.

É esperado que apenas a habilidade de crescer em xilose como única fonte de carbono seja acrescentada. Considerando esta característica como um dos elementos da sobrevivência, o crescimento da Celere-2L em diferentes fontes de carbono foi avaliado em relação ao seu parental. Detalhes da metodologia são apresentados na seção 4.11 (pág. 151). Resumidamente, as linhagens OGM e parental (em triplicatas) foram crescidas previamente em YEPD por aproximadamente 16-18 horas a 30°C em agitação (200 rpm). Em seguida, alíquotas foram transferidas para meios contendo as fontes de carbono específicas. O crescimento foi determinado pela densidade óptica da cultura em intervalos de tempo pré-determinados. Adicionalmente, produtos e substratos chave de cada metabolismo foram quantificados por HPLC (Método 4.12, pág. 152).

O crescimento em sacarose foi o primeiro ensaio realizado. A sacarose é um dissacarídeo formado por monômeros de glicose e frutose. Este açúcar é hidrolisado no meio extracelular por invertases (EC 3.2.1.26), enzimas secretadas que são codificadas principalmente pelo gene *SUC2* (*SUCrose fermentation*). Moléculas de glicose e frutose obtidas pela hidrólise da sacarose são importadas através de transportadores de hexoses (EC 3.6.3.17), proteínas codificadas por genes da família *HXT1* e *HXT7* (*HeXose Transporter*). Pela via glicolítica ambos são convertidos em piruvato, que por sua vez, é precursor do etanol^{72,73} (Figura 10).

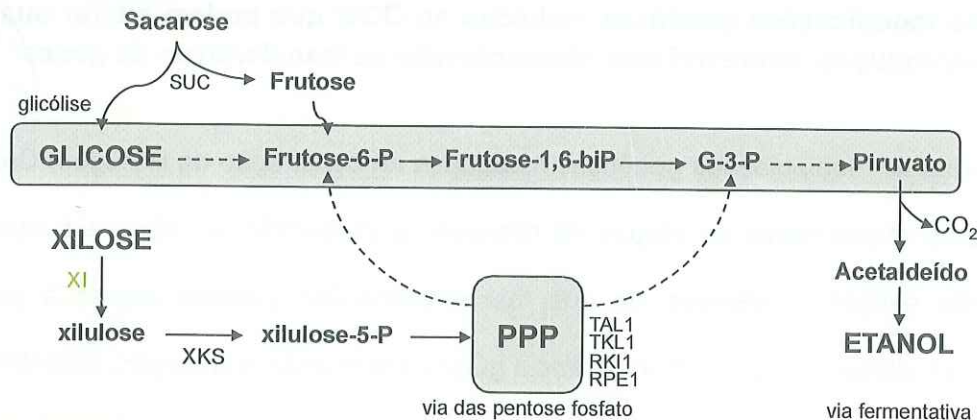


Figura 10: Representação esquemática do metabolismo de sacarose pelo OGM.

A sacarose é hidrolisada a glicose e frutose por invertases extracelulares codificadas pelo gene *SUC1* (*SUCrose fermentation*). Em seguida, ambos são transportados para o interior da célula. Pela via glicolítica a glicose e a frutose são convertidas a piruvato. A xilose é convertida em frutose-6-fosfato (Frutose-6-P) ou gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) pela via das pentose fosfato (PPP) e compartilha com a glicose as etapas de conversão destes a piruvato. O piruvato, por sua vez, é convertido em etanol pela via fermentativa. O metabolismo da xilose se inicia pela sua conversão a xilulose, etapa catalisada pela enzima Xilose isomerase (XI), produto do único transgene presente na linhagem OGM (gene *xylA*). Notar que as manipulações realizadas nos genes endógenos (*XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* e *RPE1*) estão diretamente relacionadas ao fluxo metabólico da xilose. Para facilitar a compreensão apenas as principais reações são apresentadas. Setas contínuas representam reações diretas; setas pontilhadas representam passos que incluem mais que uma reação metabólica.

Como demonstrado na figura 11A, ambas as linhagens apresentam crescimento equivalente em sacarose, atingindo em 11 horas a concentração celular máxima de $11,5 \pm 0,07$ e $12,2 \pm 0,8$ para OGM e parental, respectivamente. Equivalência também foi observada na taxa de consumo da sacarose ($>97\%$) (Figura 11B) e produção de etanol (OGM= $9,4 \pm 0,04$ e parental= $9,4 \pm 0,06$ g/L) (Figura 11C) ao final do experimento.

O crescimento em glicose e frutose também foi individualmente avaliado. Novamente todos os resultados foram equivalentes quando OGM e parental foram comparados. Em glicose, a densidade celular observada após 9 horas de cultivo foi de $8,3 \pm 0,3$ e $8,7 \pm 0,6$ para OGM e parental, respectivamente (Figura 12A). Ao final do experimento, ambas as linhagens consumiram praticamente toda glicose ($>99,4\%$) (Figura 12B) e a concentração de etanol produzido foi igual para OGM: $8,8 \pm 0,04$ g/L e parental: $8,9 \pm 0,1$ g/L (Figura 12C).

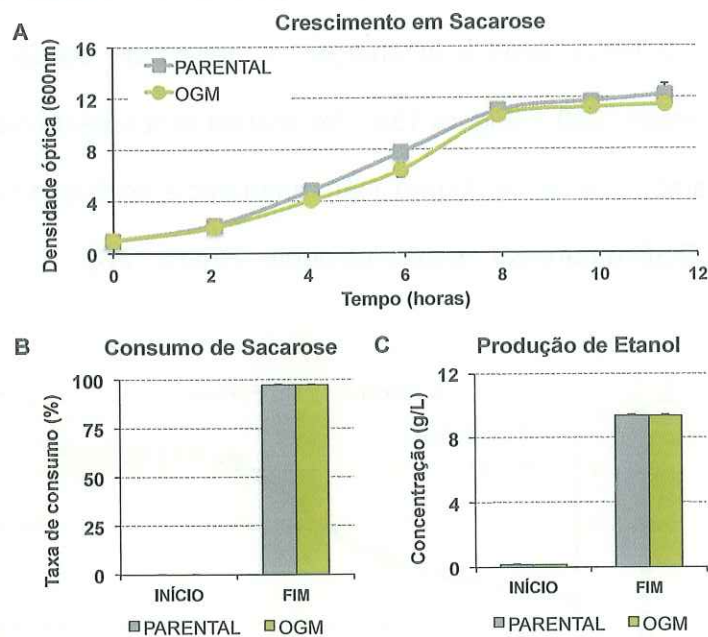


Figura 11: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em sacarose.

Média e desvio padrão de três experimentos independentes. A: Curva de crescimento em meio contendo sacarose como única fonte de carbono. B: Consumo da sacarose no início e após 11 horas de crescimento. C: Concentração de etanol no início e ao final do experimento. Notar a equivalência entre OGM e parental em todos os parâmetros analisados.

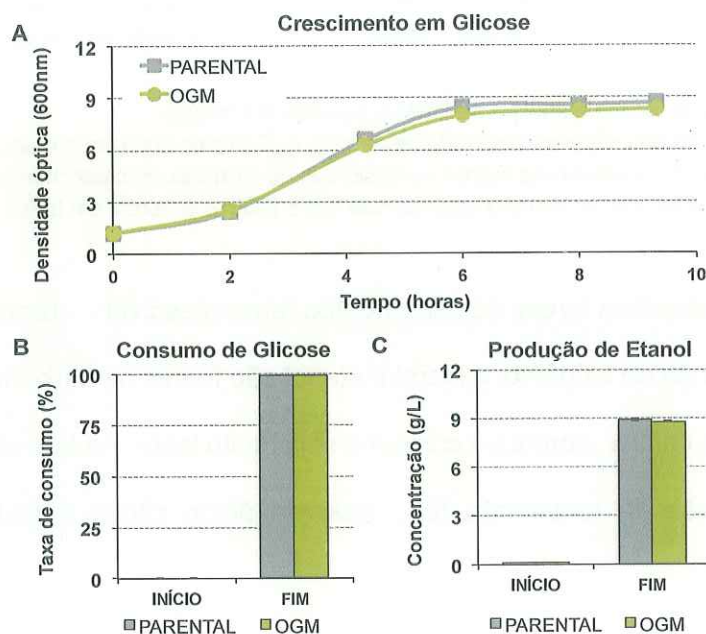


Figura 12: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em glicose.

Média e desvio padrão de três experimentos independentes. A: Curva de crescimento em meio contendo glicose como única fonte de carbono. B: Consumo da glicose no início e após 9 horas de crescimento. C: Concentração de etanol no início e ao final do experimento. Notar a equivalência entre OGM e parental em todos os parâmetros analisados.

De forma similar, o crescimento de OGM e parental em frutose também foi equivalente. Aproximadamente 10 horas após a inoculação, a densidade celular das linhagens foi de: OGM= $9,8 \pm 0,1$; parental= $10 \pm 0,1$ (Figura 13A). Ao final do experimento mais de 99,4% da frutose foi consumida em ambos os casos (Figura 13B); enquanto a produção de etanol foi de $8,8 \pm 0,04$ e $8,9 \pm 0,1$ g/L para OGM e parental, respectivamente (Figura 13C).

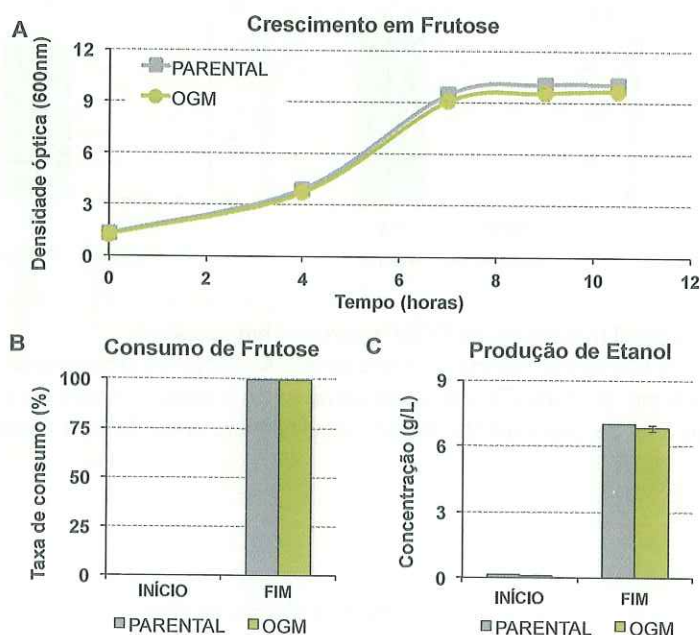


Figura 13: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em frutose. Média e desvio padrão de três experimentos independentes. A: Curva de crescimento em meio contendo frutose como única fonte de carbono. B: Consumo da frutose no início e após 11 horas de crescimento. C: Concentração de etanol no início e ao final do experimento. Notar a equivalência entre OGM e parental em todos os parâmetros analisados.

Adicionalmente duas fontes de carbono não fermentescíveis foram avaliadas. Na ausência de glicose e presença de oxigênio, glicerol e etanol são fontes de carbono alternativas utilizadas para o crescimento celular, embora o consumo seja muito lento. Ambos são convertidos em ATP, CO_2 e água através da respiração (i.e., ciclo do ácido cítrico e cadeia transportadora de elétrons)⁷⁸.

Em ambos os ensaios o crescimento da linhagem OGM foi equivalente ao do seu parental, não apresentando diferenças significativas em relação à concentração celular ou consumo da fonte de carbono avaliados ao final do experimento (Figura 14).

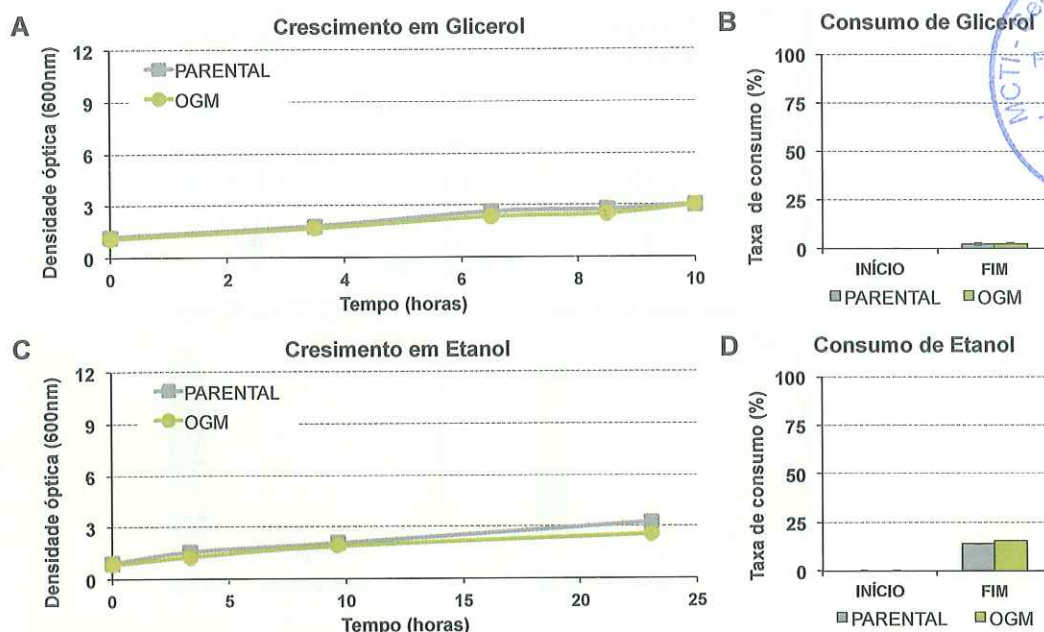


Figura 14: Crescimento do OGM e parental em fontes de carbono não fermentescíveis.

Média e desvio padrão de três experimentos independentes. A: Curva de crescimento em meio contendo glicerol como única fonte de carbono. C: Curva de crescimento em meio contendo etanol como única fonte de carbono. B: Consumo de glicerol no início e após 10 horas de crescimento. D: Consumo de etanol no início e após 23 horas de crescimento. Notar a equivalência entre OGM e parental em todos os parâmetros analisados.

Finalmente, o crescimento de ambas as linhagens foi comparado em condições contendo xilose como fonte de carbono (Figura 15-Figura 16). No primeiro ensaio, contendo xilose como única fonte de carbono, a linhagem OGM demonstrou crescimento significativo em relação ao seu parental ($DO = 10,3 \pm 0,5$ e $2,2 \pm 0,1$, respectivamente) (Figura 15A). O crescimento residual apresentado pela linhagem parental é explicado por dois fatores: i) utilização de açúcares de reserva especialmente sob a forma de trealose; ii) em condições semi-anaeróbicas, linhagens selvagens podem utilizar xilose para a produção de biomassa⁷⁹. Porém, o crescimento é extremamente lento. Como consequência do crescimento em xilose, o consumo deste açúcar e a produção de etanol pelo OGM foram observados, sendo: $>87,9\%$ e $7,5 \pm 0,8$ g/L respectivamente (Figura 15B-C).

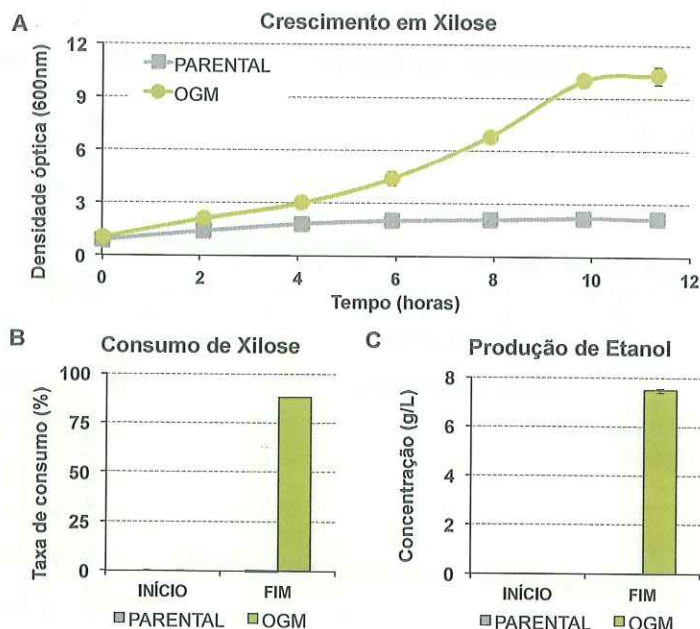


Figura 15: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em xilose.

Média e desvio padrão de três experimentos independentes. A: Curva de crescimento em meio contendo xilose como única fonte de carbono. B: Consumo da xilose no início e após 11 horas de crescimento. C: Concentração de etanol no início e ao final do experimento. Como esperado apenas a linhagem OGM apresenta crescimento, consumo de xilose e produção de etanol eficientes.

A segunda condição contendo xilose incluiu a análise do crescimento utilizando açúcares derivados da hidrólise de material lignocelulósico (palha de cana-de-açúcar) como fonte de carbono (Método 4.29, pág. 162). Nesta condição, foi possível avaliar ambos os metabolismos de glicose e xilose do OGM em relação à linhagem parental, mimetizando o uso no processo pretendido para a Celere-2L. Apesar do OGM ser capaz de consumir a xilose, não foram observadas diferenças significativas no crescimento quando as concentrações celulares são comparadas (Figura 16A). Além disso, o consumo da glicose é equivalente (>96,6%) para ambas as linhagens, como demonstrado anteriormente (Figura 16B).

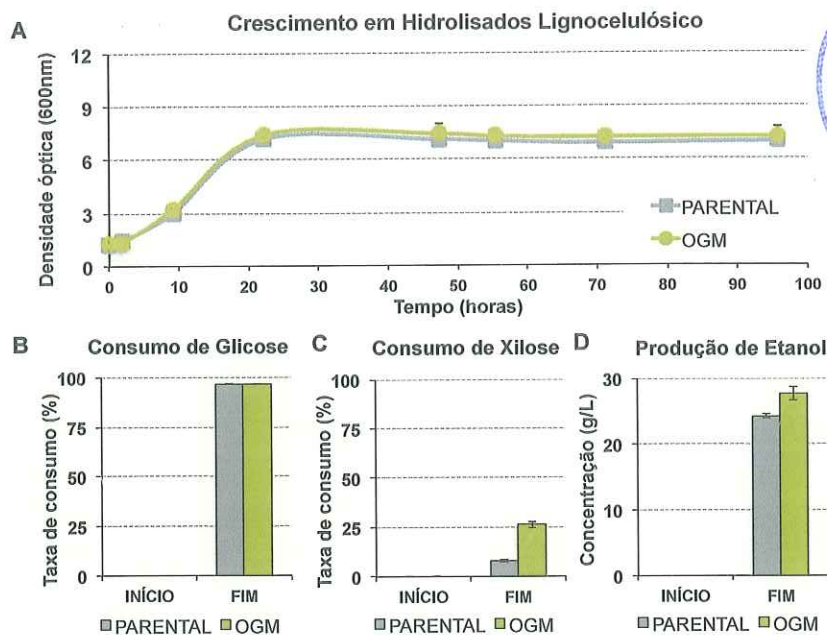


Figura 16: Crescimento e perfil metabólico do OGM e parental em açúcares derivados da hidrólise de material lignocelulósico.

Média e desvio padrão de três experimentos independentes. A: Curva de crescimento em meio contendo hidrolisado como fonte de carbono. B: Consumo de glicose no início e após 95 horas de crescimento. C: Consumo de xilose no início e após 95 horas de crescimento. D: Concentração de etanol no início e ao final do experimento.

Por outro lado, as diferenças entre OGM e parental ficam evidentes quando o consumo de xilose e a produção de etanol são comparados. Ao final do experimento, aproximadamente 25% da xilose foi consumida pela linhagem OGM (Figura 16C), influenciando diretamente na produção final de etanol, OGM=27,7±1,04 e parental=24,2±0,3 (Figura 16D). É importante notar que o crescimento e o consumo dos açúcares hidrolisados são mais lentos em relação ao observado nos meios sintéticos. Isso se dá pelo fato de que os processos empregados na hidrólise do material lignocelulósico geram concentrações significativas de intermediários que atuam como inibidores da fermentação, diminuindo a eficiência das leveduras. Entre eles destacam-se: furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético⁸⁰.

Juntos, os resultados comprovam que a manipulação genética empregada no desenvolvimento da linhagem Celere-2L é restrita ao metabolismo de conversão da xilose em etanol. Além disso, estes dados reforçam as evidências de ausência de efeito adversos causados por interações gênicas, pleiotrópicas ou epistáticas.

EM BRANCO

Proposta de Liberação Comercial

Saccharomyces cerevisiae

Linhagem Celere-2L



2. Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal

RN-5 | Anexo III

Proposta de Liberação Comercial

Formulário de Proposta de Liberação Comercial

Revista de 1974

Assinatura do Representante da Empresa Exportadora

EM BRANCO

Assinatura do Representante da Empresa Importadora

Em relação à avaliação de risco à saúde humana e animal a Resolução Normativa Nº 5, de 12 de março de 2008 solicita informações/testes para: "(A) organismos consumidos como alimento ou (B) micro-organismos utilizados como vacinas".



A linhagem Celere-2L não se trata de uma vacina e em nenhuma circunstância será utilizada para fins de consumo direto ou como aditivo para alimento humano ou animal. **Por essas razões, entende-se que este tópico não se aplica ao OGM objeto deste pleito.**

Este cenário se assemelha à recente liberação comercial da linhagem de *S. cerevisiae* RN1016 (Processo nº 01200.001454/2013-37). Como detalhado na avaliação do risco ao meio ambiente (seção 3, pág. 93), o evento RN1016 e a linhagem Celere-2L compartilham a única aplicação pretendida, sendo esta exclusivamente a produção industrial de etanol de segunda geração (i.e., a partir da biomassa vegetal), processo que se dará em dornas e tubulações fechadas sem a liberação de formas viáveis dos micro-organismos no ambiente.

Outras semelhanças que remetem à segurança de ambas a linhagens incluem:

- i) Organismo hospedeiro (*S. cerevisiae*): micro-organismo ubíquo, sem restrições alimentares e amplamente utilizado na indústria de alimentos e bebidas. Apesar da grande exposição (especialmente de trabalhadores) é considerado seguro de acordo com a *United States Environmental Protection Agency* (EPA)^m (detalhes na seção 1.7, pág. 47);
- ii) Um único gene exógeno: derivado de um fungo não patogênico (classe de risco I) (detalhes na seção 1.3 do material confidencial);
- iii) Xilose isomerase (produto do transgene): enzima que converte no interior da célula o açúcar xilose em xilulose, um metabólito utilizado para crescimento e produção de etanol. Enzima amplamente utilizada na indústria de alimentos e sem histórico de efeitos adversos à saúde humana e animal (detalhes na seção 1.10, pág. 61).

^mUnited States Environmental Protection Agency (EPA). Final risk assessment of *S. cerevisiae*. Detalhes em: <http://www.epa.gov>.

EM
BRANCO

Proposta de Liberação Comercial

Saccharomyces cerevisiae
Linhagem Celere-2L



3. Avaliação de Risco ao Meio Ambiente

RN-5 | Anexo IV

BRANCO

AVALIAÇÃO DE RISCO EM RELAÇÃO AO USO PRETENDIDO



Este OGM foi desenvolvido para atender a demanda de uma nova geração de indústrias de bioetanol, geralmente referida como: etanol de segunda geração, etanol 2G, etanol celulósico ou lignocelulósico, entre outros. O uso do termo “bioetanol” deve-se ao fato de que este químico é obtido a partir da fermentação dos açúcares extraídos de matéria-prima renovável. Destaque para a cana-de-açúcar e o milho, utilizados no Brasil e nos Estados Unidos, respectivamente.

O etanol 2G baseia-se no maior aproveitamento da matéria-prima e consiste no uso da levedura *S. cerevisiae* para fermentar os açúcares solúveis (i.e., glicose e frutose) e os polissacarídeos estruturais constituintes da parede celular vegetal (i.e., celulose e a hemicelulose). Permite, por exemplo, que seja aproveitado um enorme volume de biomassa disponível em forma de bagaço e palha da cana-de-açúcar, derivados da cadeia produtiva do bioetanol de primeira geração, impactando diretamente no rendimento do processo por produzir mais utilizando a mesma área plantada (em média 45% a mais). Outros resíduos agroflorestais também podem ser aproveitados, como os gerados na indústria de papel e celulose a partir do eucalipto.

Na cana-de-açúcar, a glicose e a frutose estão disponíveis sob a forma de sacarose. Estes são açúcares naturalmente metabolizados pela *S. cerevisiae* e convertidos em etanol pelas vias glicolítica e fermentativa^{72,73}. São encontrados 40% adicionais de glicose na celulose/hemicelulose e disponibilizados no processo 2G pela hidrólise enzimática (detalhes a seguir). Além disso, a hidrólise da hemicelulose disponibiliza também altas concentrações do açúcar xilose (em média 25%)^{81,82}, que por ser uma pentose, (i.e., um açúcar de cinco carbonos), não é naturalmente convertida em etanol por linhagens selvagens de *S. cerevisiae*.

Esta habilidade pode ser incorporada em leveduras por meio da inserção de genes específicos (poucos), derivados de micro-organismos capazes de consumir açúcares de cinco carbonos⁸³. Como é o caso do evento Celere-2L, resultante da inserção de apenas um transgene: *xyIA*, derivado de um fungo anaeróbico não patogênico. O gene *xyIA* codifica a proteína Xilose isomerase que, por sua vez, catalisa a conversão de xilose em xilulose. Este metabólito segue o

mesmo caminho da glicose, utilizando as vias glicolítica, fermentativa e das pentoses fosfato, para o crescimento da célula e produção de etanol^{29,30,84}.

Por se tratar de um organismo modelo extensivamente estudado, muitas ferramentas de biologia molecular encontram-se disponíveis e incluem procedimentos simples e padronizados (revisado por Botstein⁴). Tais ferramentas permitem que as manipulações genéticas em *S. cerevisiae* sejam precisas e pontuais, eliminando o risco de modificações indesejadas no genoma. A inserção de *xyIA*, por exemplo, foi feita de forma estável (i.e., integrada no genoma); específica (i.e., em uma posição conhecida) e; sem deixar marcas de resistência a antibióticos ou qualquer outro agente seletivo. O mesmo princípio vale para a deleção ou modificação de genes endógenos (seção 1.8 pág. 51).

Os processos industriais de produção de etanol de segunda geração, por sua vez, são constituídos por quatro etapas principais: i) pré-tratamento da biomassa; ii) hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose; iii) propagação da levedura e fermentação dos açúcares (glicose e xilose) e; iv) destilação para recuperação do etanol. Destes, apenas a fermentação (e processos relacionados) inclui diretamente a aplicação de células viáveis do OGM. Por outro lado, a destilação e outros procedimentos pós fermentação promovem a completa inativação das células e, por essa razão, contribuem significativamente para a segurança do processo.

A seguir são detalhados os pontos em comum aos processos dedicados à produção de etanol 2G, dentre eles, as etapas responsáveis pela inativação do OGM (Figura 17)ⁿ.

ⁿComo referência foi considerada a tecnologia PROESA™ (BetaRenewables). Detalhes em: <http://www.betarenewables.com>.

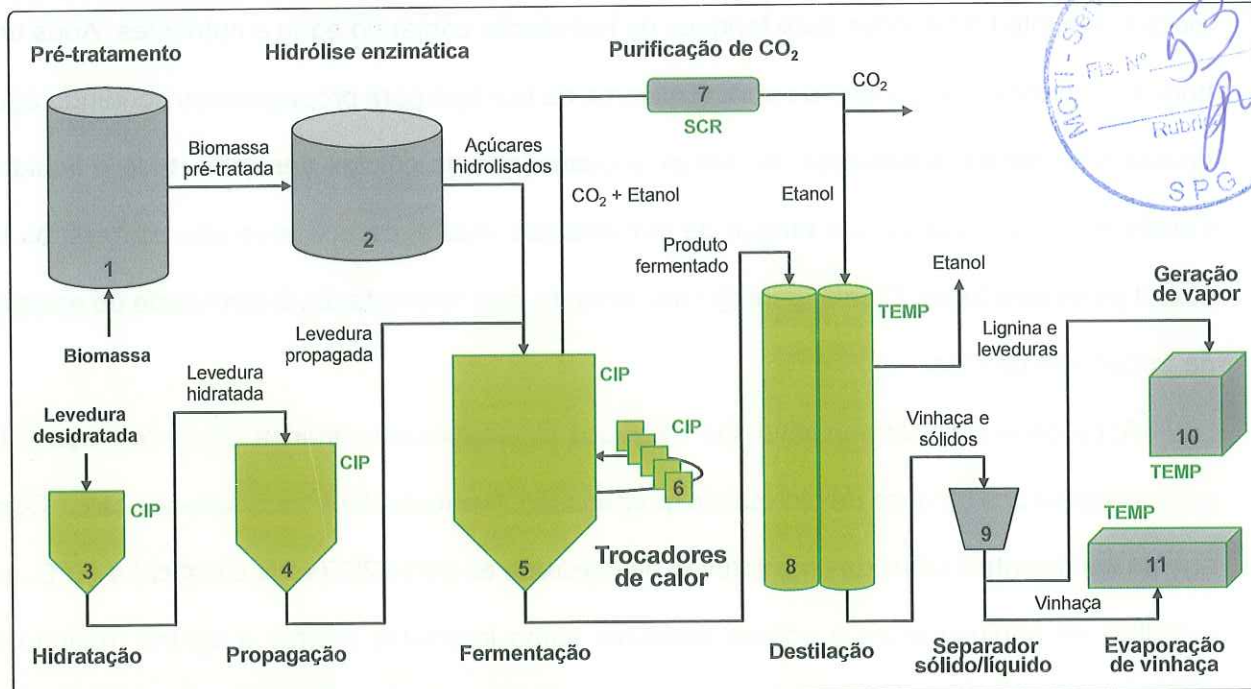


Figura 17: Representação esquemática das principais etapas da produção industrial de etanol de segunda geração. Em verde: equipamentos nos quais é esperada a presença temporária de leveduras viáveis; em cinza: equipamentos nos quais não são encontradas leveduras viáveis; contornos e informações em verde representam etapas do processo onde são aplicados procedimentos de rotina que promovem a inativação das leveduras. CIP: *Clean-In-Place*; TEMP: alta temperatura; SCR: *scrubber*. Após o pré-tratamento (1), a biomassa (i.e., celulose e hemicelulose) é hidrolisada por enzimas (2) e produz monômeros dos açúcares glicose e xilose. Estes são convertidos em etanol pelas leveduras durante a fermentação (5). A cada ciclo fermentativo novas leveduras são adicionadas ao processo, de forma que um pequeno volume é hidratado (3) e em seguida propagado até atingir a quantidade de células adequada. Trocadores de calor (6) acoplados aos tanques de fermentação são utilizados para manter a temperatura. O CO₂ gerado na fermentação é destinado para o sistema de lavagem de gases (7). O produto da fermentação (vinho) é encaminhado para as torres de destilação onde o etanol é recuperado (8). A vinhaça, (coproduto da destilação) separada em fases líquida e sólida (lignina + resíduos de leveduras mortas) (9). A fase sólida é inteiramente queimada para geração de vapor e eletricidade (10). A parte líquida é concentrada por evaporação (11) e aplicada no campo com um fertilizante devido ao auto teor de potássio.

Pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa:

Consiste em um tratamento térmico sob pressão para romper a matriz lignocelulósica que constitui a parede celular. O resultado é a solubilização da hemicelulose e a desestruturação da celulose, permitindo o acesso de enzimas hidrolíticas. Em seguida, as enzimas adicionadas ao processo agem diretamente sobre estes polímeros, hidrolisando-os a monômeros de glicose e xilose. Ambos os processos não utilizam leveduras ou quaisquer outros organismos.

Hidratação, propagação e fermentação:

Após a fermentação não há o reciclo das leveduras, observado frequentemente no processo de primeira geração, de modo que essas, precisam ser propagadas e adicionadas a cada ciclo fermentativo. Para isso, pequenos volumes de leveduras desidratadas são

mecanicamente transferidos para tanques de hidratação contendo água e nutrientes. Após uma hora, todo o volume é transferido por um sistema de bombas para propagadores contendo água, açúcar e nutrientes adequados. Ao atingir a quantidade de células desejada, todo o líquido é transferido novamente para o tanque de fermentação. Neste, os açúcares são convertidos em etanol pelas leveduras. O calor gerado naturalmente pela fermentação é controlado do emprego de trocadores de calor.

Após cada ciclo fermentativo são utilizados sistemas denominados *Clean-In-Place* (CIP) para assepsia dos tanques de hidratação, propagação, fermentação e trocadores de calor. Como agente sanitizante é utilizada uma solução de hidróxido de sódio 2% (soda cáustica) a 70°C, que esteriliza os equipamentos e sólidos residuais como leveduras mortas e lignina (resíduo da hidrólise). A água utilizada na assepsia é destinada para o sistema de tratamento de efluentes da planta industrial. Este sistema é tradicionalmente utilizado pelo processo convencional de produção de etanol de primeira geração e é conhecido pela eficiência na limpeza e desinfestação das dornas.

Lavador de gases do tipo Scrubber:

A corrente de CO₂ proveniente da fermentação é coletada e direcionada para o lavador de gases (*scrubber*) para evitar a perda de etanol por volatilização. Após esta etapa, a água saturada do purificador é enviada para a segunda coluna de destilação para recuperação do etanol e o CO₂ purificado é lançado na atmosfera.

A lavagem do CO₂ através dos *scrubber* evita, também, que leveduras eventualmente arrastadas pelos efluentes gasosos sejam lançadas no ambiente. Estas são enviadas para os destiladores onde são inativadas pela alta temperatura empregada na etapa de destilação.

Destilação:

O produto fermentado é bombeado para os destiladores onde o etanol é recuperado pelo processo de destilação que ocorre entre 80-85°C por 10-15 minutos. Como detalhado na seção 3.2 pág. 105, esta é uma condição altamente eficiente na inativação de leveduras, inclusive para

a linhagem Celere-2L. Por essa razão, não é esperado encontrar leveduras viáveis após esta etapa.



Queima dos sólidos e evaporador de vinhaça:

A vinhaça formada após a destilação é direcionada para uma unidade de separação sólido/líquido que utiliza um sistema de filtros e prensas. A fração composta por lignina e resíduos de leveduras mortas é prensada, obtendo-se um material com aproximadamente 40-50% de umidade (torta de lignina). Esta fração sólida é queimada em caldeiras para gerar vapor, que por sua vez é convertido em eletricidade. Nas caldeiras, a temperatura aplicada ultrapassa 500°C.

A fração líquida resultante da destilação e prensa é redirecionada para um sistema de concentração por evaporação, onde são aplicadas temperaturas de 67-103°C por longos períodos. Como na primeira geração, a vinhaça (concentrada a 40-50%) é aplicada nos campos de cana-de-açúcar como fertilizante, devido ao alto conteúdo de potássio e outros nutrientes. A água evaporada nesta etapa é reaproveitada no pré-tratamento.

Atualmente, Brasil e Estados Unidos produzem anualmente cerca de 75 bilhões^{o,p} de litros de bioetanol de primeira geração, utilizando linhagens selvagens de *S. cerevisiae* para fermentar açúcares derivados da sacarose e do amido, respectivamente. No entanto, a possibilidade de utilizar também a biomassa vegetal vem se mostrando economicamente viável após muitos anos de pesquisa⁸⁵. Neste contexto, cada vez mais linhagens serão desenvolvidas para a conversão de diferentes biomassas em etanol e/ou outras biomoléculas.

Como exemplo, em apenas quatro anos, cinco micro-organismos geneticamente modificados foram avaliados pela CTNBio com pareceres favoráveis a comercialização no Brasil. Estes incluem duas leveduras para produção de farneseno, precursor do biodiesel (Amyris - 2010/2012 | processos nº 01200.003590/2009-85 e 01200.003977/2011-56); uma microalga para produção de triglicerídeos, utilizados na indústria de oleoquímicos (Solazyme - 2013 |

^oÚNICA. União da Indústria de Cana-de-açúcar. Detalhes em: <http://www.unica.com.br>.

^pRFA. Renewable Fuels Association. Detalhes em: <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>.

processo nº 01200.001052/2013-32) e; a linhagem RN1016, desenvolvida para produzir etanol de segunda geração (BioCelere - 2013 | processo nº 01200.001454/2013-37)⁹.

O evento RN1016, em particular, é extremamente semelhante à linhagem Celere-2L avaliada neste relatório. Além do uso pretendido, possuem em comum: um único transgene cujo produto da tradução é equivalente e exerce a mesma função (embora as sequências nucleotídicas e de aminoácidos possuam diferenças); apresentam modificações genéticas dos mesmos genes endógenos (realizadas de modo diferente); não serão destinadas à alimentação humana/animal e; compartilham o mesmo organismo parental, a levedura *S. cerevisiae*. Por essas razões, é esperado para a Celere-2L a mesma ausência de risco à saúde humana, animal ou ao ambiente demonstrada para a RN1016.

Em resumo, o uso pretendido para a linhagem Celere-2L é restrito a processos industriais dedicados à produção de etanol de segunda geração, de forma que seu uso como alimento direto ou aditivo para ração animal não é propósito desta solicitação. O transgene também possui função restrita, relacionada apenas ao consumo do açúcar xilose que, por isso, possibilita um maior aproveitamento da matéria-prima para produção de etanol.

Adicionalmente, a rotina de assepsia das tubulações e tanques onde as leveduras são utilizadas, associada aos tratamentos com alta temperatura em etapas pós-fermentação, reduzem um eventual risco ambiental quando o contexto industrial é avaliado.

Embora o uso pretendido contribua significativamente para a ausência de riscos relacionados ao uso da linhagem Celere-2L, são apresentados a seguir os resultados experimentais que confirmam a prerrogativa de que a linhagem em si também não representa riscos ao meio ambiente (em conformidade com as exigências previstas no Anexo IV da Resolução Normativa N°5, de 12 de março de 2008).

⁹CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Liberações comerciais. Detalhes em <http://www.ctnbio.gov.br>.

3.1. Sobre a possibilidade de o OGM produzir esporos e ser resistente ao dessecação



Em *S. cerevisiae* a esporulação é induzida quando as células diplóides encontram-se em uma condição de deficiência de nutrientes. A formação de esporos envolve uma divisão celular distinta do brotamento observado durante a mitose (Figura 18A). Este processo compreende a segregação dos cromossomos através da meiose, resultando em quatro núcleos individualizados por uma membrana plasmática formada dentro do citoplasma da célula mãe. Após a formação completa dos esporos, a célula mãe se torna um asco e mantém as quatro novas células haplóides organizadas em uma estrutura conhecida como tétrade (revisado por Neiman¹⁴) (Figura 18B-C).

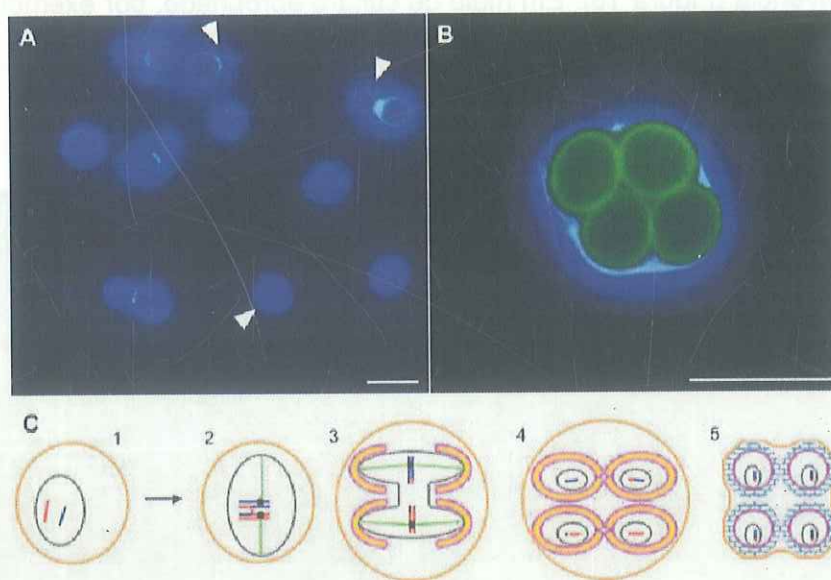


Figura 18: Diferentes fases da divisão celular na espécie *S. cerevisiae*.

A: Células da linhagem diplóide PE2 dividindo por brotamento (mitose). Notar os diferentes estágios da divisão indicado pelo tamanho dos brotos (setas). B: Tétrade resultante da meiose de uma célula diploide da linhagem PE2. Notar a presença dos quatro esporos (verde) organizados dentro de um asco (azul). Células marcadas com Calcofluor White (azul) e FDA (verde). Escala: 10 μ m. Fonte: GranBio Celere. C: Representação esquemática dos principais eventos envolvidos na formação dos esporos através da meiose em *S. cerevisiae*. 1: Pré-meiose, fase S do ciclo celular; duplicação do DNA. 2: Pareamento dos cromossomos homólogos e *crossing-over*. 3: Meiose I, segregação dos cromossomos homólogos. 4: Meiose II, síntese de membrana celular ao redor dos esporos. 4: Fechamento das membranas individualizando os esporos. 5: Montagem da parede do esporo e maturação do asco. Linhas laranja: membrana celular da célula mãe (a qual se torna membrana do asco). Linha cinza: membrana nuclear. Linhas azul e vermelho: cromossomos homólogos. Linha verde: microtúbulos. Linha rosa e amarelo: membrana do esporo. Quadriculado azul: parede do esporo. Adaptado de Neiman¹⁴.

O mecanismo molecular da esporulação é bem compreendido e as sucessivas fases envolvidas neste processo são promovidas por uma cascata de regulação transcricional que orchestra tanto a meiose quanto a formação de esporos. Entre os elementos envolvidos, o fator de transcrição *IME1* (*Inducer of MEiosis 1*) atua como o principal regulador da esporulação.

Quando ativo, induz a expressão de genes chave requeridos para o início da meiose em células diplóides, incluindo o fator de transcrição *NDT80* (*Non-DiTyrosine 80*). A expressão de *IME1*, por sua vez, é regulada tanto a nível pós-transcricional quanto pós-traducional por uma série de fatores incluindo: fonte de nitrogênio, fonte de carbono e *mating type*⁸⁶⁻⁸⁸.

A capacidade de esporular de *S. cerevisiae* é uma condição particular desta espécie. Ao contrário de outros fungos, plantas ou bactérias, os esporos não são estruturas diferenciadas para dispersão, ou formas de resistência adaptadas para sobreviver em condições extremas. Uma vez liberados do asco, os haplóides são células morfologicamente idênticas às células diplóides, se dividem igualmente por mitose e realizam as mesmas reações metabólicas chave para a sobrevivência (Figura 19). Em meio de cultura apropriado, por exemplo, são capazes de consumir todo o açúcar e produzir etanol de forma equivalente ao diploide⁷⁵.

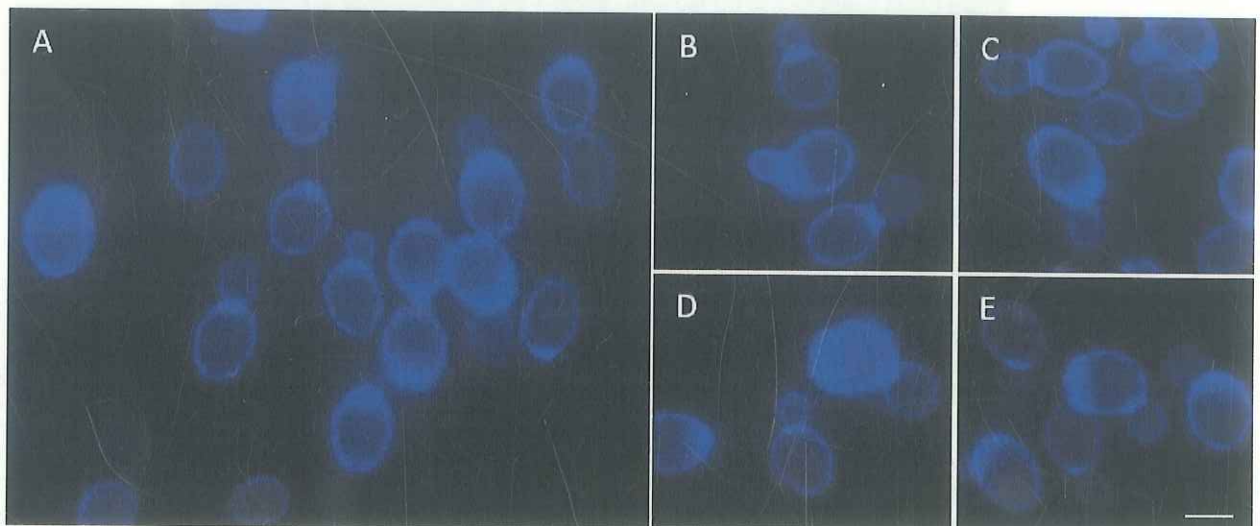


Figura 19: Morfologia das células haplóides e diplóides da linhagem OGM.

A: Diplóide. B-E: Haplóides. Células observadas em microscopia de epifluorescência e marcadas com Calcofluor White. Este é um corante de alta afinidade para quitina, principal componente da parede celular de *S. cerevisiae*. Notar a semelhança do tamanho e forma entre o diplóide e haplóides. Imagens capturadas em microscópio de epifluorescência Olympus-BX51 com câmara digital DP72 acoplada. Barra=5µm.

Por essas razões, a esporulação em *S. cerevisiae* é considerada apenas uma resposta à ausência de nutrientes. Em condições ambientais similares, haplóides simplesmente cessam o metabolismo, enquanto células diplóides associam este processo à meiose¹⁴. Além disso, em muitos tratamentos desenhados para mimetizar condições ambientais extremas, como ciclos repetitivos de congelamento/descongelamento ou o dessecamento, os esporos não são mais resistentes do que células diplóides na fase estacionária do crescimento⁸⁹.

Para avaliar a capacidade de resistir ao dessecamento o teste quantitativo proposto por Winston e colaboradores⁹⁰ foi realizado com as linhagens diplóides Celere-2L e parental. Resumidamente, células de ambas as linhagens coletadas durante as fases exponencial e estacionária do crescimento, foram submetidas ao dessecamento por 12 e 24 horas em SpeedVacTM (Thermo Scientific). Após o tratamento, células foram reidratadas em tampão fosfato e plaqueadas para contagem de células viáveis (unidades formadoras de colônias - UFCs). A capacidade de resistir ao dessecamento foi dada pela viabilidade relativa: média de UFC/mL da amostra dessecada pela média UFC/mL do controle (não dessecado) (Método 4.13, pág. 151).

Como apresentado na figura 20, não houveram diferenças significativas entre OGM e parental em ambos os pontos amostrados. De modo interessante, ambas as linhagens são significativamente afetadas pela condição de estresse, que reduz a viabilidade celular para menos de 20% em 12 horas de dessecamento. Após 24 horas não foram observadas células viáveis.

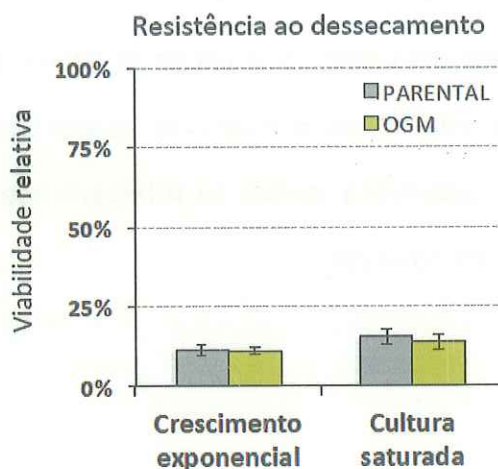


Figura 20: Análise da resistência ao dessecamento das linhagens OGM e parental.

Nota-se que após 24 de dessecamento a viabilidade de ambas as linhagens reduz significativamente. Após 48 horas não são observadas células viáveis. Diferenças estatisticamente significativas entre OGM e parental não foram observadas (Teste t com $p > 0,05$).

A equivalência observada entre as linhagens OGM e parental demonstra que as modificações genéticas não tornam o OGM mais resistente ao dessecamento. Além disso, a alta suscetibilidade observada reforça a premissa de que em *S. cerevisiae* (inclusive o OGM avaliado) a capacidade de esporular não está relacionada a resistir a este estresse ambiental.

A resistência à dessecação é a habilidade de um organismo suportar a remoção de até 95% de seu conteúdo de água e restaurar o metabolismo normal após reidratação (Crowe et al. 1992). Esta tolerância é normalmente encontrada em sementes, as quais contêm embriões dessecados e, raramente, em adultos extremófilos, como bactérias do gênero *Deinococcus*, fungos, briófitas e alguns nematoides (camarões de água salgada, por exemplo)⁹¹.

Esta condição impõe às células um variado número de estresses incluindo: hiper-osmolaridade, hiper-oxidação, hiper-ionicidade e agregação ou não enovelamento de proteínas^{92,93}. Todos impõem danos irreversíveis a componentes essenciais da células, como: o DNA, proteínas e membranas⁹⁴⁻⁹⁶.

A resposta ao dessecamento vem sendo estudada por muitos anos e diversas moléculas que mitigam os efeitos dos diferentes estresses observados foram identificadas. Incluem proteínas *heat shock*, enzimas de balanço redox, pequenas proteínas hidrofílicas e o dissacarídeo trealose^{91,97,98}. Uma vez que os genes introduzidos ou manipulados na linhagem OGM não codificam ou induzem a síntese destas moléculas, não é esperado que as manipulações genéticas atribuam ao OGM uma maior resistência em relação ao seu parental.

Em conclusão, a linhagem Celere-2L é capaz de esporular assim como seu parental. No entanto, o risco ambiental relacionado a resistir ao dessecamento pode ser desconsiderado, dado que apesar desta característica, ambas as linhagens são altamente suscetíveis a curtos períodos de exposição à esta condição.

3.2. Os agentes esterilizantes e antimicrobianos que possuem atividade contra o OGM

A possibilidade de desinfestação/esterilização de superfícies ou soluções é fundamental para a manipulação apropriada de micro-organismos. Para isto, agentes químicos são amplamente utilizados na indústria com o objetivo de eliminar contaminações ou inativar micro-organismos empregados no processo. Os principais agentes são constituídos por compostos iodados, cloro, quaternários de amônio, ácidos, álcoois, agentes gasosos e antibióticos, os quais possuem uma alta capacidade esterilizante sobre micro-organismos da flora ambiental⁹⁹.

Indústrias que utilizam micro-organismos em seus sistemas produtivos dependem da ação de bons agentes esterilizantes químicos em seus processos. Não é diferente para as usinas de açúcar e álcool, que utilizam agentes sanitizantes para fazer a assepsia periódica de suas dornas e tubulações periodicamente, evitando contaminações que normalmente impactam negativamente no rendimento produtivo.

Entre estes, o etanol e o hipoclorito de sódio se destacam por serem amplamente utilizados como agentes sanitizantes em ambientes hospitalares, clínicas e laboratórios de microbiologia. Na categoria dos antibióticos, por sua vez, geneticina e higromicina são altamente eficientes contra leveduras da espécie *S. cerevisiae*, sendo inclusive, amplamente utilizados como marcadores de seleção de transformantes^{100,101}.

Em relação ao OGM avaliado neste relatório, não é esperado que as manipulações genéticas confirmem maior tolerância à algum agente esterilizante ou antimicrobiano. Para comprovar esta premissa, OGM e parental foram submetidos a cinco tratamentos sanitizantes independentes incluindo: hipoclorito de sódio, etanol, higromicina e geneticina, como agentes químicos; e a temperatura, como agente físico.

Resumidamente, nos tratamentos com agentes químicos, quatro réplicas biológicas de cada linhagem (OGM e parental) foram submetidas a tratamentos com concentrações crescentes de cada agente. O crescimento na condição de estresse foi quantificado após 24 horas (Método 4.16, pág. 154), enquanto a viabilidade das culturas foi avaliada depois de 0, 6, 12 e 24 horas de tratamento com cada composto (Método 4.15, pág. 153).

3.2.1. Efeito do hipoclorito de sódio sobre o OGM

Meio padrão (YEPD) contendo cinco concentrações de hipoclorito de sódio [YEPDhs 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8% (v/v)] foi utilizado para avaliar a atividade deste agente no crescimento das linhagens OGM e parental. YEPD sem o agente foi utilizado como condição controle. Como demonstrado na figura 21A, ambas as linhagens (OGM e parental) não apresentaram crescimento nos tratamentos cuja concentração utilizada foi igual ou superior a 0,1% (v/v). Além disso, a linhagem OGM apresentou uma menor taxa de crescimento ($DO=1,53\pm0,02$) em relação ao parental ($DO=1,69\pm0,05$) na menor concentração utilizada [0,05% (v/v)]. Na condição controle, o crescimento das duas linhagens foi equivalente: $1,66\pm0,09$ e $1,67\pm0,05$ para parental e OGM, respectivamente.

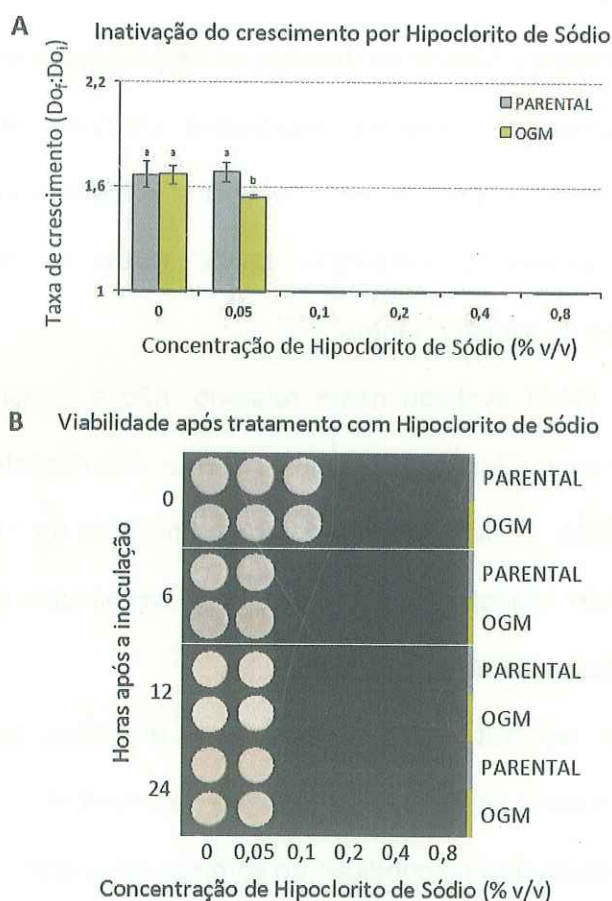


Figura 21: Efeito do hipoclorito de sódio no crescimento e viabilidade do OGM e parental.

A: Quantificação do crescimento (após 24 horas) das linhagens OGM e parental em meio contendo diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. B: Análise da viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Nota-se que ambas as linhagens são suscetíveis a tratamentos com baixas concentrações e curto período, devido à alta eficiência de esterilização do hipoclorito de sódio. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p<0,05$).

Analisando a viabilidade das culturas em função do tempo, observou-se novamente que a suscetibilidade ao hipoclorito de sódio é equivalente entre o OGM e seu parental. O tratamento por seis horas com concentrações maiores ou igual a 0,1% (v/v) foi suficiente para inativação de ambas as culturas. Além disso, concentrações maiores ou superiores a 0,2% (v/v) possuem efeito imediato, demonstrando a eficiência da ação deste agente sobre o OGM e parental (Figura 21B).

3.2.2. Efeito do etanol sobre o OGM

De forma similar, cinco concentrações de etanol foram utilizadas para demonstrar sua ação como agente esterilizante. Para isto, o crescimento das linhagens OGM e parental foi quantificado após tratamento com 2,5, 5, 10, 20 e 40% (v/v) de etanol (YEPDet). Na presença de baixa concentração de etanol [YEPDet 2,5 e 5%(v/v)] ambas as linhagens podem utilizá-lo como fonte de carbono após o consumo completo da glicose. No entanto, acima de 10% (v/v) o etanol tende a agir como agente esterilizante, especialmente sobre a linhagem OGM que apresentou uma taxa de crescimento discretamente menor em YEPDet 10% (v/v) ($DO=1,69\pm0,06$) em comparação com o controle ($DO=1,89\pm0,06$), 2,5% (v/v) ($DO=2,03\pm0,01$) e 5% (v/v) ($2,05\pm0,02$) (Figura 22A). Os resultados mostram ainda que concentrações maiores ou iguais a 20% (v/v) são suficientes para inibir completamente o crescimento de ambas as linhagens. Na condição controle (YEPD) a taxa de crescimento foi equivalente (OGM: $1,89\pm0,06$; parental: $1,90\pm0,07$).

Resultados similares foram obtidos nos testes semi-quantitativos, confirmando a suscetibilidade de ambas as linhagens à 20% (v/v) de etanol e; demonstrando que após 12 horas ocorre a inativação completa de ambas as linhagens nesta concentração. Além disso, é possível notar que em meio contendo 40% (v/v) de etanol a inativação do crescimento é imediato para ambas as linhagens (Figura 22B).

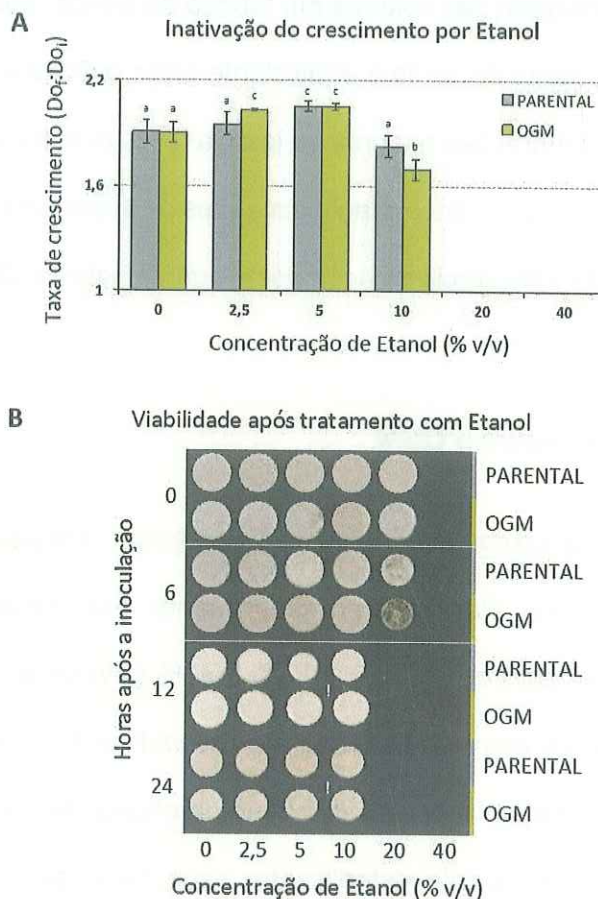


Figura 22: Efeito do etanol no crescimento e viabilidade do OGM e parental.

A: Quantificação do crescimento (após 24 horas) das linhagens OGM e parental em meio contendo diferentes concentrações de etanol. B: Análise da viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de etanol. Nota-se suscetibilidade de ambas as linhagens em tratamentos com baixas concentrações e curto período. *a,b,c*: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p < 0,05$).

3.2.3. Efeito da higromicina sobre o OGM

Nos testes com o antibiótico higromicina observa-se um efeito esterilizante dose-dependente equivalente entre ambas as linhagens (Figura 23A). Nos controles (YEPD sem antibiótico), a taxa de crescimento das linhagens OGM e parental foram equivalentes ($1,71 \pm 0,02$; $1,69 \pm 0,04$). No entanto, 25 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina (YEPDhg 25 $\mu\text{g/mL}$) foram suficientes para reduzir em 20% (em média) a taxa de crescimento das linhagens OGM e parental ($1,34 \pm 0,13$; $1,39 \pm 0,04$) em relação à condição controle. Tratamentos com concentrações maiores ou iguais a 50 $\mu\text{g/mL}$ foram suficientes para inibir completamente o crescimento de ambas as linhagens.

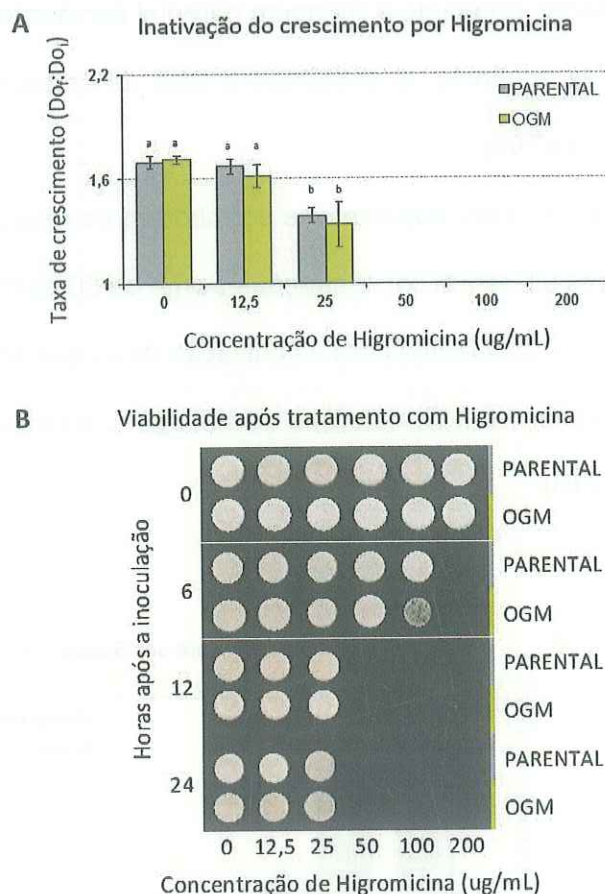


Figura 23: Efeito do antibiótico higromicina sobre o crescimento e viabilidade do OGM e parental.

A: Quantificação do crescimento (após 24 horas) das linhagens OGM e parental em meio contendo diferentes concentrações de higromicina. B: Análise da viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de higromicina. Nota-se suscetibilidade equivalente de ambas as linhagens em tratamentos com baixas concentrações e curto período. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p < 0,05$).

A inativação do crescimento observada após 24 horas de tratamento foi confirmada nos testes semi-quantitativos. Além disso, os resultados demonstram que 50 e 100 ug/mL de higromicina são 100% eficientes após 12 horas de tratamento. Utilizando 200 ug/mL o tratamento foi ainda mais efetivo, sendo necessárias apenas 6 horas para a inviabilização completa de ambas as culturas (Figura 23B).

3.2.4. Efeito da geneticina sobre o OGM

Geneticina foi o segundo antibiótico testado e também apresentou uma ação esterilizante efetiva sobre o OGM e seu parental. Quando empregadas concentrações superiores a 50 ug/mL (YEPDgt 50, 100 e 200 ug/mL) não é observado crescimento para ambas as linhagens após 24 horas de tratamento (Figura 24A). Neste experimento, o tratamento com 25 ug/mL foi suficiente

para inibir seu crescimento, enquanto a linhagem parental apresentou uma taxa de crescimento igual $DO=1,14\pm0,05$. Na ausência de antibiótico a taxa de crescimento é equivalente (OGM: $1,84\pm0,02$; parental: $1,84\pm0,05$).

Novamente, os testes semi-quantitativos corroboram os resultados observados. Além da inativação após 24 horas utilizando concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina, é possível observar que 12 horas são suficientes para a inativação de ambas as culturas quando 50 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico são utilizadas. Além disso, acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ a inativação é efetiva após 6 horas de tratamento (Figura 24B).

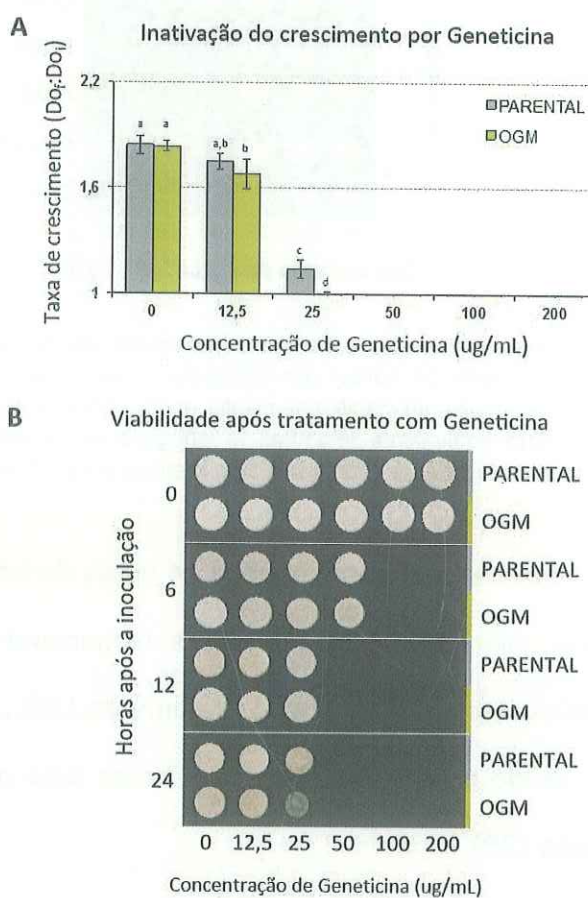


Figura 24: Efeito do antibiótico geneticina sobre o crescimento e viabilidade do OGM e parental.

A: Quantificação do crescimento (após 24 horas) das linhagens OGM e parental em meio contendo diferentes concentrações de geneticina. B: Análise da viabilidade celular após o tratamento com diferentes concentrações de geneticina. Nota-se suscetibilidade equivalente de ambas as linhagens em tratamentos com baixas concentrações e curto período. ^{a,b,c}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p<0,05$).

3.2.5. Efeito da temperatura sobre o OGM



Por fim, um quinto experimento foi utilizado para demonstrar a eficiência da temperatura como agente esterilizante. De forma semi-quantitativa, a sobrevivência do OGM e de seu parental foi avaliada em trinta condições independentes. Resumidamente, três réplicas biológicas de cada linhagem foram crescidas previamente em YEPD até atingirem a saturação da cultura ($DO_{600}=12\pm0,12$). Alíquotas de 1 mL foram incubadas a 30, 50, 60, 70 ou 80°C por 0 ou 30 segundos; 1, 2:30, 5 ou 10 minutos e então, utilizadas para avaliar a viabilidade de cada cultura após os tratamentos (Método 4.15, pág. 153).

É importante destacar que a alta densidade celular (culturas saturadas com $DO_{600}=12\pm0,12$) e o tratamento mais severo utilizado (80°C por 10 minutos) mimetizam as condições que encontradas na destilação aplicada na produção industrial de etanol. Por essa razão, a sobrevivência das culturas mantidas nesta condição foi avaliada de forma quantitativa, na qual a viabilidade de cada cultura é representada pelo número de unidades formadoras de colônias (UFCs) observado após o tratamento (Método 4.17, pág. 154). Como demonstrado na figura 25A, as linhagens OGM e parental são eficientemente desvitalizadas por este tratamento. Como esperado, na condição controle (30°C por 10 minutos) a viabilidade de ambas as culturas é equivalente (OGM= $3,23\pm0,15 \times 10^8$; parental= $3,3\pm0,28 \times 10^8$ UFCs/mL).

A tolerância à temperatura depende da intensidade e do tempo utilizados e, dessa forma, a viabilidade de ambas as culturas é inversamente proporcional ao aumento destes dois fatores. Como demonstrado na figura 25B a viabilidade de OGM e parental não é afetada na condição controle (0 min) e em temperaturas menores ou igual a 50°C quando mantidas por um período menor ou igual a cinco minutos. O mesmo acontece a 60°C/0:30min. No entanto, condições cuja as temperaturas/tempos são maiores ou iguais a 60°C/1min ou 70°C/0:30min, são críticas para ambas as culturas. A partir deste ponto a viabilidade celular das linhagens OGM e parental é consideravelmente reduzida.

É conhecido que diferentes linhagens da espécie *S. cerevisiae* apresentam naturalmente menor ou maior capacidade de tolerar aumentos de temperatura. Além disso, a capacidade de resistir maiores variações da temperatura pode ser adquirida através de manipulações

direcionadas, adicionando ou modificando a expressão de genes específicos¹⁰²⁻¹⁰⁴. No entanto, as modificações genéticas empregadas na construção do OGM estão estritamente relacionadas ao metabolismo específico de xilose e conversão deste açúcar em etanol, por essa razão, não é esperado que o OGM adquira maior capacidade de resistir a altas temperaturas.

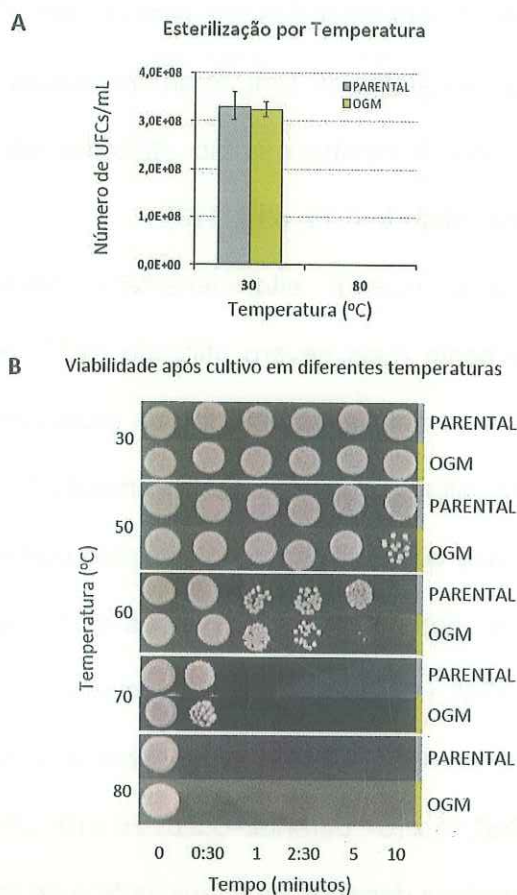


Figura 25: Efeito da temperatura sobre o crescimento e viabilidade do OGM e parental.

A: Quantificação do crescimento das linhagens OGM e parental após tratamento térmico a 30°C e 80°C. B: Análise da viabilidade celular após o tratamento com diferentes temperaturas. Nota-se que ambas as linhagens são suscetíveis a tratamentos com temperaturas consideravelmente inferiores àquelas empregadas no processo de destilação. Diferenças estatisticamente significativas entre OGM e parental não foram observadas no teste quantitativo d (Teste t com $p > 0,05$).

Acima de 60°C/10min e 70°C/1min ambas as culturas foram completamente inativadas e, a 80°C, a esterilização é praticamente instantânea, uma vez que após trinta segundos de incubação não são mais obtidas células viáveis (Figura 25B).

Comparado com o teste quantitativo (Figura 25A), o qual mimetiza a condição encontrada na indústria durante a etapa de destilação, é possível notar a esterilização das culturas ocorre em um faixa de temperatura/tempo bem menor do que a empregada na destilação industrial. Do ponto de vista de risco ambiental, além de demonstrar a eficiência da temperatura como um

agente esterilizante para ambas as linhagens, estes resultados reforçam a prerrogativa de que a etapa de destilação é suficiente para inativar completamente as leveduras *in loco* (i.e., no interior do processo), garantindo que os produtos da indústria (etanol e vinhaça) não contenham formas viáveis do OGM.



Como detalhado anteriormente, a destilação é imprescindível para a recuperação do etanol produzido na indústria e, uma vez que promove a esterilização do produto fermentado, representa uma etapa importante para segurança intrínseca ao processo. O mesmo conceito vale para as outras etapas do processo pós-fermentação que incluem o emprego de altas temperaturas (seção 3, pág. 93).

FIN 17/11/2003

3.3. Os possíveis efeitos do OGM sobre a qualidade da água, do ar e do solo



3.3.1. Análise dos efeitos do OGM sobre a qualidade da água

A ecotoxicidade foi a abordagem utilizada para avaliar as implicações do OGM sobre a qualidade da água. Uma vez que compreende uma extensão da toxicologia¹, a ecotoxicologia avalia o impacto de compostos químicos (naturais ou sintéticos) sobre os ecossistemas. Tem como principal objetivo compreender os efeitos de tais compostos sobre as comunidades naturais em condições reais ou próximas da realidade¹⁰⁵. Em ambientes aquáticos o objetivo primário deste ensaio consiste na avaliação do grau de impacto, reversibilidade e determinação qualitativa e quantitativa do risco à exposição¹⁰⁶. Neste contexto, o teste de ecotoxicidade realizado foi constituído de três abordagens complementares: i) ensaios de toxicidade aguda com organismos indicadores; ii) análises das propriedades físicas e químicas da água e; iii) análise da comunidade microbiana da água.

Os testes de toxicidade e as análises das propriedades físicas e químicas da água foram conduzidos pelo laboratório TECAM^s (CQB 0153/01). Em resumo, os ensaios de toxicidade aguda consistem na observação e quantificação do comportamento (mobilidade) ou mortalidade dos organismos indicadores, mantidos em condições controladas acrescidas de diferentes concentrações do agente supostamente tóxico, neste caso o OGM. Nestas mesmas condições as propriedades químicas e físicas da água são determinadas a partir do pH e do teor de oxigênio dissolvido, ambos quantificados antes e ao final dos ensaios (detalhes no material suplementar: relatórios 0 e 5.4, págs. 173 e 221).

Dois organismos foram utilizados nos ensaios de toxicidade aguda: o microcrustáceo da espécie *Daphnia similis* e o peixe *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha ou zebrafish. Por apresentarem alta sensibilidade a alterações no ambiente aquático, ambos se destacam entre os organismos normalmente utilizados como indicadores da qualidade da água¹⁰⁷. Além disso, estes são também organismos sistematicamente utilizados uma vez que todos os procedimentos empregados nestes ensaios seguem normas da Associação Brasileira

¹Ciência multidisciplinar que tem como objeto de estudo os efeitos adversos das substâncias químicas sobre os organismos.

^sTECAM Laboratórios. Laboratório especializado em ensaios de toxicidade. Detalhes em <http://www.tecam.com.br>.

de Normas Técnicas (ABNT), possibilitando a reprodutibilidade e aumentando confiabilidade dos resultados (Relatórios 0 e 5.4, págs. 173 e 221).

Três experimentos independentes (i.e., triplicata biológica) foram realizados para avaliar a toxicidade do OGM em relação ao seu parental. Em resumo, soluções contendo as leveduras OGM ou parental (inóculos) foram preparadas a partir de culturas independentes crescidas em meio YEPD. Para mimetizar as condições encontradas nos processos industriais de segunda geração a concentração de leveduras foi ajustada para 15g/L (massa úmida), densidade celular atingida ao final de cada ciclo fermentativo (Método 4.18, pág. 154). Nos testes com *D. similis* e *D. rerio* a ABNT determina que cinco concentrações da substância em questão (OGM) sejam avaliadas. Dessa forma, os inóculos (15g/L) foram adicionados aos testes de forma que correspondessem a 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2% (v/v) do volume total de cada ensaio, ou seja, 18,75; 37,5; 75; 150 e 300 mg/L de levedura respectivamente (Relatórios 5.3 e 5.4, págs. 173 e 221).

É importante ressaltar que é altamente improvável uma situação semelhante ocorrer em escala real, uma vez que o volume trabalhado na indústria é irrisório quando comparado ao de lagos ou cursos d'água de tamanho mediano ou até mesmo reduzido.

Ensaio de toxicidade aguda com o organismo indicador Daphnia similis

D. similis foi o primeiro indicador avaliado. Neste ensaio, a toxicidade é calculada pela concentração nominal do agente capaz de causar a imobilidade de 50% dos organismos nas condições de ensaio após 48 horas [CE(I)₅₀; 48h]. Em outras palavras, uma substância deve ser considerada tóxica quando provoca a imobilidade de pelo menos 50% dos organismos indicadores. Além disso, o experimento só é válido se a taxa de imobilidade da condição controle for menor ou igual a 10%.

No ensaio com *D. similis* a porcentagem de organismos-teste imóveis na condição controle foi menor que 5%, validando o ensaio (Tabela 1). Organismos imóveis também foram observados em alguns tratamentos contendo leveduras. Porém, de acordo com a Prova Exata de Fisher¹⁰⁸ a taxa de imobilidade observada não foi significativa, mesmo na maior concentração preparada (Tabela 1). Como pode ser observado, a maior taxa de imobilidade é de 3±3% nas condições

OGM/0,125% e parental/2%. Por essa razão, a $CE(I)_{50}$; 48h de ambas as linhagens é superior a 2%, demonstrando que ambas as linhagens não são tóxicas, mesmo a alta concentração de células viáveis aplicada (relatório 5.3 e pág. 173).



Tabela 1: Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre OGM e parental de acordo com a Prova Exata de Fisher.

Concentração celular (mg/L) (% v/v) ¹	Taxa de indivíduos vivos (%)					
	Parental (n=5)			OGM (n=5)		
Controle ²	95,8	±	1,18	95,8	±	1,18
18,75 (0,125%)	100,0	±	0,00	96,7	±	2,89
37,5 (0,25%)	100,0	±	0,00	100,0	±	0,00
75 (0,5%)	98,3	±	2,89	100,0	±	0,00
150 (1%)	98,3	±	2,89	100,0	±	0,00
300 (2%)	96,7	±	2,89	100,0	±	0,00

n=número de organismos-teste utilizados em cada réplica.

¹(% v/v): Porcentagem do inóculo em relação ao volume total do ensaio.

²Condição controle (i.e., água original sem aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

Propriedades físicas e químicas da água durante ensaio com Daphnia similis

Três condições foram escolhidas para avaliar as propriedades físicas e químicas da água nos testes com *D. similis*: 0,125; 0,5 e 2%. Como esperado, a aplicação das leveduras (independentemente da concentração) provoca pequenas alterações equivalentes no pH em relação à condição controle (sem leveduras) (Tabela 2). Por outro lado, quando os tratamentos com OGM e parental são comparados entre si, as variações também são equivalentes e estatisticamente não significativas, tanto no início como ao final do ensaio.

Resultados semelhantes foram observados para o teor de oxigênio dissolvido (

Tabela 3). Na maior concentração empregada a concentração de oxigênio da condição controle ($7,10 \pm 0,0$) foi alterada para $5,68 \pm 0,21$ e $5,90 \pm 0,32$ (Parental e OGM/2%). Nos outros tratamentos as variações foram menores. Quando os resultados obtidos para OGM e parental são comparados a cada tratamento, todas as alterações não são estatisticamente significativas, exceto para 0,125%. Neste caso, a concentração de O_2 foi menor no grupo tratado com OGM

(7,88±0,04 mg O₂/L) em relação ao parental (7,97±0,02 mg O₂/L) ao final do experimento. No entanto, esta alteração não é suficiente para tornar o inóculo tóxico ao organismo testado.

Tabela 2: Análise do pH da água após testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas).

Concentração celular (mg/L) (% v/v) ¹	pH inicial		pH final ³	
	Parental (n=5)	OGM (n=5)	Parental (n=5)	OGM (n=5)
Controle ²	7,33 ± 0,00	7,33 ± 0,00	6,89 ± 0,00	6,89 ± 0,00
18,75 (0,125%)	6,98 ± 0,06	7,04 ± 0,05	6,98 ± 0,02	6,94 ± 0,02
75 (0,5%)	6,98 ± 0,06	7,08 ± 0,01	7,00 ± 0,01	6,98 ± 0,05
300 (2%)	6,94 ± 0,02	6,99 ± 0,02	7,00 ± 0,01	7,00 ± 0,02

n=número de organismos-teste utilizados.

¹(% v/v): Porcentagem do inóculo em relação ao volume total do ensaio.

²Condição controle (i.e., água original antes da aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

³Após 48 horas.

Tabela 3: Concentração do oxigênio dissolvido em testes de toxicidade com *Daphnia similis*. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas).

Concentração celular (mg/L) (% v/v) ¹	O ₂ inicial (mg O ₂ /L)		O ₂ final ³ (mg O ₂ /L)	
	Parental (n=5)	OGM (n=5)	Parental (n=5)	OGM (n=5)
Controle ²	7,10 ± 0,00	7,10 ± 0,00	7,96 ± 0,00	7,96 ± 0,00
18,75 (0,125%)	7,03 ± 0,21	6,94 ± 0,20	7,97 ^a ± 0,02	7,88 ^b ± 0,04
75 (0,5%)	6,84 ± 0,04	6,82 ± 0,10	7,91 ± 0,03	7,86 ± 0,03
300 (2%)	5,68 ± 0,21	5,90 ± 0,32	7,69 ± 0,19	7,79 ± 0,04

n=número de organismos-teste utilizados.

¹(% v/v): Porcentagem do inóculo em relação ao volume total do ensaio.

²Condição controle (i.e., água original antes da aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

³Após 48 horas.

^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com p<0,05).

Ensaio de toxicidade aguda com o organismo indicador *Danio rerio*

Nos ensaios com *D. rerio*, segundo indicador testado, a toxidade é estabelecida pela concentração da amostra capaz de causar a letalidade de 50% dos organismos nas condições de ensaio após 96 horas [CL(I)₅₀; 96h]. Em outras palavras, uma substância deve ser considerada tóxica quando provoca a mortalidade de pelo menos 50% dos organismos indicadores após 96 horas.

Durante este período, são feitas observações sobre as condições dos organismos a cada 24 horas, sendo registrado: mortalidade, movimentos anormais de natação e quaisquer outras irregularidades. Apesar da baixa mortalidade observada (Tabela 4), ambas as amostras (OGM

e parental) não exerceram efeitos tóxicos significativos, de acordo com a Prova Exata de Fisher, nem mesmo na maior concentração testada (2%). Em função destes resultados, a concentração letal mediana [CL(I)₅₀; 96h] de ambas as amostras foi considerada superior a 2% (relatório 5.4, pág. 221).



Tabela 4: Teste de toxicidade aguda com *Danio rerio*. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre OGM e parental de acordo com a Prova Exata de Fisher.

Concentração celular (mg/L) (% v/v) ¹	Taxa de indivíduos vivos (%)					
	Parental (n=10)			OGM (n=10)		
Controle ²	100,0	±	1,18	100,0	±	1,18
18,75	100,0	±	0,00	100,0	±	0,00
37,5	100,0	±	0,00	96,7	±	5,77
75	96,7	±	5,77	100,0	±	0,00
150	96,7	±	5,77	96,7	±	5,77
300	100,0	±	0,00	90,0	±	10,0

n=número de organismos-teste utilizados em cada réplica.

¹(% v/v): Porcentagem do inóculo em relação ao volume total do ensaio.

²Condição controle (i.e., água original sem aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

Propriedades físicas e químicas da água durante ensaio com Danio rerio

Assim como para *D. similis*, três concentrações de leveduras foram escolhidas para avaliar as propriedades físicas e químicas da água nos testes com *D. rerio*: 0,125; 0,5 e 2%. Como esperado, a aplicação das leveduras (independentemente da concentração) provocou pequenas alterações equivalentes no pH em relação à condição controle (Tabela 5). No entanto, quando os tratamentos com OGM e parental são comparados entre si, as variações são equivalentes e não significativas na maioria dos casos, tanto no início quanto ao final do ensaio. Diferenças significativas no pH foram observadas apenas no momento da aplicação do inóculo. Após 96 horas todos os valores são estatisticamente equivalentes.

O mesmo efeito é observado para o teor de oxigênio. Alterações esperadas ocorrem após a inoculação das leveduras. Porém, após 96 horas todos os valores são estatisticamente equivalentes para os tratamentos com OGM e parental.

Tabela 5: Análise do pH da água após testes de toxicidade aguda com *Danio rerio*. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas).

Concentração celular (mg/L) (% v/v) ¹	pH inicial		pH final ³	
	Parental (n=10)	OGM (n=10)	Parental (n=10)	OGM (n=10)
Controle ²	7,38 ± 0,11	7,32 ± 0,00	7,68 ± 0,52	7,38 ± 0,00
18,75 (0,125%)	7,38 ^a ± 0,04	7,70 ^b ± 0,26	7,65 ± 0,24	7,53 ± 0,05
75 (0,5%)	7,47 ± 0,06	7,67 ± 0,16	7,65 ± 0,20	7,57 ± 0,03
300 (2%)	7,38 ^a ± 0,09	7,60 ^b ± 0,07	7,61 ± 0,09	7,56 ± 0,03

n=número de organismos-teste utilizados.

¹(% v/v): Porcentagem do inóculo em relação ao volume total do ensaio.

²Condição controle (i.e., água original antes da aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

³Após 96 horas.

^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com p<0,05).

Tabela 6: Concentração do oxigênio dissolvido em testes de toxicidade com *Danio rerio*. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas).

Concentração celular (mg/L) (% v/v) ¹	O ₂ inicial (mg O ₂ /L)		O ₂ final ³ (mg O ₂ /L)	
	Parental (n=10)	OGM (n=10)	Parental (n=10)	OGM (n=10)
Controle ²	7,54 ± 0,08	7,58 ± 0,00	6,93 ± 0,32	6,74 ± 0,00
18,75 (0,125%)	7,22 ± 0,16	7,31 ± 0,04	6,84 ± 0,54	6,75 ± 0,09
75 (0,5%)	6,98 ^a ± 0,03	7,08 ^b ± 0,03	6,63 ± 0,25	6,72 ± 0,16
300 (2%)	5,98 ^a ± 0,16	6,66 ^b ± 0,24	6,21 ± 0,07	6,33 ± 0,19

n=número de organismos-teste utilizados.

¹(% v/v): Porcentagem do inóculo em relação ao volume total do ensaio.

²Condição controle (i.e., água original antes da aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

³Após 96 horas.

^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com p<0,05).

Efeitos da aplicação do OGM sobre a microbiota aquática

Uma vez demonstrado em condições controladas a inexistência de i) efeitos tóxicos sobre organismos indicadores ou, ii) de alterações nocivas nas propriedades físicas da água, as implicações do OGM sobre a microbiota de um ambiente aquático natural foram avaliadas utilizando-se a metagenômica, abordagem que permite identificar e quantificar em alta resolução os micro-organismos constituintes do ecossistema em questão^{109,110} (Método 4.19, pág. 155).

Em resumo, os procedimentos realizados nesta análise incluem: i) coleta de água a partir de um ambiente natural (Método 4.21, pág. 157); ii) preparo dos inóculos de OGM e parental (Método 4.18, pág. 154); iii) aplicação de alta concentração de células viáveis e coleta de amostras um, quinze e trinta dias após a aplicação (Método 4.22, pág. 158); iv) extração de DNA total (Método 4.27, pág. 160; Figura S 5, pág.165); v) sequenciamento das regiões 16S e ITS e;

vi) análise dos resultados a partir da inferência de OTUs (sigla do termo em inglês *Operational Taxonomic Unit*) e curva de rarefação (Método 4.19, pág. 155).

A partir da análise da região 16S foram identificadas sete classes bacterianas: Alphaproteobacteria, Chloroflexia, Betaproteobacteria, Planctomycetacia, Cyanobacteria, Gammaproteobacteria e Caldilineae presentes em todos os tratamentos/pontos analisados. Sequências cuja taxonomia é desconhecida foram agrupadas como "não classificado" (Figura 26). Ao longo do tempo são observadas pequenas variações na distribuição dos representantes de cada classe em função da microbiota detectada. Representantes da classe Planctomycetacia, por exemplo, aumentam em frequência ao longo de trinta dias, enquanto o oposto é observado para Betaproteobacteria (Figura 26A). No entanto, é importante notar que quando os tratamentos com OGM e parental são comparados a cada ponto amostrado, todas as variações observadas são equivalentes e estatisticamente não significativas (Figura 26B).

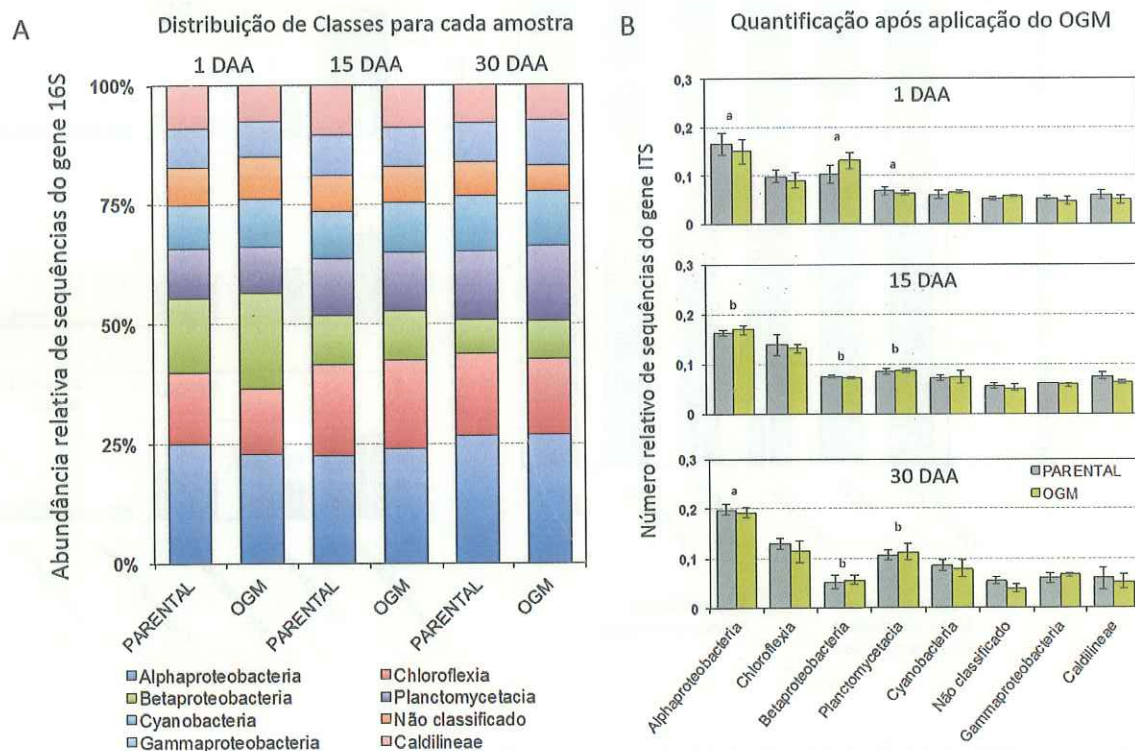


Figura 26: Efeitos do OGM sobre a comunidade bacteriana da água.

Dados gerados a partir do sequenciamento da região v4 do gene rRNA 16S utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração *Miseq* (Illumina). A: Classes bacterianas detectadas. Análise demonstrando a frequência dos representantes de cada classe em relação à microbiota total detectada. B: Quantificação dos representantes de cada classe após a aplicação das linhagens OGM e parental. Nota-se variações, porém, estas são equivalentes quando parental e OGM são comparados a cada ponto analisado. Valores representam a média e desvio padrão de três réplicas biológicas. DAA: dias após a aplicação. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p < 0,05$).

Analisando os resultados obtidos por meio do sequenciamento e análise da região ITS, foram detectados cinco gêneros de microalgas, todos representantes da classe Chlorophyceae: *Desmodesmus*, *Lobochlamys*, *Monoraphidium*, *Chlamydomonas* e *Scenedesmus*. Assim como observado para bactérias, todos os gêneros detectados ocorrem em ambos os tratamentos/tempos avaliados. Pequenas variações na frequência de cada gênero são novamente observadas ao longo do tempo (Figura 27). Representantes do gênero *Desmodesmus*, por exemplo, diminuem em frequência ao longo de trinta dias, enquanto o oposto é observado para *Lobochlamys* e *Monoraphidium* (Figura 27A). Porém, é importante notar que quando OGM e parental são comparados a cada ponto coletado, as variações são equivalentes e não são observadas diferenças significativas (Figura 27B).

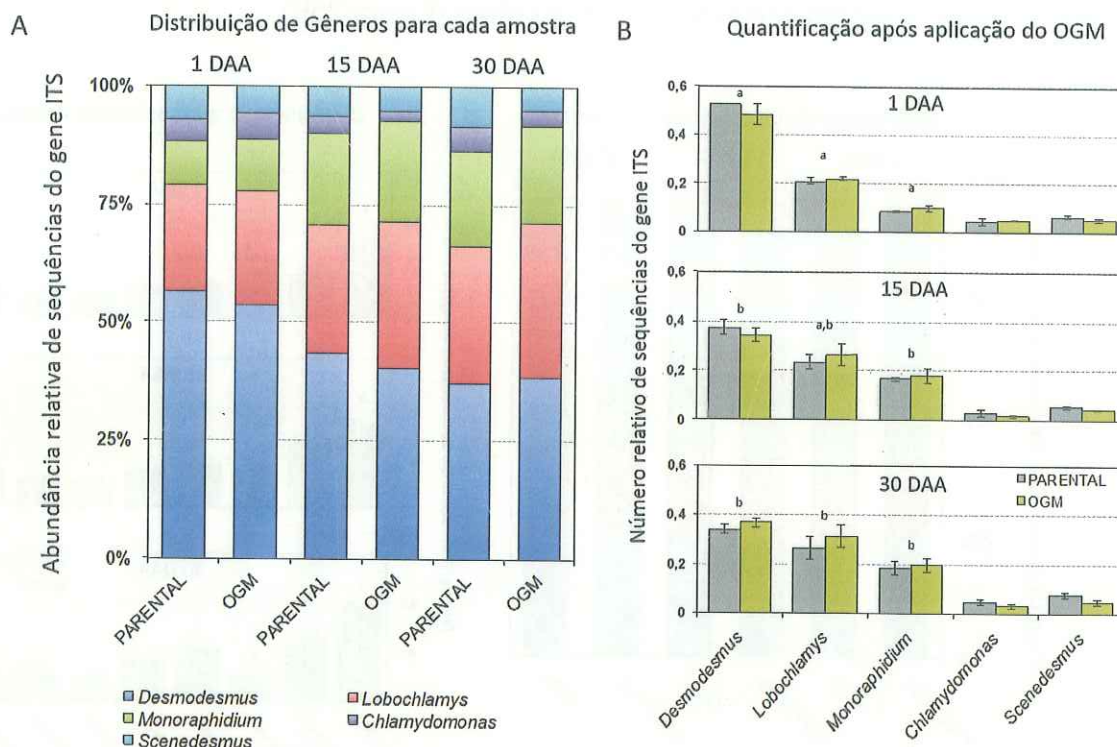


Figura 27: Efeitos do OGM sobre a comunidade de microalgas da água.

Dados gerados a partir do sequenciamento da região ITS utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração *Miseq* (Illumina). A: Gêneros de microalgas detectados. Análise demonstrando a frequência dos representantes de cada gênero em relação à microbiota total detectada. B: Quantificação dos representantes de cada gênero após a aplicação das linhagens OGM e parental. Nota-se variações, porém, estas são equivalentes quando parental e OGM são comparados a cada ponto analisado. Valores representam a média e desvio padrão de três réplicas biológicas. DAA: dias após a aplicação. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p < 0,05$)

É presumível considerar que variações na microbiota possam ocorrer ao longo do tempo. Entretanto, a equivalência observada quando OGM e parental são aplicados sugere que estas variações representam a dinâmica natural da microbiota. Demonstra também que quaisquer efeitos eventualmente causados pela presença da levedura não possuem relação com o fato desta ser ou não o OGM avaliado. Esta premissa é reforçada pelos resultados obtidos a partir da análise da sobrevivência do OGM e parental neste mesmo ambiente, discutida em detalhes no item 3.4, pág. 141. Como apresentado, a sobrevivência de ambas as linhagens é drasticamente reduzida em apenas um dia após a inoculação (Figura 32, pág. 142).

Além disso, os resultados permitem concluir que a inoculação de células viáveis do OGM neste ambiente não interfere na dinâmica da microbiota natural, mesmo com a alta concentração celular aplicada que, como mencionado anteriormente, é improvável de ocorrer em uma situação real. Esta observação se deve em parte pela baixa capacidade de sobrevivência em água da levedura e, pelo fato de que o tratamento com OGM não favorece ou prejudica a sobrevivência de nenhum dos micro-organismos detectados.

Juntos, os resultados obtidos pelas três abordagens (i.e., ensaio de toxicidade com organismos indicadores; análise das propriedades físicas e químicas e; dos efeitos do OGM sobre a microbiota) comprovam que as modificações genéticas empregadas na construção do OGM não adicionam à esta linhagem características que possam comprometer a qualidade da água ou causar qualquer efeito indesejado sobre esta matriz natural.



THE MANCO

3.3.2. Análise dos efeitos do OGM sobre a qualidade do solo

A mesma abordagem utilizada para avaliar as implicações do OGM na qualidade da água foi empregada para avaliar os efeitos desta linhagem sobre a qualidade do solo. Dessa forma, o teste de ecotoxicidade realizado foi constituído de três experimentos independentes utilizando as abordagens complementares: i) ensaios de toxicidade aguda com organismo indicador; ii) análises das propriedades físicas e químicas do solo e; iii) análise da comunidade microbiana após aplicação do OGM.

Ensaio de toxicidade aguda com o organismo indicador Eisenia fetida

Para o ensaio de ecotoxicidade aguda foram utilizadas minhocas da espécie *Eisenia fetida*, popularmente conhecida como gigante africana. Este é o principal organismo indicador utilizado em estudos de ecotoxicologia terrestre devido sua alta sensibilidade a agentes químicos (detalhes apresentados no material suplementar 5.5, pág. 269).

O experimento foi conduzido seguindo rigorosamente a norma ABNT NBR 15537:2007. Em resumo, soluções contendo as leveduras OGM ou parental foram previamente preparadas (Método 4.18, pág. 154). Para mimetizar as condições encontradas nos processos industriais a concentração de leveduras foi ajustada para 15g/L (massa úmida), densidade celular atingida ao final de cada ciclo fermentativo em escala industrial. De acordo com a ABNT, cinco concentrações da substância em questão devem ser testadas além da condição controle (material suplementar 5.5, pág. 269). Por essa razão, vasos contendo 12 indivíduos foram inoculados com: 3000; 1500; 750; 375 e 187,5 mg/dm³ (miligrama de células por litro de solo). Para ambas as linhagens (OGM e parental) foram utilizadas quatro réplicas para cada concentração. O experimento foi conduzido sob condições controladas e ao final de 14 dias a mortalidade dos indivíduos foi determinada para cada tratamento.

Para validação do experimento, foi determinado inicialmente a viabilidade dos indivíduos na condição controle (apenas água). Como observado na tabela 7, a viabilidade foi maior que 90%, limite exigido. Embora tenha-se observado indivíduos mortos em praticamente todos os

tratamentos, a taxa de mortalidade não foi estatisticamente significativa de acordo com a Prova Exata de Fisher¹⁰⁸, mesmo na maior concentração aplicada (Tabela 7).

Neste ensaio, a toxicidade é dada pela concentração nominal do agente capaz de causar a mortalidade de 50% dos organismos nas condições de ensaio após 14 dias [CE(I)₅₀; 14d]. Em outras palavras, uma substância deve ser considerada tóxica quando provoca a mortalidade de pelo menos 50% dos organismos indicadores após 14 dias. Como demonstrado, a viabilidade observada em todos os tratamentos foi sempre maior que 92%. Os efeitos dos tratamentos com OGM e parental são equivalentes e, nas concentrações empregadas a toxicidade é descartada, uma vez que a CE(I)₅₀; 14d é maior que 3000 mg/dm³.

Tabela 7: Teste de ecotoxicidade aguda com *Eisenia fetida*. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre OGM e parental de acordo com a Prova Exata de Fisher.

Concentração celular (mg/dm ³)	Taxa de indivíduos vivos após 14 dias (%)					
	Parental (n=12)			OGM (n=12)		
Controle ¹	95,0	±	5,77	95,0	±	5,77
187,5	95,0	±	7,07	96,7	±	7,07
375	93,3	±	5,77	95,0	±	5,77
750	93,3	±	5,77	95,0	±	5,77
1500	95,0	±	5,77	92,5	±	8,16
3000	93,3	±	5,77	96,7	±	5,77

n=número de organismos-teste utilizados em cada réplica.

¹Condição controle (i.e., solo original sem aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

Análise das propriedades físicas e químicas do solo

Uma vez demonstrada a ausência de efeitos tóxicos ao organismo indicador, as propriedades físicas e químicas do solo foram avaliadas. Para isto, a maior concentração celular empregada no teste de toxicidade (i.e., 3000 mg/dm³) foi aplicada em novas amostras de solo. Neste experimento as propriedades físico-químicas do solo foram avaliadas antes e após os tratamentos. Solo não tratado foi utilizado como condição controle experimental. Aproximadamente 300g de solo foram coletadas 15 e 30 dias após aplicação de OGM e parental (em triplicata) (Método 4.23, pág. 158).

Todos os testes foram realizados pela empresa Athenas¹. Na análise das propriedades físicas (ou granulometria) argila, silte, areia e cascalho foram os parâmetros avaliados (Tabela 8). Nenhuma mudança significativa foi observada após os tratamentos com OGM ou parental. A composição física do solo é algo que geralmente independe da ação de agentes biológicos, por essa razão, não é esperado que a aplicação das leveduras altere a granulometria do solo.



Tabela 8: Propriedades físicas do solo antes e após o tratamento com o OGM. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas).

Média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (três réplicas).																
Parâmetro ¹	Condição controle ²			15 dias após aplicação						30 dias após aplicação						
				Parental			OGM			Parental			OGM			
AREIA	ARGILA	15,82	±	1,45	14,99	±	2,51	14,99	±	2,50	16,66	±	1,44	16,65	±	0,73
	SILTE	15,60	±	1,94	18,01	±	2,45	17,78	±	2,22	16,43	±	0,55	15,79	±	0,52
	Total	68,40	±	0,21	66,99	±	1,11	67,55	±	0,45	66,90	±	1,14	67,88	±	1,05
	AMG	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd
	AG	23,62	±	0,83	23,56	±	0,39	21,98	±	2,20	23,69	±	1,07	22,76	±	0,34
	AM	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd
	AF	44,79	±	0,97	43,43	±	1,49	45,57	±	2,56	43,21	±	2,19	45,11	±	1,34
	AMF	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd
CASC.	>4,75mm	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd
	>2,00mm	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd
	<2,00mm	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd	nd	±	nd

¹Componentes analisados.

²Solo original (i.e., antes da aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

AMG: Areia muito grossa; AG: Areia grossa; AM: Areia média; AF: Areia fina; AMF: Areia muito fina.

nd: não detectado.

A análise das propriedades químicas incluiu como principais parâmetros: macro e micronutrientes, matéria orgânica, capacidade de troca de cátions (CTC), entre outros (Tabela 9). Ao contrário da granulometria, pequenas variações são observadas após a aplicação das leveduras. De certa forma, macro e micro nutrientes são mais sensíveis a variações. No entanto, praticamente não se observa diferenças estatisticamente significativas. Por serem variações sutis, estas não provocam efeitos deletérios ao solo, indiretamente avaliado pela microbiota natural, que é equivalente para os tratamentos com OGM e parental (detalhes a seguir).

¹Athenas Consultoria Agrícola e Laboratório Ltda. Detalhes em: <http://www.athenasagricola.com.br>.

Tabela 9: Propriedades químicas do solo antes e após tratamento com o OGM. Os valores apresentados representam a média e desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes (réplicas biológicas).

Parâmetro ¹	Condição controle ²		15 dias após aplicação				30 dias após aplicação			
			Parental		OGM		Parental		OGM	
B	0,23	± 0,02	0,24	± 0,02	0,24	± 0,00	0,25	± 0,01	0,24	± 0,01
Cu	1,05	± 0,04	1,46	± 0,18	1,41	± 0,17	1,82 ^a	± 0,01	1,65 ^b	± 0,04
Fe	52,35	± 1,23	79,25	± 12,8	77,18	± 6,08	76,35 ^a	± 1,14	81,62 ^b	± 1,82
Mn	2,80	± 0,43	15,34	± 2,12	15,27	± 1,68	18,33 ^a	± 1,37	15,61 ^b	± 1,31
Zn	4,94	± 0,08	6,86	± 0,57	6,97	± 0,98	7,30	± 0,19	7,36	± 0,22
pH	6,82	± 0,02	6,56	± 0,08	6,60	± 0,11	6,64	± 0,30	6,51	± 0,06
M.O.	68,58	± 8,69	75,94	± 2,75	69,87	± 8,06	66,05 ^a	± 1,88	76,98 ^b	± 3,41
P (Resina)	191,30	± 1,21	169,23	± 15,2	178,17	± 11,5	197,25	± 44,3	171,27	± 12,7
P (Mehlich)	nd	± nd	nd	± nd	nd	± nd	nd	± nd	nd	± nd
S	45,60	± 0,78	42,65	± 1,04	44,26	± 2,14	45,11	± 3,08	44,07	± 3,05
Ca	83,60	± 3,38	80,75	± 9,45	79,92	± 6,70	91,59	± 12,4	91,71	± 8,95
Mg	24,51	± 1,29	27,74	± 3,64	25,22	± 1,28	25,61	± 1,13	25,88	± 4,76
K	4,38	± 0,31	3,50	± 1,05	2,85	± 0,25	4,42	± 0,18	4,32	± 0,35
Al	0,23	± 0,21	0,63	± 0,31	1,03	± 0,29	0,33	± 0,06	0,30	± 0,00
H+Al	10,86	± 0,29	11,53	± 0,21	11,57	± 0,39	11,98	± 0,19	12,33	± 0,55
S.B.	112,38	± 3,63	111,93	± 9,43	108,00	± 7,11	121,42	± 13,3	121,99	± 13,8
CTC	123,38	± 3,63	123,60	± 9,69	119,33	± 6,55	133,42	± 13,3	134,32	± 14,0
Sat. (Bases)	91,08	± 0,27	90,53	± 0,66	90,47	± 1,03	90,94	± 0,95	90,76	± 0,91
Sat. (Al)	nd	± nd	0,87	± 0,08	0,92	± 0,06	nd	± nd	nd	± nd

¹Compostos químicos analisados.

²Solo original (i.e., antes da aplicação das soluções contendo as linhagens OGM ou parental).

B: Boro; Cu: Cobre; Fe: Ferro; Mn: Manganês; Zn: Zinco; P: Fosfato (mg/dm³).

pH: Acidez ativa (CaCl₂).

M.O.: Matéria Orgânica (g/dm³).

Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; K: Potássio; Al: Alumínio; H+Al: Acidez potencial – SMP; S.B.: Soma de Bases; CTC: Capacidade de troca de cátions (Método 4.19, pág. 155).

Sat. (Bases): Saturação por bases (V%).

Sat. (Al): Saturação por alumínio (m%).

nd: não detectado.

^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com p<0,05).

Efeitos da aplicação do OGM sobre a microbiota do solo

Em paralelo, para demonstrar os efeitos do OGM sobre a microbiota do solo, a população de micro-organismos nativos foi quantificada através da metagenômica (Método 4.19, pág. 155). Em resumo, os procedimentos incluíram: i) obtenção do solo (Método 4.21, pág. 157); ii) preparo dos inóculo de OGM e parental (Método 4.18, pág. 154); iii) aplicação de alta concentração de células viáveis e coleta de amostras um, quinze e trinta dias após a aplicação (Método 4.23, pág. 158); iv) extração de DNA total (Método 4.28, pág. 161); v) sequenciamento das regiões 16S e ITS e; vi) análise dos resultados a partir da inferência de OTUs (sigla do termo em inglês *Operational Taxonomic Unit*) e curva de rarefação (Método 4.19, pág. 155).

Analisando os resultados obtidos pelo sequenciamento da região 16S, foram identificadas oito classes bacterianas: Anaerolineae, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Sphingobacteriia, Deltaproteobacteria e Acidobacteria, presentes em todos os tratamentos/pontos analisados. Sequências cuja taxonomia é desconhecida foram agrupadas como "não classificado" Figura 28. Como esperado, são observadas pequenas variações na distribuição de algumas classes ao longo do tempo. Representantes das classes Anaerolineae e Actinobacteria, por exemplo, aumentam em frequência ao longo de trinta dias, enquanto o oposto é observado para Acidobacteria e Betaproteobacteria (Figura 28A). No entanto, é importante notar que quando os tratamentos com OGM e parental são comparados a cada ponto, todas as variações observadas não são significativas (Figura 28B).

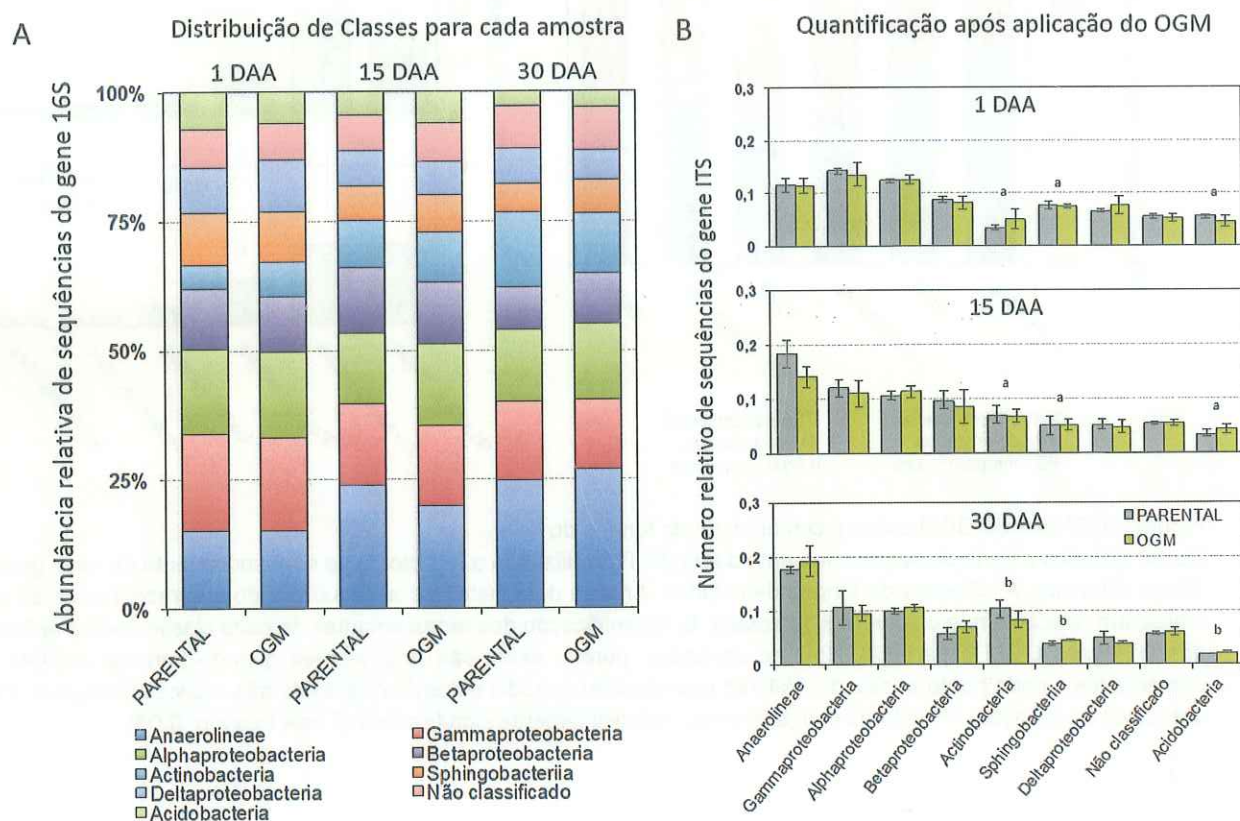


Figura 28: Efeitos do OGM sobre a comunidade bacteriana do solo.

Dados gerados a partir do sequenciamento da região v4 do gene rRNA 16S utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração *Miseq* (Illumina). A: Classes bacterianas detectadas. Análise demonstrando a frequência dos representantes de cada classe em relação à microbiota total detectada. B: Quantificação dos representantes de cada classe após a aplicação das linhagens OGM e parental. Nota-se variações, porém, estas são equivalentes quando parental e OGM são comparados a cada ponto analisado. Valores representam a média e desvio padrão de três réplicas biológicas. DAA: dias após a aplicação. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p < 0,05$).

A partir da análise dos resultados obtidos pelo sequenciamento da região ITS, cinco classes de fungos foram identificadas: Sordariomycetes, Pezizomycetes, Leotiomyces, Saccharomycetes e Agaricomycetes, sendo Sordariomycetes a classe com o maior número de representantes (Figura 29). Micro-organismos cuja classificação não é conhecida foram agrupados em “não classificados” e, também, representam uma parcela importante da microbiota presente no solo analisado.

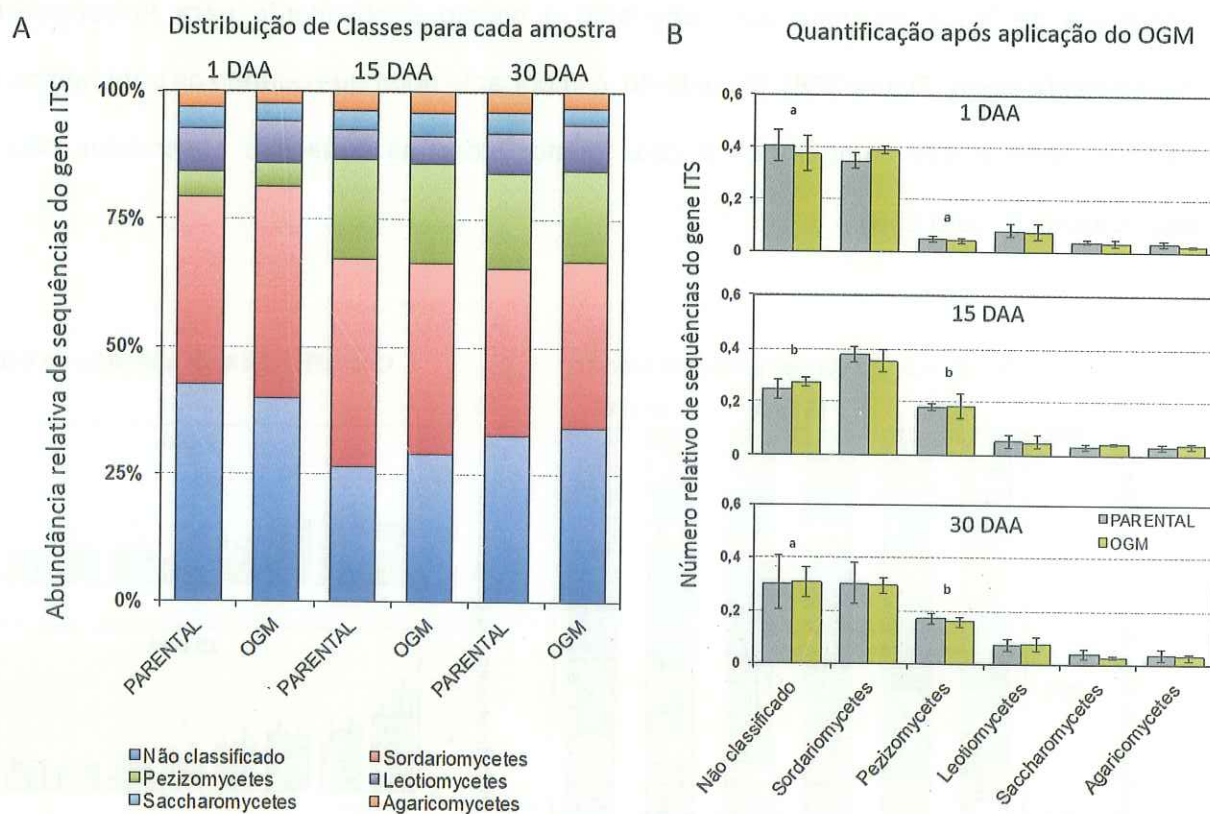


Figura 29: Efeitos do OGM sobre a comunidade de fungos do solo. Dados gerados a partir do sequenciamento da região ITS utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração *Miseq* (Illumina). A: Classes de fungos detectadas. Análise demonstrando a frequência dos representantes de cada classe em relação à microbiota total detectada. B: Quantificação dos representantes de cada classe após a aplicação das linhagens OGM e parental. Nota-se variações, porém, estas são equivalentes quando parental e OGM são comparados a cada ponto analisado. Valores representam a média e desvio padrão de três réplicas biológicas. DAA: dias após a aplicação. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p < 0,05$).

A classe Saccharomycetes inclui o gênero *Saccharomyces*, dessa forma, OGM e parental estão representados dentro deste grupo juntamente com outras leveduras naturais do solo. De forma indireta, esta detecção comprova a presença dos inóculos. Os resultados a respeito da sobrevivência de ambas as linhagens são discutidos em detalhes no 3.4, pág. 141.

Avaliando individualmente a frequência de cada classe ao longo do experimento, é possível notar que ocorrem pequenas variações. Por exemplo, a frequência de representantes da classe Pezizomycetes aumenta em função do tempo, enquanto a quantidade relativa de fungos da classe Sordariomycetes diminui. A abundância de Leotiomycetes, por outro lado, reduz entre 1 e 15 dias após o tratamento e aumenta novamente após 30. É importante notar que todas as variações observadas são equivalentes entre parental e OGM quando os tratamentos são comparados entre si a cada ponto amostrado, demonstrando ausência de efeito indesejado ocasionado pela modificação genética do OGM (Figura 29B).

Novamente, os resultados demonstram que as alterações observadas são variações naturais da microbiota do solo. Dado pelo fato de que não há prejuízo ou favorecimento da sobrevivência das classes detectadas quando OGM e parental são comparados. Como discutido na seção 3.4 (pág. 141), leveduras da espécie *S. cerevisiae* também são constituintes da microbiota nativa do solo e interagem no ambiente com os outros micro-organismos. Dessa forma, a ausência de efeitos tóxicos sobre o organismo indicador e de alterações significativas nas propriedades físicas e químicas, associada a ausência efeitos adversos sobre a microbiota do solo, permitem concluir que células viáveis da linhagem OGM não afetam negativamente a qualidade do solo, mesmo em altas concentrações.

Além disso, é importante considerar que ambos os resultados obtidos para qualidade da água e solo indicam a ausência de potenciais efeitos adversos oriundos de eventos improváveis de liberações acidentais. Reforçam ainda a segurança intrínseca ao uso pretendido, que contempla o emprego da linhagem Celere-2L em ambientes fechados sem liberação de organismos vivos no ambiente (seção 3, pág. 93).

THE PRINCO

3.3.3. Análise dos efeitos do OGM sobre a qualidade do ar

A qualidade do ar é determinada pelo nível de poluição que amostra avaliada apresenta. A poluição por sua vez, é tida pela Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) como um importante fator risco à saúde. Contribuindo significativamente para a ocorrência de doenças cardíacas, câncer de pulmão, bem como doenças respiratórias crônicas ou agudas, incluindo a asma. Por essa razão, a WHO estabelece diretrizes para a avaliação do risco à saúde de quatro poluentes atmosféricos: material particulado, ozônio (O₃), dióxido de nitrogênio (NO₂) e dióxido de enxofre (SO₂). Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA – *United States Environmental Protection Agency*) considera também, o monóxido de carbono (CO) e o chumbo (Pb) como indicadores da qualidade do ar^u.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) define padrões de qualidade do ar como: “as concentrações de poluentes atmosféricos que, ultrapassadas, poderão afetar a saúde, a segurança e o bem-estar da população, bem como ocasionar danos à flora e à fauna, aos materiais e ao meio ambiente em geral”. Além disso, especifica os poluentes atmosféricos e determina os métodos de amostragem e análise para cada um deles. São considerados indicadores pelo CONAMA: partículas totais em suspensão, fumaça, partículas inaláveis além de SO₂, CO, O₃ e NO₂^v.

Estudos da WHO e da EPA alertam também para os potenciais impactos que compostos orgânicos voláteis (COVs) têm sobre o ambiente. Estes compreendem uma grande variedade de moléculas que apresentam carbono em sua constituição (exceto monóxido e dióxido de carbono) tais como aldeídos, cetonas e outros hidrocarbonetos. São emitidos principalmente por veículos automotivos, uso de solventes, combustão de matéria orgânica em geral, processos industriais, etc. COVs representam sérios problemas de poluição atmosférica por contribuírem com a produção de O₃ na troposfera (i.e., fora da camada de ozônio). O₃ é o maior constituinte do fenômeno conhecido como *photochemical smog*, poluição do ar formada pela reação da luz solar com poluentes como: óxidos de nitrogênio e COVs¹¹.

^uUnited States Environmental Protection Agency (EPA). *Air Trends* (<http://www.epa.gov/airtrends/sixpoll.html>).

^vCONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. Detalhes em: <http://www.mma.gov.br/port/conama>.

Curiosamente, fontes biológicas também contribuem com a emissão de COVs na atmosfera. Cerca de $1,3 \times 10^9$ toneladas de carbono são emitidos anualmente sobre a forma de COVs. A grande maioria são produzidos por plantas sendo que o principal componente é o isopreno. Uma pequena parte é produzida por animais e micro-organismos¹¹². No segundo caso, pelo menos 96 COVs já foram descritos¹¹³, incluem álcoois, cetonas, terpenos, ésteres, aldeídos, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, entre outros¹¹⁴.

De todos os indicadores citados anteriormente é conhecido que *S. cerevisiae* é capaz de produzir concentrações fisiológicas de SO_2 e COVs, uma vez que estes são subprodutos dos metabolismos primário e secundário da célula. Por se tratar de concentrações fisiológicas, não existem evidências de que leveduras da espécie *S. cerevisiae* (ou outras espécies do gênero) possam influenciar na contaminação do ar pela emissão destes compostos. COVs são formados durante a síntese de DNA, aminoácidos e ácidos graxos¹¹³. SO_2 é produzido durante a biossíntese de aminoácidos que contêm enxofre (metionina e cisteína)¹¹⁵ e na produção de cervejas e vinhos é importante para a manutenção do sabor^{116,117}.

Para determinar a emissão de CO_2 e de COVs a partir da fermentação da glicose e da xilose, três réplicas de OGM e parental foram crescidas em meios contendo estes dois açúcares como única fonte de carbono (glicose ou xilose). É importante destacar que a linhagem parental não cresce (ou apresenta crescimento residual) em xilose como única fonte de carbono. Por essa razão, o experimento foi conduzido de forma que possibilitasse a comparação da quantidade de CO_2 produzida por mol de carbono (C), independentemente do açúcar (i.e., glicose ou xilose).

Em resumo, a coleta dos gases totais foi feita através da fermentação em garrafas hermeticamente fechadas acopladas a bolsas apropriadas (*Gas Sampling Bags* – Sigma-Aldrich®). As culturas foram mantidas a 30°C em agitação (150 rpm) por 30 e 48 horas para glicose e xilose, respectivamente (Método 4.24, pág. 159). Ao final do experimento o crescimento, o consumo do açúcar (Método 4.12, pág. 152), a produção de CO_2 e de COVs foram quantificados (Método 4.25, pág. 159).

Como observado na figura 31A o crescimento de ambas as linhagens foi equivalente em glicose após 30 horas. OGM e parental atingiram a densidade óptica de: $18,8 \pm 0,64$ e $18,24 \pm 0,24$, respectivamente. Como esperado, apenas o OGM foi capaz de crescer eficientemente em xilose

após 48 horas ($DO=19,09\pm0,44$). Exceto na condição parental/xilose, os açúcares foram totalmente consumidos.

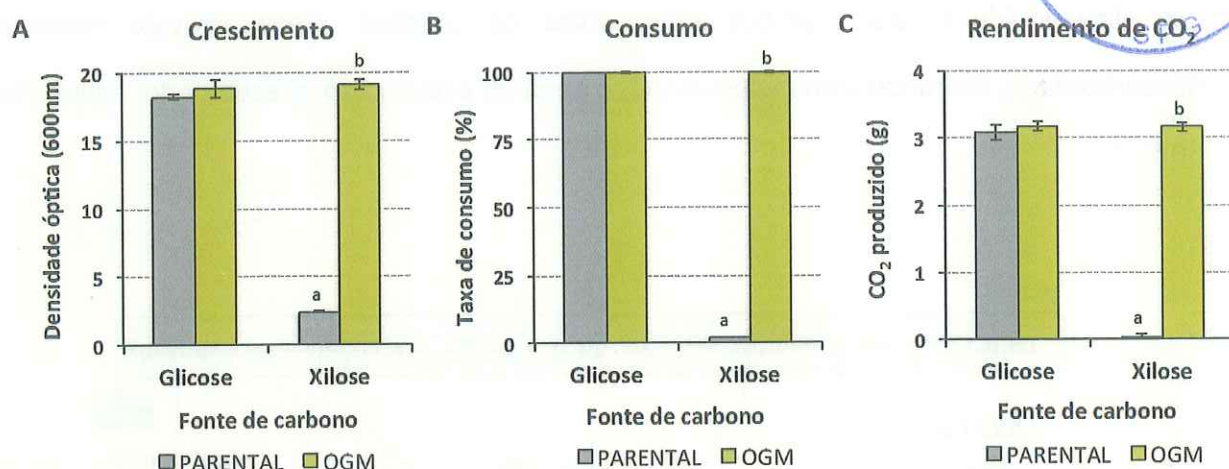


Figura 30: Crescimento e produção de CO₂ pelo OGM a partir de glicose e xilose.

A: Quantificação do crescimento das linhagens OGM e parental. B: Quantificação do consumo no fim do experimento. C: Quantidade de CO₂ produzido por ambas as linhagens nas diferentes fontes de carbono. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p<0,05$).

O CO₂ produzido foi determinado indiretamente pelo volume de gases produzidos, ou seja, aprisionados em cada *bag*. Para isso, os sistemas garrafas/*bags* foram pesadas em balança analítica antes e ao final do experimento. A quantidade final de CO₂ foi dada por: CO₂ produzido = peso final – peso inicial.

Como apresentado na figura 30C a produção de CO₂ foi equivalente para OGM e parental crescidos em glicose: $3,17\pm0,06$ e $3,07\pm0,11$ gramas de CO₂ respectivamente. Como esperado, na condição parental/xilose a produção de gases foi insignificante ($0,02\pm0,04$ g), uma vez que o crescimento desta linhagem é residual em xilose. No entanto, quando o OGM é cultivado em xilose, a produção de CO₂/mol de C é equivalente à observada para ambas as linhagens cultivadas em glicose ($3,15\pm0,06$ g).

Estes resultados demonstram que, independentemente do açúcar avaliado (glicose e xilose) a produção de CO₂ é equivalente quando a quantidade de carbono é levada em consideração. Em outras palavras, as manipulações genéticas realizadas na construção do OGM possibilitam o consumo de xilose e a conversão deste açúcar em etanol, mas não aumenta a quantidade relativa de CO₂ de produzido (mol de CO₂/mol de Carbono).

Em anaerobiose o metabolismo de glicose e xilose compartilham uma única reação que produz CO_2 . Glicose é convertida em piruvato pelo conjunto de reações que compreendem a glicólise. Xilose, por sua vez, é convertida pela via das pentoses fosfato em frutose-6-fosfato ou em gliceraldeído-3-fosfato, ambos subprodutos da glicólise. Cada piruvato formado é descarboxilado, liberando uma molécula CO_2 e gerando acetaldeído, precursor do etanol (Figura 30)^{41,72}.

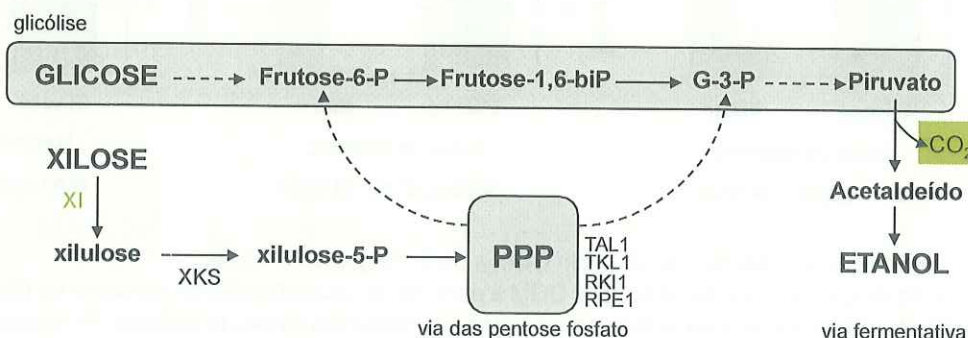


Figura 31: Representação esquemática da produção de CO_2 a partir de metabolismo de glicose e xilose. A glicose é convertida a piruvato pela glicólise. Por outro lado, a xilose é convertida em frutose-6-fosfato (Frutose-6-P) ou gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) pela via das pentoses fosfato (PPP) e compartilha com a glicose as etapas de conversão destes a piruvato. O piruvato, por sua vez, é convertido em acetaldeído, precursor do etanol. Esta é a única reação de ambos os metabolismos que inclui a produção de CO_2 . O metabolismo da xilose se inicia pela sua conversão a xilulose, etapa catalisada pela enzima Xilose isomerase (XI), produto do único transgene presente na linhagem OGM (gene *xylA*). Notar que as manipulações realizadas nos genes endógenos (*XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RKI1* e *RPE1*) estão diretamente relacionadas ao fluxo metabólico da xilose. Para facilitar a compreensão apenas as principais reações são apresentadas. Setas contínuas representam reações diretas; setas pontilhadas representam passos que incluem mais que uma reação metabólica.

Em paralelo, as *bags* contendo os gases coletados nas condições OGM e parental/glicose e OGM/xilose foram enviadas para a empresa TASQA^w, onde a presença de COVs foi avaliada por GC-MS (Método 4.25, pág. 159). Inicialmente, 53 COVs conhecidos e rotineiramente analisados em testes de qualidade do ar foram quantificados. Como observado na tabela 10 nenhum deles foi identificado (dados brutos são apresentados no item 5.6, pág. 287).

^wEmpresa especializada em análises físico-químicas ambientais. Detalhes em <https://www.tasqa.com.br>.

Tabela 10: Análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) durante a fermentação de glicose ou xilose pelo OGM. Os valores apresentados são equivalentes nos três experimentos independentes (réplicas biológicas) avaliados.

#	Parâmetro ¹	LQ ²	Unidade	Glicose ³		Xilose ⁴
				Parental	OGM	OGM
1	1,1,1,2-Tetracloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
2	1,1,1-Tricloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
3	1,1,2,2-Tetracloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
4	1,1,2-Tricloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
5	1,1-Dicloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
6	1,1-Dicloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
7	1,1-Dicloropropeno	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
8	1,2,3-Triclorobenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
9	1,2,3-Tricloropropano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
10	1,2,4-Triclorobenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
11	1,2,4-Trimetilbenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
12	1,2-Dibromo-3-cloropropano	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
13	1,2-Dibromoetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
14	1,2-Dicloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
15	1,2-Dicloropropano	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
16	1,3,5-Triclorobenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
17	1,3,5-Trimetilbenzeno	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
18	1,3-Diclorobenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
19	1,3-Dicloropropano	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
20	1,4-Diclorobenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
21	2,2-Dicloropropano	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
22	2-Clorotolueno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
23	4-Clorotolueno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
24	Benzeno	0,06	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ
25	Bromobenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
26	Bromoclorometano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
27	Bromodiclorometano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
28	Bromofórmio	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
29	cis-1,2-Dicloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
30	cis-1,3-Dicloropropeno	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
31	Clorobenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
32	Clorodibromometano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
33	Clorofórmio	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
34	Estireno	0,05	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ
35	Etilbenzeno	0,05	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ
36	Hexaclorobutadieno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
37	Isopropilbenzeno (Cumeno)	0,04	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ
38	m+p-Xileno	0,09	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ
39	Metiletilcetona	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
40	n-Butilbenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
41	n-Propilbenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
42	o-Xileno	0,09	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ
43	p-Isopropiltolueno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
44	Piridina	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
45	sec-Butilbenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
46	terc-Butilbenzeno	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
47	Tetracloreto de carbono	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
48	Tetracloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
49	Tolueno	0,08	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ
50	trans-1,2-Dicloroetano	2	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
51	trans-1,3-Dicloropropeno	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
52	Tricloroetano	10	mg/m ³	<LQ	<LQ	<LQ
53	Xilenos	0,09	ppmv	<LQ	<LQ	<LQ

¹Compostos orgânicos voláteis analisados em testes de qualidade de ar.

²Limite de quantificação.

³Fermentação utilizando glicose como única fonte de carbono.

⁴Fermentação utilizando xilose como única fonte de carbono.

<LQ: menor que o limite de quantificação (i.e., não detectado).

Adicionalmente, esta análise foi ampliada pelo emprego de um método qualitativo, que consiste na detecção relativa de cada composto identificado em relação ao total. Os resultados obtidos nessa segunda análise são apresentados na tabela 11 e o único composto detectado foi o etanol (dados brutos apresentados no item 5.7, pág. 323). Por ser produzido em alta quantidade durante a fermentação, especialmente nas condições testadas onde altas concentrações de açúcares foram utilizadas, é natural que ocorra a volatilização de pequenas quantidades de etanol. No processo industrial a evaporação também é observada durante a fermentação, porém todo o volume de etanol é recuperado pelos sistemas de lavagem (*scrubber*) antes de serem liberado na atmosfera (seção 3, pág. 93).

Tabela 11: Perfil qualitativo e quantitativo de compostos orgânicos voláteis produzidos pelas linhagens OGM e parental durante a fermentação de glicose e xilose. Valores apresentados para três experimentos independentes (réplicas biológicas) avaliados.

#	Parâmetro ¹	Unidade ²	Glicose ³		Xilose ⁴
			Parental	OGM	OGM
1	1-Propanol	%	nd	nd	nd
2	1,2-Diclorobenzeno	%	nd	nd	nd
3	1,2,3,4-Diepoxibutano	%	nd	nd	nd
4	1,3-Dicloro-2-propanol	%	nd	nd	nd
5	1,4-Dioxano	%	nd	nd	nd
6	2-Butanona (MEK)	%	nd	nd	nd
7	2-Cloroetanol	%	nd	nd	nd
8	2-Cloroetil vinil éter	%	nd	nd	nd
9	2-Hexanona	%	nd	nd	nd
10	2-Hidroxipropionitrila	%	nd	nd	nd
11	2-Nitropropano	%	nd	nd	nd
12	2-Pentanona	%	nd	nd	nd
13	2-Picolina	%	nd	nd	nd
14	2-Propanol	%	nd	nd	nd
15	3-Cloropropionitrila	%	nd	nd	nd
16	4-Bromofluorobenzeno	%	nd	nd	nd
17	4-Metil-2-pentanona (MIBK)	%	nd	nd	nd
18	Acetona	%	nd	nd	nd
19	Acetonitrila	%	nd	nd	nd
20	Acroleína (Propenal)	%	nd	nd	nd
21	Acrilonitrila	%	nd	nd	nd
22	Álcool Alílico	%	nd	nd	nd
23	Cloreto de Alila	%	nd	nd	nd
24	Sulfeto de Bis(2-cloroetila)	%	nd	nd	nd
25	Bromoacetona	%	nd	nd	nd
26	Bromometano	%	nd	nd	nd
27	cis-1,4-Dicloro-2-buteno	%	nd	nd	nd
28	Disulfeto de Carbono	%	nd	nd	nd
29	Tetracloreto de Carbono	%	nd	nd	nd
30	Hidrato de Cloral	%	nd	nd	nd
31	Cloroetano	%	nd	nd	nd
32	Clorometano	%	nd	nd	nd
33	Cloropreno	%	nd	nd	nd
34	Crotonaldeído	%	nd	nd	nd
35	Dibromometano	%	nd	nd	nd
36	Diclorodifluorometano	%	nd	nd	nd



37	Éter Etilico	%	nd	nd	nd
38	Epícloridrina	%	nd	nd	nd
39	Etanol	%	100 ^a	100 ^c	100 ^b
40	Acetato de Etila	%	nd	nd	nd
41	Metacrilato de Etila	%	nd	nd	nd
42	Óxido de Etileno	%	nd	nd	nd
43	Hexacloroetano	%	nd	nd	nd
44	Iodometano	%	nd	nd	nd
45	Álcool Isobutílico	%	nd	nd	nd
46	Malonitrila	%	nd	nd	nd
47	Metacrilonitrila	%	nd	nd	nd
48	Metanol	%	nd	nd	nd
49	Diclorometano	%	nd	nd	nd
50	n-Butanol	%	nd	nd	nd
51	N-Nitroso-di-n-butilamina	%	nd	nd	nd
52	n-Propilamina	%	nd	nd	nd
53	Naftaleno	%	nd	nd	nd
54	Nitrobenzeno	%	nd	nd	nd
55	o-Toluidina	%	nd	nd	nd
56	Paraldeído	%	nd	nd	nd
57	Pentacloroetano	%	nd	nd	nd
58	Propionitrila	%	nd	nd	nd
59	Estireno	%	nd	nd	nd
60	trans-1,4-Dicloro-2-butenos	%	nd	nd	nd
61	Triclorofluorometano	%	nd	nd	nd
62	Acetato de Vinila	%	nd	nd	nd
63	Cloreto de Vinila	%	nd	nd	nd
64	β-Propiolactona	%	nd	nd	nd

¹Compostos orgânicos voláteis analisados em testes de qualidade de ar.

²Quantidade relativa ao total de compostos identificados.

³Fermentação utilizando glicose como única fonte de carbono.

⁴Fermentação utilizando xilose como única fonte de carbono.

nd: não detectado.

^{a,b,c} Detectado em uma, duas ou três réplicas.

Os resultados obtidos para COVs e CO₂ corroboram a ausência de evidências de que leveduras da espécie *S. cerevisiae* possam influenciar significativamente na contaminação do ar pela emissão destes compostos.

Quando se avalia as implicações de toda cadeia produtiva do bioetanol sobre o meio ambiente, pelo menos três pontos importantes devem ser considerados: i) este é um combustível renovável produzido a partir de plantas, ao contrário dos combustíveis fósseis (derivados do petróleo) que possuem fonte limitada e são os maiores contribuintes para a emissão de CO₂ e aquecimento global (i.e., efeito estufa); ii) a substituição da gasolina pelo bioetanol ajuda a reduzir a emissão de CO₂ (emitido por veículos por exemplo) uma vez que as plantas (matéria-prima para o processo) capturam CO₂ da atmosfera durante a fotossíntese; iii) combinado com a gasolina, o bioetanol reduz a emissão de CO e de COVs, exercendo um importante papel na

redução a formação de ozônio na atmosfera e consequentemente a degradação da qualidade do ar por *photochemical smog*^x.

^xRFA: United State Renewable Fuels Association. *Ethanol Facts: Environment*. Detalhes em: <http://www.ethanolrfa.org>.



3.4. Sobrevivência e dispersão do OGM na água e no solo

Fungos são micro-organismos ceseis e sua dispersão se dá pela expansão das hifas ao seu redor ou pelos esporos, através do vento, água ou animais¹¹⁸. Leveduras da espécie *S. cerevisiae*, por outro lado, não formam hifas e não possuem estruturas especializadas para a dispersão observadas em fungos filamentosos como: basidiocarpos, ascocarpos ou conidióforos^{118,119}. Além disso, são unicelulares e não possuem flagelos, como observado em esporos de Oomicetos (zoósporos); ou formato equivalente à pólen alados, observados em algumas espécies do gênero *Pinus* (i.e., esporos especializados para a dispersão através do vento)¹²⁰.

S. cerevisiae possui um mecanismo de dispersão classificado no grupo dos ascomicetos (i.e., filo Ascomycota) como passiva ou não explosiva. Este inclui outros representantes da ordem Saccharomycetales, formada por leveduras que se reproduzem por gemulação. Neste grupo, o asco é formado diretamente a partir do zigoto, com completa ausência de ascocarpo (estrutura ligada à dispersão ativa ou explosiva). A dispersão é passiva se dá pela quebra da parede do asco¹¹⁸.

Como demonstrado em outras seções deste documento, o OGM possui modificações genéticas comprovadamente restrita ao metabolismo do açúcar xilose e a conversão deste em etanol. Dessa forma, o transgene introduzido e os genes endógenos manipulados não estão relacionados com o desenvolvimento ou morfologia da linhagem, ou seja, não induzem a esporulação, a formação de hifas ou a diferenciação das células em estruturas que poderiam favorecer sua dispersão. Por essas razões, é improvável que haja alterações na capacidade de dispersão da linhagem Celere-2L em relação ao seu parental.

Em relação à sobrevivência porém, é factível considerar que a capacidade de consumir xilose demonstrada na seção 1.16 (pág. 81) poderia indiretamente favorecer a sobrevivência do OGM em condições naturais, onde a disponibilidade deste açúcar é abundante. Para avaliar esta premissa, a sobrevivência de ambas as linhagens foi quantificada nas mesmas condições utilizadas para analisar os efeitos do OGM sobre a microbiota do solo e água (Métodos 4.22 e 4.23, pág. 158). A sobrevivência de ambas as linhagens foi determinada ao longo do tempo por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o método de quantificação absoluta baseado

em curva padrão (Método 4.26, pág. 160), técnica comumente utilizada em abordagens similares^{76,77}. Esta análise foi conduzida pela equipe do laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade de São Paulo (Campus Luiz de Queiroz - ESALQ).

Em resumo, esta quantificação incluiu as seguintes etapas: i) construção e validação de *primers* específicos para OGM e parental (Figura S 6 pág. 165; ii) construção da curva padrão a partir do DNA do OGM/parental previamente extraído (Figura S 7, pág. 166); iii) extração e análise da qualidade do DNA das amostras de solo e água (Métodos 4.27 e 4.28, págs. 160 e 161); iv) amplificação e quantificação do número de células de OGM e parental para cada ponto amostrado. Em ambos os ambientes (água e solo) a sobrevivência de OGM e parental foi acompanhada por trinta dias em quatro pontos: imediatamente após a aplicação, um, quinze e trinta dias após a inoculação.

A sobrevivência do OGM e parental em água é apresentada na figura 32. Apesar do elevado número de células viáveis utilizado como inóculo (OGM= $3,93 \pm 0,15 \times 10^8$; parental= $4,0 \pm 0,28 \times 10^8$ UFCs/mL), já é observado uma redução substancial na viabilidade de ambas as linhagens um dia após a inoculação. A sobrevivência decresce em função do tempo, de modo que trinta dias após a inoculação não são mais detectadas leveduras viáveis em ambos os tratamentos.

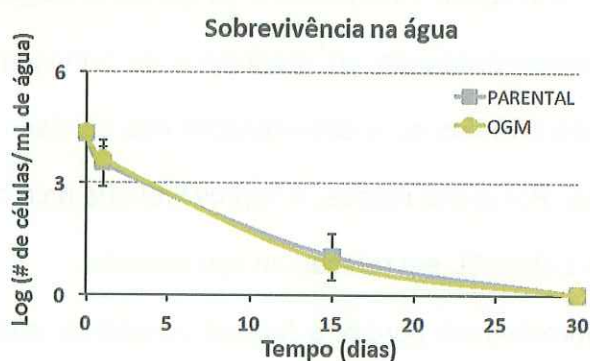


Figura 32: Análise da sobrevivência do OGM na água.

Água coletada em um ambiente natural. Dados referente à média e desvio padrão de três experimento independentes (réplicas biológicas). Número de células quantificado por qPCR pelo método de quantificação absoluta baseado em curva padrão. Nota-se que ambas as linhagens apresentam baixa capacidade de sobrevivência na água. Modificações genéticas realizadas no desenvolvimento da linhagem OGM não conferem vantagem adaptativa para este ambiente. Não foram observados valores com diferenças estatisticamente significativas entre OGM e parental (Teste t com $p > 0,05$).

É importante notar que a incapacidade de sobreviver na água é devido ao fato de que esta linhagem não ser adaptada a este ambiente. A levedura escolhida como plataforma para as manipulações genéticas (organismo parental PE2) é naturalmente encontrada em ambientes associados à cana-de-açúcar¹³. Novamente, as manipulações genéticas realizadas no OGM não conferiram capacidade de sobrevivência neste ambiente em relação à microbiota natural ou ao seu parental. Como demonstrado nas figuras 26 e 27 (págs. 121 e 122), a comunidade microbiana não é prejudicada ou favorecida em resposta ao OGM, uma vez que as variações são equivalentes em ambos os tratamentos com OGM e parental.

Ao contrário do observado em água, a sobrevivência de OGM e parental no solo foi praticamente constante durante o período observado (Figura 33). Esta persistência é esperada uma vez que o solo é um *habitat* natural de *S. cerevisiae*. Como descrito anteriormente, esta espécie é capaz de assimilar uma grande variedade de açúcares e aminoácidos disponíveis no solo. Característica que aumenta sua habilidade de sobreviver por longos períodos neste ambiente^y.

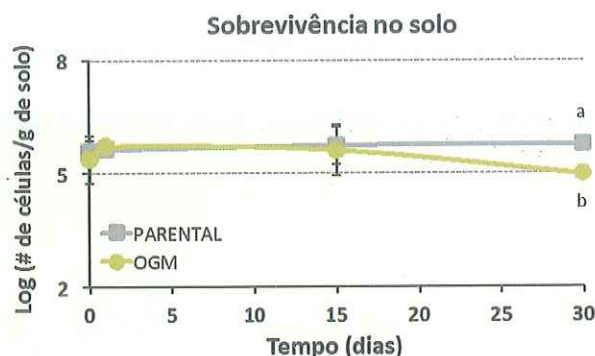


Figura 33: Análise da sobrevivência do OGM no solo.

Solo vegetal. Dados referente à média e desvio padrão de três experimento independentes (réplicas biológicas). Número de células quantificado por qPCR pelo método de quantificação absoluta baseado em curva padrão. Nota-se que até 15 dias após a aplicação ambas as linhagens apresentam capacidade equivalente de sobrevivência no solo. A partir deste ponto os resultados sugerem maior suscetibilidade do OGM na competição com a microbiota natural. Modificações genéticas realizadas no desenvolvimento da linhagem OGM não conferem vantagem adaptativa para este ambiente. ^{a,b}: valores com diferenças estatisticamente significativas (Teste t com $p < 0,05$).

A sobrevivência de ambas as linhagens é equivalente na maior parte do período observado. Apesar da habilidade de consumir xilose demonstrada anteriormente, a linhagem

^yUnited States Environmental Protection Agency (EPA). Final risk assessment of *S. cerevisiae*. Detalhes em: <http://www.epa.gov>.

OGM apresentou uma redução na taxa de sobrevivência em relação ao seu parental trinta dias após a inoculação, sugerindo uma maior fragilidade do OGM em competição com a microbiota nativa.

Embora o solo seja uma fonte abundante de açúcares, a capacidade de consumir xilose não conferiu ao OGM uma vantagem adaptativa em relação ao seu parental ou aos micro-organismos do solo. Isso se deve ao fato de que a microbiota natural deste ambiente possui especialistas na degradação e consumo de material lignocelulósico que competem diretamente com a linhagem OGM pela xilose disponível.

No ambiente industrial, a desvantagem competitiva das leveduras pelo consumo da xilose também é conhecida. Como detalhado no item 3 (pág. 93), a assepsia dos tanques de fermentação ocorre a cada novo ciclo fermentativo para evitar que contaminantes especializados consumam a xilose disponível. Estes impactam diretamente no rendimento do processo diretamente por consumir o açúcar disponível e indiretamente por produzir ácidos orgânicos que, por sua vez, inibem a capacidade fermentativa das leveduras¹²¹.

Dessa forma, é possível concluir que a capacidade de sobrevivência na presença de xilose da linhagem Celere-2L, apresentada na figura 15 (pág. 86) é restrita a condições de laboratório ou ao processo industrial, onde a disponibilidade deste açúcar é praticamente exclusiva e sem competição.

Proposta de Liberação Comercial

Saccharomyces cerevisiae
Linhagem Celere-2L



UNIDADE III (Anexos)

(Relatório de Avaliação de Risco – Parte II)

4. *Materiais e Métodos*
5. *Material Suplementar*
6. *Referências Bibliográficas*

Relatório de Atividades

Assessoria
Fiscal



EM BRANCO

4. MATERIAIS E MÉTODOS



4.1. Análise estatística

Diferentes métodos estatísticos foram aplicados para interpretar corretamente os dados experimentais obtidos. Todos os testes de hipótese levaram em consideração as réplicas biológicas e técnicas quando presentes. Para a maioria dos resultados foi utilizado o Teste t de Student (Teste t), considerando estatisticamente significativa as diferenças com probabilidade (valor de p) menor que 5% ($p < 0,05$)¹⁰⁸.

Para analisar os resultados obtidos a partir dos ensaios de ecotoxicidade foram utilizados o método proposto nas normas da ABNT que descreve cada teste. Por essa razão, nos ensaios com *Daphnia sp.*, *Danio sp.*, e no teste de toxicidade aguda com minhocas (*Eisenia sp.*) foi aplicada a Prova Exata de Fisher¹⁰⁸ (detalhes nos relatórios 0 e 5.4 e material suplementar 5.5).

4.2. Transformação de leveduras pelo método de acetato de lítio

Todas as etapas de transformação foram realizadas seguindo os procedimentos propostos por Gietz e colaboradores^{122,123}. Células competentes foram preparadas a partir de 300 mL de cultura crescida em meio apropriado até atingir densidade óptica entre 0,4-0,6 (absorbância em 600nm). A cultura foi centrifugada a 1.000x g por 5min a temperatura ambiente (~22°C). O pellet foi sucessivamente centrifugado e lavado duas vezes com água MilliQ estéril. As células foram ressuspensas em 1mL de 1X LiAc/1X TE (0,1M LiAc; 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5). A transformação foi realizada em tubos (tipo *ependorf*) contendo 100µL de leveduras competentes, 100-200ng do DNA de interesse (construção gênica) e 0,1mg de DNA de espermatozóide de salmão (Life Technologies). Em seguida, 600µL de PEG/LiAc (40% PEG 4000; 1X TE; 1X LiAc) foram adicionados. Após homogeneização vigorosa (vórtex), as células foram mantidas em agitação (200 rpm) por 1h a 30°C. 70µL de DMSO foram adicionados e, em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico (15min a 42°C e 2min no gelo). Células foram plaqueadas em meio de seleção apropriado e mantidas a 30°C por 48-72h.

4.3. Expressão transiente da enzima Cre-Recombinase

O sistema Cre-Recombinase-LoxP foi utilizado para retirar as construções utilizadas como marcadores de seleção (HIGO e URA3). Para isto, foi utilizado o vetor comercial pSH65. Este contém a região codificadora para a enzima Cre-Recombinase fusionada ao promotor condicional Gal1p, derivado do gene *GAL1* (*GALactokinase 1*)¹⁹. Dessa forma a expressão gênica é induzida apenas na presença de galactose. Após a transformação com o vetor pSH65, clones positivos são selecionados em meio contendo o antibiótico zeocina (marcador presente no vetor). A indução do sistema Cre-Recombinase-LoxP foi feita em 1mL de YEPG (20g/L de galactose) a 30°C por 30 minutos e agitação de 250 rpm.

A seleção das células que perderam o marcador URA3 foi realizada após a transferência da cultura para placas contendo 5-FOA (YNB 5-FOA), um análogo tóxico do aminoácido uracila. Células que não perderam o marcador URA3 metabolizam involuntariamente o 5-FOA e morrem. Para o resgate do marcador GEN, células foram selecionadas para a perda da resistência ao antibiótico higromicina após a indução da expressão da enzima Cre-Recombinase. O vetor pSH65 foi eliminado das células após breve cultivo sem uso do antibiótico zeocina.

4.4. Amplificação de regiões promotoras e terminadoras de *S. cerevisiae*

Para a montagem das construções URA3, LEU2, XKS1-URA3, XKS2-URA3, TAL1-RKI1-URA3, TLK1-RPE1-URA3 (todas contendo sequências endógenas de *S. cerevisiae*), regiões codificadoras e regulatórias (promotoras e terminadoras) foram amplificados a partir de DNA da linhagem parental (PE2) previamente extraído (Método 4.9). 10-50ng de DNA foram utilizados na reação de amplificação contendo: 1X Phusion HF Buffer, 0,5µM primers; 200 µM dNTPs, 1U Phusion DNA polimerase (New England BioLabs.). Após a desnaturação inicial a 98°C por 1min30s, 35 ciclos de amplificação incluíram: desnaturação 98°C por 20s, anelamento a 50-55°C por 15s e extensão a 72°C (30s para cada 1.000 pares de bases). A especificidade e integridade do produto amplificado foram avaliadas em gel de agarose 1%. Os *primers* utilizados nas reações são listados na tabela S1 do material confidencial.

4.5. Montagem das construções pelo método de Gibson

As construções utilizadas no desenvolvimento da Celere-2L foram montadas no vetor comercial pRS304 através do método de Gibson²⁵. O vetor previamente linearizado e as sequências de DNA (ORF, promotor, terminador; regiões flanqueadoras, etc) previamente amplificadas por PCR (Método 4.4) foram adicionados a reação contendo: 1X Isothermal Buffer, 10U Taq Ligase, 1U T5 Exonuclease e 1U Phusion DNA Polymerase. Esta foi e mantida a 50°C por 1h.

A montagem ocorre através da atividade sequencial das três enzimas presentes na reação:

- T5 Exonuclease degrada as extremidades 3' gerando grandes bordas coesivas e homólogas entre o vetor e o inserto;
- Phusion DNA polimerase preenche os espaços entre os fragmentos pareados e;
- Taq Ligase une os fragmentos.

Em seguida, a reação foi dialisada e transformada em *E. coli*. Clones positivos foram selecionados em meio de cultura apropriado (LB + amp). Plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (Método 4.7) e os insertos foram sequenciados para verificar a existência de problemas na montagem (Método 4.6).

4.6. Sequenciamento das construções

Todos as construções foram sequenciadas para confirmar a ausência de mutações pontuais ou erros de montagem. Para isto, foi utilizado o sequenciador *Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (POP-7TM Polymer; Capillary Array, 50cm) (Life Technologies)*. Para cada amostra, a reação de sequenciamento foi constituída por: 1X BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (LifeTechnologies); 1,6 μ M *primer* e 200-500ng DNA. Após desnaturação inicial a 94°C por 2min, foram realizados 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20s, anelamento a 55°C por 30s e extensão a 60°C por 2min. A precipitação foi realizada com isopropanol 60%, seguida de uma lavagem com 200 μ L de etanol 70%. O DNA foi ressuspendido em 10 μ L de formamida e desnaturado a 95°C por 5 minutos.

4.7. Extração de plasmídeos por lise alcalina

As construções montadas no plasmídeo pRS304 foram propagadas em *E. coli*. Para extração do DNA, foram utilizados os procedimentos de lise alcalina descritos por Birnboim e Doly¹²⁴. 3mL de culturas crescidas por 14-16 horas (*overnight*) foram centrifugadas em tubos de 1,5mL (do tipo eppendorf) por 3min a 20.000xg. O sobrenadante foi descartado, em seguida, a lise e a precipitação de *debris* celulares foi realizada pela adição de 300μL de “solução P1” (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 ug/mL RNase A), 300μL de “solução P2” (1% SDS, 0,2 M NaOH) e 300μL de “solução P3” (3.0 M Acetato de Pot. ssio, pH 5,5), mantendo intervalos de 5-10min entre a adição de cada solução. Após centrifugação por 15min a 20.000xg, o sobrenadante foi transferido para tubos novos (~900μL). 500μL de isopropanol 100% foram adicionados e o DNA foi precipitado por centrifugação a 20.000xg por 15min. O *pellet* foi lavado com 700μL de etanol 70% e ressuspendido com 10- 30μL de água-DEPC. A cada extração o DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

4.8. Quantificação do número de cópias do gene *xylA* por qPCR

O número de cópias do gene *xylA* foi quantificado através da técnica de qPCR (*Real-Time Quantitative PCR*), utilizando o método de quantificação absoluta baseado em curva padrão¹²⁵. Como referência para o cálculo do número de cópias foi utilizado uma sequência de DNA cópia única, previamente identificada no genoma da linhagem. Em resumo, a curva padrão foi construída a partir da amplificação desta sequência utilizando uma diluição seriada do DNA previamente extraído (de 10⁻¹ a 10⁻⁴). A concentração do DNA foi medida (absorbância 260nm) e convertida em número de cópias considerando o peso molecular da sequência amplificada (Figura S 8).

0,2mM de *primers* específicos para *xylA* foram utilizados na reação contendo: 1x *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies) e ~10ng de DNA. Para a amplificação utilizou-se o equipamento *StepOnePlus™ System* com os parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação por 30s a 95°C seguido de anelamento a 55°C por 30s e 30s de extensão a 72°C. Os resultados obtidos foram analisados utilizando *StepOne™ Software* (Life Technologies).

4.9. Extração de DNA total de leveduras

Colônias foram inoculadas independentemente em YPED e crescidas *overnight* em agitação a 30°. 1,5 mL de cultura foram centrifugados a 8000xg por 4 min em temperatura ambiente. Em seguida, o *pellet* foi homogeneizado vigorosamente em 200 uL de tampão de quebra (2% Triton-X 100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0); ~300 uL de *glass beads* e 200 uL de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1). Tubos foram centrifugados por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido. O DNA foi precipitado com 10% (v/v) de 3M NaAc pH 5,3 e 2x (v/v) de etanol absoluto (100%) e centrifugação por 20 min em máxima velocidade a 4°C. Pellet foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 30-50 uL de água MilliQ (*DNAse free*).

4.10. Análise da morfologia por microscopia de epifluorescência

Lâminas para observação em microscopia de epifluorescência foram preparadas com alíquotas de 10uL da amostra. Quando necessário, células foram marcadas com Calcofluor White e/ou FDA (Sigma-Aldrich 18909; F7378). As amostras foram observadas em microscópio de epifluorescência Olympus-BX51. Imagens foram registradas com câmara digital Olympus-DP72 acoplada ao microscópio e analisadas utilizando o software ImageProPlus.

4.11. Cultivo das linhagens Celere-2L e parental em diferentes fontes de carbono

A partir de culturas permanentes foram preparados inóculos independentes das linhagens Celere-2L e parental em 5 mL de YEPD. Após 14-16 horas de crescimento a 30°C e agitação de 200 rpm, cada inóculo foi transferido para garrafas (tipo *Schott*) contendo 100 mL de meio apropriado (Método 4.30). Novamente as culturas foram mantidas a 30°C e agitação de 200 rpm. Alíquotas de 1-1,5 mL foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinado. Estas foram utilizadas para quantificar o crescimento, dado pela densidade ótica a 600 nm (OD_{600}), medida em espectrofotômetro (Ultraspec 300 – Pharmacia Biotech). Em seguida, cada amostra foi estocada a -20°C para posterior quantificação dos substratos e produtos da fermentação por HPLC.

4.12. Análise e quantificação de substratos e produtos por HPLC

A análise e quantificação de glicose, frutose, sacarose, glicerol, xilose e etanol foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI). Cada amostra foi previamente centrifugada e filtrada em filtros apropriados (Millipore 0,22 μ) para retirada das células. Em seguida, foram injetadas no cromatógrafo (Waters 600 Chromatograph) contendo a coluna Aminex HPX-87H (BioRad). Os parâmetros operacionais utilizados foram: 35°C; 0,16 M de H₂SO₄ como fase móvel e fluxo de 600 μ L/min. A quantificação dos compostos foi possível pela comparação com as curvas padrão preparadas previamente para cada composto analisado.

4.13. Teste quantitativo da resistência ao dessecação

Ambas as linhagens foram cultivadas em 100mL YEPD (em triplicata). Para cada amostra, duas alíquotas de 1mL foram coletadas durante a fase de crescimento logarítmico (fase log) e estacionário (cultura saturada). A concentração celular de cada uma delas foi ajustada para $0,5 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^8$ células/mL. A viabilidade celular de amostras não tratadas foi determinada para uma das alíquotas. A segunda alíquota foi submetida ao tratamento. Células foram centrifugadas (2000xg) e lavadas duas vezes com 1mL de Tampão Fosfato Salino (PBS) (NaCl, 17,1 mM; KCl, 0,338 mM; Na₂HPO₄, 1,25 mM; KH₂PO₄, 0,220 mM; pH 7.4) diluído 8 vezes. Após a última lavagem, células foram ressuspensas em 1L de PBS e 100 μ L foram transferidos para novos tubos de 1,5mL (tipo Eppendorf). Estas foram centrifugadas a 12000xg por 2min. Em seguida, 85 μ L do sobrenadante foi descartado o *pellet* (em 15 μ L de PBS) foi submetido ao dessecação a vácuo por 12 e 24h sem adicionar calor (SpeedVacTM - Thermo Scientific). Ao final de 12 e 24 horas, as células foram reidratadas em PBS. Células não desseccadas e após o dessecação foram plaqueadas em YEPD e mantidas a 30°C por 24 horas. Unidades formadoras de colônias (UFCs) foram quantificadas e a resistência ao dessecação foi determinada pela viabilidade relativa: média da CFU/mL amostra dessecada : média CFU/mL do controle⁹⁰.

4.14. Teste de toxicidade aguda com minhocas

Para realização do ensaio, vasos plásticos foram preparados utilizando-se papel permeável e tela de tecido, evitando-se assim a fuga dos indivíduos pelos orifícios de drenagem do recipiente. Cada recipiente foi preenchido com substrato comercial e recebeu 12 indivíduos adultos de *Eisenia fetida*. O experimento consistiu na exposição dos indivíduos a 5 concentrações de leveduras OGM, utilizando-se como controle do experimento as mesmas concentrações de leveduras selvagens e um tratamento adicional apenas com a água destilada utilizada como solvente para as leveduras. Para cada tratamento realizou-se 5 replicatas, o experimento foi conduzido durante 14 dias, sob condições controladas de temperatura (18 – 22 °C) sob luz contínua. Ao final do experimento, a mortalidade dos indivíduos foi determinada em cada um dos recipientes (ABNT NBR 15537:2007) (Figura S 1).

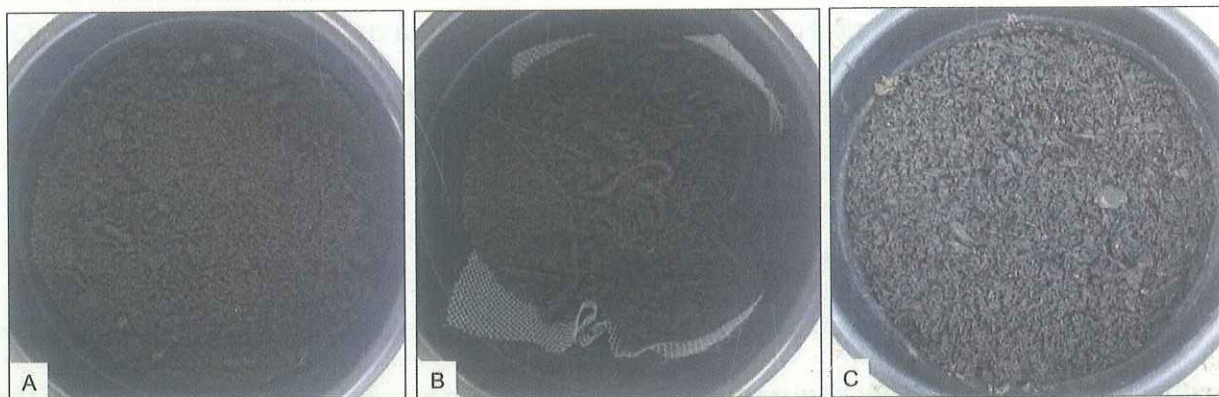


Figura S 1: Comparação do solo no início e final do experimento.

(A) Solo comercial no início do experimento. (B) Minhocas utilizadas no ensaio. (C) Solo comercial após o período de 14 dias de cultivo dos indivíduos

4.15. Método semi-quantitativo para análise da resposta do OGM a diferentes condições

Em experimentos com leveduras a resposta a diferentes estresses é rotineiramente avaliada de forma semi-quantitativa, permitindo uma análise prática (visual) e confiável de várias condições/linhagens simultaneamente. Esta abordagem complementa os resultados quantitativos e foi empregada para testes com agentes esterilizantes, temperatura e resistência ao dessecação.

Para isso, alíquotas de 10uL de cada amostra tratada com os diferentes agentes esterilizantes ou submetidas a diferentes estresses foram cuidadosamente transferidas para

placa contendo YEPD. Estas foram mantidas a 30°C e o crescimento foi registrado após 24-48 horas. A densidade celular e/ou tamanho da colônia de cada amostra é diretamente proporcional à viabilidade da cultura. Dessa forma, indica a capacidade de resistir ao agente aplicado.

4.16. Teste da resistência a agentes químicos esterilizantes

Nos tratamentos com hipoclorito de sódio, etanol, higromicina e geneticina, quatro réplicas biológicas de cada linhagem (OGM e parental) foram crescidas previamente em YEPD até atingirem a saturação da cultura. Em seguida, uma alíquota de cada réplica foi transferida para novos meios contendo concentrações crescentes de cada dos agentes esterilizantes ou antimicrobianos em questão. Alta concentração celular foi utilizada em cada nova cultura sendo: $DO_{600}=3\pm0,02$ em um volume final de 1mL. Todas as culturas foram mantidas à 30°C e o crescimento foi quantificado após 24 horas, através da leitura da absorbância a 600 nm (OD_{600}) medida em espectrofotômetro (Ultraspec 300 – Pharmacia Biotech).

4.17. Ensaio de resistência à temperatura

Três réplicas biológicas de cada linhagem (OGM e parental) foram crescidas previamente em 5mL de YEPD até atingirem a saturação da cultura. Em seguida, uma alíquota de cada réplica foi transferida para garrafas (do tipo *Schott*) contendo 100mL de YEPD. As culturas foram mantidas a 30°C e agitação de 200 rpm. Alíquotas de 1mL foram coletadas durante a fase estacionária do crescimento (alta concentração celular; $DO_{600}=12\pm0,12$) e incubadas a 80°C por 10 min. Após o tratamento, diluições apropriadas de cada amostra foram plaqueadas em YEPD e mantidas a 30°C por 24 horas. Em seguida, a viabilidade celular foi quantificada por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs).

4.18. Preparo dos inóculos das linhagens OGM e parental

A partir de culturas permanentes foram preparados três inóculos independentes das linhagens Celere-2L e parental em 50 mL de YEPD. Após 24 horas de crescimento a 30°C e agitação de 250 rpm, cada inóculo foi transferido para *Erlenmeyers* contendo 1,5 L de YEPD (50

g/L de glicose). As culturas foram mantidas novamente mantidas a 30°C e agitação de 250 rpm por 72 horas (até atingir a saturação). Após este período, todo o volume das culturas foi transferido para garrafas apropriadas e centrifugado a 3000xg por 15 min. *Pellets* foram lavados três vezes com H₂O MilliQ estéril. Para mimetizar as condições encontradas nos processos industriais, as amostras foram pesadas em balança analítica e ressuspendidas no volume adequado de H₂O MilliQ estéril, calculado para uma concentração final igual a 15g/L (massa úmida).

4.19. Análise metagenômica da microbiota da água e do solo

Estas análises foram realizadas pela equipe de bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A metagenômica baseou-se no sequenciamento *high-throughput* (MiSEQ - Illumina) de regiões específicas dos genes ribossomais v4 16S (para bactérias) e ITS9 (para fungos e microalgas). Em resumo, milhares de sequências (*reads*) de 300 pares de base (pb) foram produzidas utilizando o método *paired-end*. Para a realização da montagem independente das regiões 16S e ITS a sobreposição destes *reads* foi realizada através do programa PEAR v0.9.0, considerando pelo menos 30 pb de sobreposição (*overlap*) e uma diferença máxima de 10% entre as sequências de nucleotídeos.

A partir dos *reads* montados, foram realizadas análises taxonômicas utilizando os programas MOTHUR¹²⁶ e CDHIT¹²⁷. Como referência, os bancos de dados SILVA (16S)¹²⁸ e NCBI (ITS – padrão de busca: Fungi[Organism] AND (internal transcribed spacer OR ITS OR ITS1 OR ITS2)) foram utilizados para inferência taxonômica. Nestas análises foram utilizadas apenas sequências superpostas.

As sequências 16S foram alinhadas contra o SILVA utilizando o método de alinhamento global (penalidade de gaps = -1) e cálculo da matriz de distância. O método computacional de agrupamento baseado em distância foi aplicado sobre a matriz de forma a obter e quantificar OTUs (sigla do termo em inglês *Operational Taxonomic Unit*) de cada amostra sequenciada. As OTUs foram agrupadas pelo método *furthest* considerando uma distância máxima de 0,03. Finalmente cada OTU foi classificada em todos os níveis taxonômicos utilizando *bootstrap* com

a 1000 interações e valor de confiança maior ou igual a 80%. Todas essas análises foram realizadas através software MOTHUR.

O fato das regiões ITS variarem em sequência e em tamanho (370 e 600 pb) impossibilita a utilização do programa MOTHUR. Por essa razão, o programa CDHIT foi utilizado para cálculo das OTUs, considerando todas as sequências ITS sobrepostas. Novamente o critério de distância máxima igual a 0.03 foi aplicado. O programa BLASTn¹²⁹ foi utilizado para alinhar todas as OTUs contra o banco de ITS, sendo que a associação taxonômica foi obtida considerando o resultado mais significativo dos alinhamentos com pelo menos 90% de cobertura.

4.20. Montagem e análise do genoma da linhagem OGM

Estas análises também foram conduzidas pela equipe de bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Em resumo, o genoma da linhagem Celere-2L foi sequenciado utilizando a tecnologia de MiSEQ (Illumina), método *paired-end*. Para isso, o DNA total previamente extraído foi fragmentado em pedaços de aproximadamente 550 pb para o sequenciamento de ambas as extremidades. O método gerou aproximadamente 2,7 milhões de pares de sequências (*reads* pareados) com 300 bp cada. Cada par de *reads* foi convertido em um *read* único com tamanho efetivo de 550 pb devido a sobreposição (*overlap*) de 50 pb existente entre eles.

A montagem do genoma foi realizada pela sobreposição dos *reads* de 550 pb utilizando o software VELVET¹³⁰. Para isto, os parâmetros *k-mer*, *coverage*, *cutoff* e *expect coverage* foram otimizados de forma a maximizar o tamanho das sequências finais sobrepostas (*contigs*). A montagem produziu 238 *contigs* maiores do que 1000 bp, totalizando 11.5 Mb (mega bases).

A partir da montagem, a estimativa do número de cópias do gene *xylA* foi realizada através da análise do número de *reads* que alinham contra o gene *xylA* em relação ao restante do genoma. A informação sobre o número de *reads* alinhados para cada *contig* é fornecida pelo próprio VELVET.

4.21. Coleta da água e solo de ambientes naturais

A água foi coletada no lago do Instituto de Biologia da UNICAMP e distribuída em garrafas apropriadas para cultura (Figura S 2). Amostras de 100 mL foram utilizadas para avaliar a sobrevivência e os efeitos do OGM e parental sobre a microbiota.

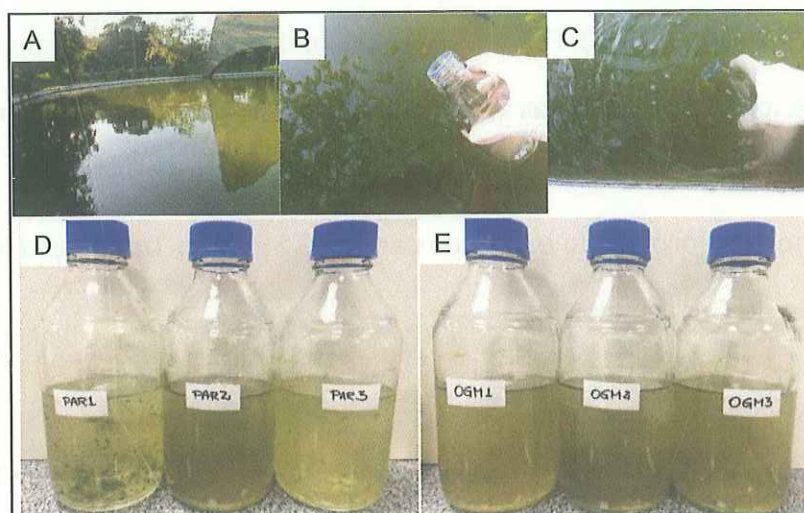


Figura S 2: Coleta da água para as análises de sobrevivência e efeitos do OGM e parental sobre a microbiota nativa. A-C: Coleta. D-E: Grupos experimentais. Parental (PAR) e OGM, respectivamente.

Solo vegetal foi adquirido no central de abastecimento (CEASA) de Campinas/SP. O material foi homogeneizado e distribuído em diferentes vasos (~300 g). Estes foram utilizados para avaliar a sobrevivência e os efeitos do OGM e parental sobre microbiota nativa, bem como as propriedades físicas e químicas do solo após a aplicação de ambas as linhagens.

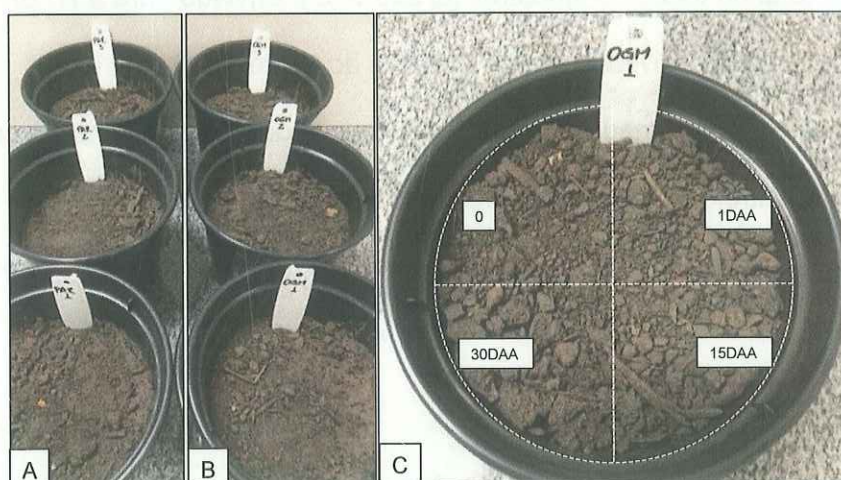


Figura S 3: Coleta da água para as análises de sobrevivência e efeitos do OGM e parental sobre a microbiota nativa. A-B: Grupos experimentais. Parental (PAR) e OGM, respectivamente. C: Método de amostragem. DAA: Dias após a aplicação.

4.22. Inoculação e coleta de amostras para ensaios de sobrevivência e identificação da microbiota aquática

Garrafas contendo 990 mL da água previamente coletada foram inoculadas com 10 mL das soluções contendo 15g/L de células do OGM e parental (massa úmida). Em seguida, alíquotas de 100 mL foram coletadas em quatro pontos: imediatamente após a inoculação; 1; 15; e 30 dias após aplicação (DAA). Para avaliar o efeito dos inóculos sobre a microbiota os pontos 1, 15, e 30 DAA foram analisados através da metagenômica. Para os testes de sobrevivência os pontos: imediatamente após a inoculação, 15 e 30 DAA foram avaliados por qPCR. O DNA total de todas as amostras foi extraído e enviado para a HTSF (*High Throughput Sequencing Facility*) da Universidade da Carolina do Norte.

4.23. Inoculação e coleta de amostras para ensaios de sobrevivência e identificação da microbiota do solo

Vasos contendo aproximadamente 300 g de solo previamente adquirido foram inoculados com 100 mL das soluções contendo 15g/L de células do OGM e parental (massa úmida). Em seguida, aproximadamente 2 g foram coletados em quatro pontos: imediatamente após a inoculação; 1; 15; e 30 dias após aplicação (DAA). Para avaliar o efeito dos inóculos sobre a microbiota os pontos 1, 15, e 30 DAA foram analisados através da metagenômica. Para os testes de sobrevivência os pontos: imediatamente após a inoculação, 15 e 30 DAA foram avaliados por qPCR. O DNA total de todas as amostras foi extraído e enviado para a HTSF (*High Throughput Sequencing Facility*) da Universidade da Carolina do Norte.

Para análise das propriedades físicas e químicas do solo, aproximadamente 300 g de solo não inoculado (controle) e dos pontos 15, e 30 DAA foram enviados para a empresa Athenas Agrícola, onde foram feitas análises de granulometria, macro e micronutrientes.

4.24. Ensaio fermentativo para análise de metabólitos gasosos

Colônias isoladas de ambas as linhagens foram inoculadas em 50 mL de meio YPD (20 g/L de glicose) e cultivadas durante 16 horas a 30°C e 200 rpm. Após esse período, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 50 mL de meio YPD ou YPX contendo 80 g/L de glicose ou 79,8 g/L de xilose, respectivamente. A suspensão celular obtida, com densidade óptica de entre 1 e 1,4, foi transferida para garrafas Schott de 100 mL, as quais foram incubadas a 30°C e 200 rpm por 30 horas (fermentações com glicose) ou 48 horas (fermentações com xilose). Foram retiradas amostras no início e no final da fermentação para análise do crescimento celular, consumo de substrato e produção de metabólitos. Os gases produzidos durante a fermentação foram coletados em bolsas específicas (*Supel-Inert Film Gas Sampling Bags* – Sigma Aldrich) acopladas às garrafas (Figura S 4). Todos os experimentos foram feitos em triplicata e as garrafas e as bolsas coletoras, foram pesadas no início e no final da fermentação com a finalidade de observar a produção e a perda de gases.



Figura S 4: Sistema para coleta de gases e quantificação da produção de CO₂. Garrafa adequada para fermentação (A) acoplada a uma *bag* apropriada para coleta dos gases produzidos.

4.25. Análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) por GS-MS

Os compostos voláteis foram introduzidos diretamente no cromatógrafo gasoso (GS) contendo uma coluna capilar em forno com programação de temperatura para separação dos analitos de interesse e, então, detectados por detector seletivo de massas. A identificação dos analitos de interesse foi feita pela comparação direta entre seus espectros de massas (MS) obtidos por impacto de elétrons com os espectros de padrões de referência. A quantificação foi

realizada pela comparação da relação das respostas (áreas) dos íons mais abundantes dos analitos, com os íons mais abundantes dos padrões internos, utilizando uma curva de calibração. A Garantia da Qualidade dos resultados apresentados são asseguradas pelo atendimento nas especificações das normas ISO 17025 e EPA8000 e EPA8260.

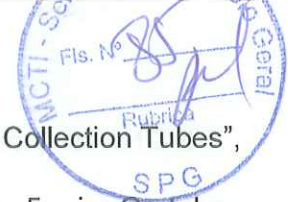
4.26. Análise da sobrevivência do por qPCR

A sobrevivência de ambas as linhagens foi quantificada por qPCR (*Real-Time Quantitative PCR*), utilizando o método de quantificação absoluta baseado em curva padrão¹²⁵. Como referência para o cálculo do número de células foi utilizado uma sequência de DNA cópia única, previamente identificada no genoma da linhagem. A curva padrão foi construída a partir da amplificação desta sequência utilizando uma diluição seriada do DNA previamente extraído (de 10^{-1} a 10^{-4}). A concentração do DNA foi medida (absorbância 260nm) e convertida em número de células considerando o peso molecular da sequência amplificada (Figura S 7). Este foi normalizado pela quantidade de água ou solo utilizados na extração de DNA.

0,2mM de *primers* específicos para *xyIA* foram utilizados na reação contendo: 1x *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies) e ~10ng de DNA. Para a amplificação utilizou-se o equipamento *StepOnePlus™ System* com os parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação por 30s a 95°C seguido de anelamento a 55°C por 30s e 30s de extensão a 72°C. Os resultados obtidos foram analisados utilizando *StepOne™ Software* (Life Technologies).

4.27. Extração de DNA total de amostras de água

A obtenção de DNA genômico a partir de amostras de água foi realizada utilizando o "PowerWater™ DNA Isolation Kit", seguindo as instruções do fabricante (MO BIO Laboratories). Resumidamente, 100 mL de água (para cada amostra) foram filtradas em filtro 0.22µL. Estes foram transferidos para "PowerWaterBead Tubes" e em seguida foram adicionados 1mL de solução PW1 a cada tubo. As amostras foram homogeneizadas vigorosamente por 5 min utilizando Mini-Beadbeater (BioSpec) e, em seguida, centrifugadas a 10.000xg por 30s.



Aproximadamente 400-500 μ L de sobrenadante foram transferidos para "2 ml Collection Tubes", 250 μ L de PW2 foram adicionados e as amostras foram mantidas a 4°C por 5 min. Os tubos foram então centrifugados a 10.000xg por 30s e 600 μ L de sobrenadante foram transferidos para tubos novos. 650 μ L de PW3 foram adicionados e as amostras foram mantidas novamente a 4°C por 5 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000xg por 30s e 750 μ L de sobrenadante foram transferidos para novos tubos. 650 μ L de PW4 foram adicionados. 675 μ L foram transferidos para a "Spin filter" e centrifugado a 10.000xg por 30s. Em seguida a coluna foi lavada com 650 μ L de PW5 e centrifugação 10.000xg por 1 min. Por fim, 100 μ L de PW6 foram utilizados para recuperar o DNA. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop – Thermo Scientific) e a qualidade do mesmo foi avaliada em gel de agarose 0,7%. Em seguida, todas as amostras foram enviadas para a *High Throughput Sequencing Facility* (HTSF) na Universidade da Carolina do Norte onde foram sequenciadas utilizando os procedimentos estabelecidos pela *facility*.

4.28. Extração de DNA total de amostras de solo

A obtenção de DNA genômico a partir de amostras de solo foi realizada utilizando o "PowerSoil™ DNA Isolation Kit", seguindo as instruções do fabricante (MO BIO Laboratories). Resumidamente, 250-350 mg de solo (para cada amostra) foram transferidas para "PowerBead Tubes" e em seguida foram adicionados 60 μ L de solução C1 a cada tubo. As amostras foram homogeneizadas vigorosamente por 2 min utilizando Mini-Beadbeater (BioSpec) e, em seguida, centrifugadas a 10.000xg por 30s. Aproximadamente 400-500 μ L de sobrenadante foram transferidos para "2 ml Collection Tubes", 250 μ L de C2 foram adicionados e as amostras foram mantidas a 4°C por 5 min. Os tubos foram então centrifugados a 10.000xg por 30s e 600 μ L de sobrenadante foram transferidos para tubos novos. 200 μ L de C3 foram adicionados e as amostras foram mantidas novamente a 4°C por 5 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000xg por 30s e 750 μ L de sobrenadante foram transferidos para novos tubos. 1.200 μ L de C4 foram adicionados. 675 μ L foram transferidos para a "Spin filter" e centrifugado a 10.000xg por 30s (passo repetido 3 vezes). Em seguida a coluna foi lavada com 500 μ L de C5 e centrifugação 10.000xg por 1 min. Por fim, 100 μ L de C6 foram utilizados para recuperar o DNA.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop – Thermo Scientific) e a qualidade do mesmo foi avaliada em gel de agarose 0,7%. Em seguida, todas as amostras foram enviadas para a *High Throughput Sequencing Facility* (HTSF) na Universidade da Carolina do Norte onde foram sequenciadas utilizando os procedimentos estabelecidos pela *facility*.

4.29. Obtenção de açúcares a partir do material lignocelulósico

Para reproduzir o processo de segunda geração, os açúcares da palha da cana-de-açúcar foram obtidos através do pré-tratamento térmico (121°C por 1 hora). Posteriormente, a hidrólise enzimática foi realizada utilizando um coquetel de celulases e hemicelulases contendo as enzimas celulase (15 FPU/g bagaço seco), celobiase (60 CBU/g bagaço seco) e xilanase (300 XU/g bagaço seco) (Novozymes, Dinamarca). As enzimas foram adicionadas e a mistura foi agitada à 50 rpm por 48 horas. O extrato resultante foi filtrado, a fração sólida foi descartada e a fração líquida utilizada como fonte de açúcares para fermentação. Obteve-se aproximadamente 47 g/L de glicose e 36 g/L de xilose.

4.30. Lista dos meios de culturas

Todos os meios utilizados são rotineiramente utilizado no trabalho com leveduras e podem ser encontrado em: *Current Protocols in Molecular Biology*¹³¹.

YEPD (Glicose)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Ágar	20 g/L (opcional)

YEPS (Sacarose)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Sacarose	20 g/L

YEPF (Frutose)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Frutose	20 g/L

YEPX (Xilose)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Xilose	20 g/L

**YEPE (Etanol)**

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Etanol	20 g/L

YEPGli (Glicerol)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicerol	20 g/L

YEPG (Galactose)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Galactose	20 g/L
Ágar	20 g/L (opcional)

YEPDhs (YEPD + Hipoclorito de Sódio)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Hipoclorito de Sódio	0,05-0,8 % v/v

YEPDet (YEPD + Etanol)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Etanol	2,5-40 % v/v

YEPDhg (YEPD + Higromicina)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Higromicina	12,5-200 ug/mL

YEPDgent (YEPD + Geneticina)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Geneticina	12,5-200 ug/mL

YEPDzeo (YEPD + Zeoncina)

Extrato de levedura	10 g/L
Peptona	20 g/L
Glicose	20 g/L
Zeocina	200 ug/mL

YNB

YNB (Yeast Nitrogen Bases)	1,7g/L
SDO (Synthetic Drop-out)	1,6g/L
Sulfato de amônia	5mg/L
Glicose	20g/L
Ágar	20g/L (opcional)

YNBX

YNB (<i>Yeast Nitrogen Bases</i>)	1,7g/L
SDO (<i>Synthetic Drop-out</i>)	1,6g/L
Sulfato de amônia	5mg/L
D-Xilose	20g/L
Ágar	20g/L (opcional)

YNB URA-

YNB (<i>Yeast Nitrogen Bases</i>)	1,7g/L
SDO (<i>Synthetic Drop-out</i>) w/o Uracil	1,6g/L
Sulfato de amônia	5mg/L
Glicose	20g/L
Ágar	20g/L (opcional)

YNB LEU-

YNB (<i>Yeast Nitrogen Bases</i>)	1,7g/L
SDO (<i>Synthetic Drop-out</i>) w/o Leucin	1,6g/L
Sulfato de amônia	5mg/L
Glicose	20g/L
Ágar	20g/L (opcional)

YNB 5-FOA

YNB (<i>Yeast Nitrogen Bases</i>)	1,7g/L
SDO (<i>Synthetic Drop-out</i>)	1,6g/L
Sulfato de amônia	5mg/L
Glicose	20g/L
5-Fluoroorotic Acid	1g/L
Ágar	20g/L (opcional)

WLN (*Wallerstein Laboratories Nutrient*)

Extrato de levedura	4g/L
<i>Trypticase</i>	5g/L
Glicose	50g/L
Fosfato de Potássio Monobásico	50g/L
Cloreto de Potássio	0,25g/L
Cloreto de Cálcio	0,125g/L
Cloreto de Ferro	2,5mg/L
Sulfato de Manganês	2,5mg/L
Verde de Bromocresol	22mg/L
Ágar	20g/L

LB + amp

Extrato de levedura	5 g/L
Triptona	10 g/L
NaCl	5g/L
Ampicilina	100 µg/mL
Ágar	20 g/L (opcional)

5. MATERIAL SUPLEMENTAR

5.1. Figuras suplementares

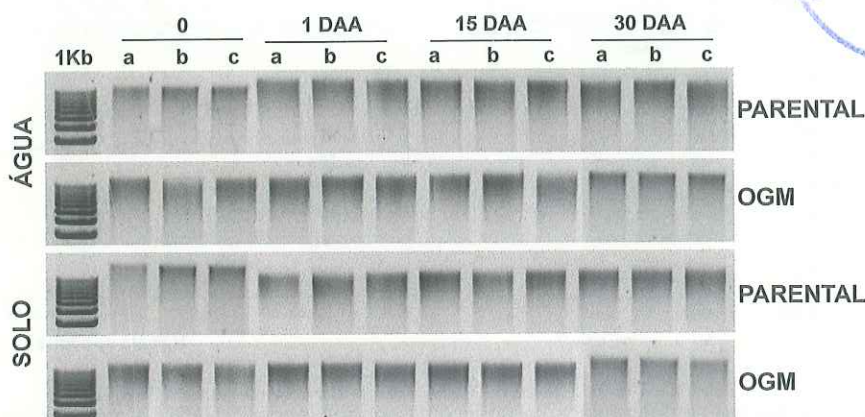


Figura S 5: DNA total extraído de amostras da água e do solo tratadas com OGM e parental. Gel de agarose 0,7% para avaliação da integridade do DNA. 0: amostras coletadas imediatamente após a aplicação. DAA: dias após a aplicação. a, b e c: réplicas biológicas.

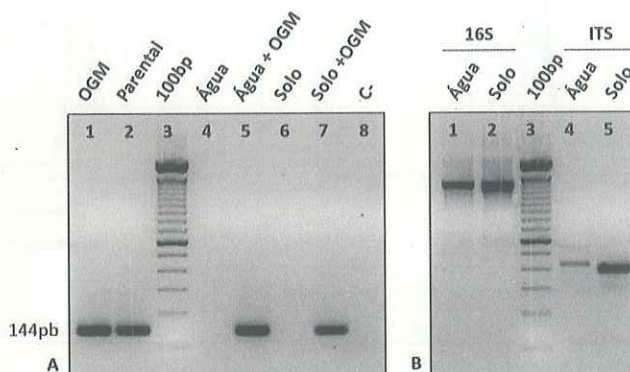


Figura S 6: Identificação das linhagens OGM e parental em amostras de solo e água.

A: Resultado obtido a partir da amplificação (por PCR) de uma sequência específica equivalente nas linhagens OGM e parental. 1: Reação contendo DNA da linhagem Celere-2L. 2: DNA da linhagem parental. 3: Marcador (GeneRuler 100bp DNA Ladder – Thermo Scientific). Banda mais intensa corresponde a 500 pares de base (pb). 4-7: Detecção em amostras não estéreis. Reações utilizando os DNAs totais obtidos a partir das amostras utilizadas nos experimentos que avaliaram a sobrevivência do OGM e seu efeito sobre a microbiota da água e do solo. 4: DNA total da água sem aplicação do OGM. 5: DNA total da água contendo o OGM. 6: DNA total do solo sem aplicação do OGM. 7: DNA total do solo contendo o OGM. 7: Controle negativo (sem DNA). 144pb: tamanho esperado. Nota-se que a detecção é efetiva uma vez que os *primers* utilizados distinguem as linhagens Celere-2L e parental (1-2) de todos os outros micro-organismos presentes na água ou no solo, uma vez que não há amplificação quando o OGM não está presente (4 e 7). B: Amplificação controle utilizando os *primers* específicos para as regiões 16S e ITS utilizados na abordagem de metagenômica. Nota-se que ambas as matrizes possuem micro-organismos.

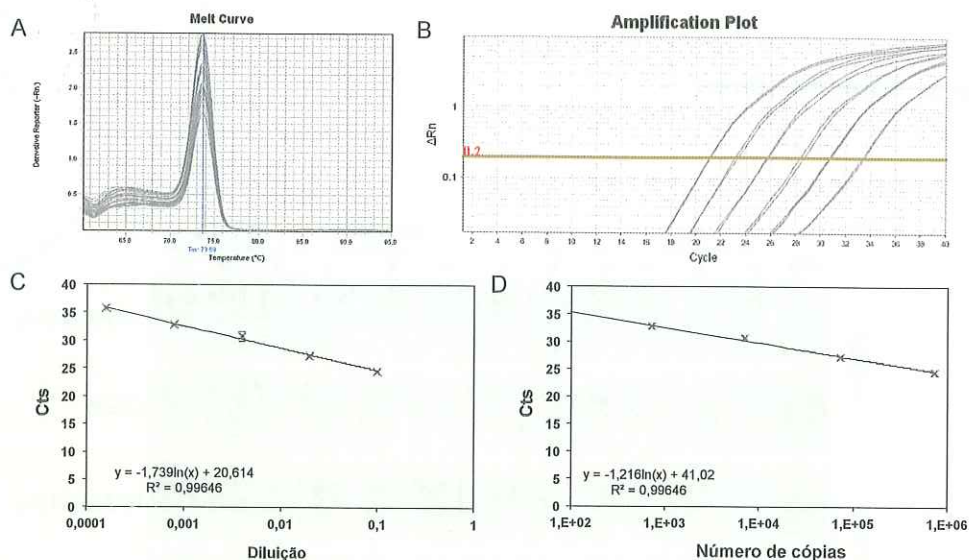


Figura S 7: Resumo dos resultados obtidos na análise da sobrevivência do OGM e parental por qPCR. A: Curva de *Melt* demonstrando a especificidade dos oligos BCO_003/004 utilizados para amplificar a região específica das linhagens OGM e parental. B: *Amplification plot* das seis diluições utilizadas para construção da curva padrão. C: Curva padrão contendo a relação do CT e as diluições. D: Curva padrão contendo a relação do CT e o número de cópias da sequência de referência.

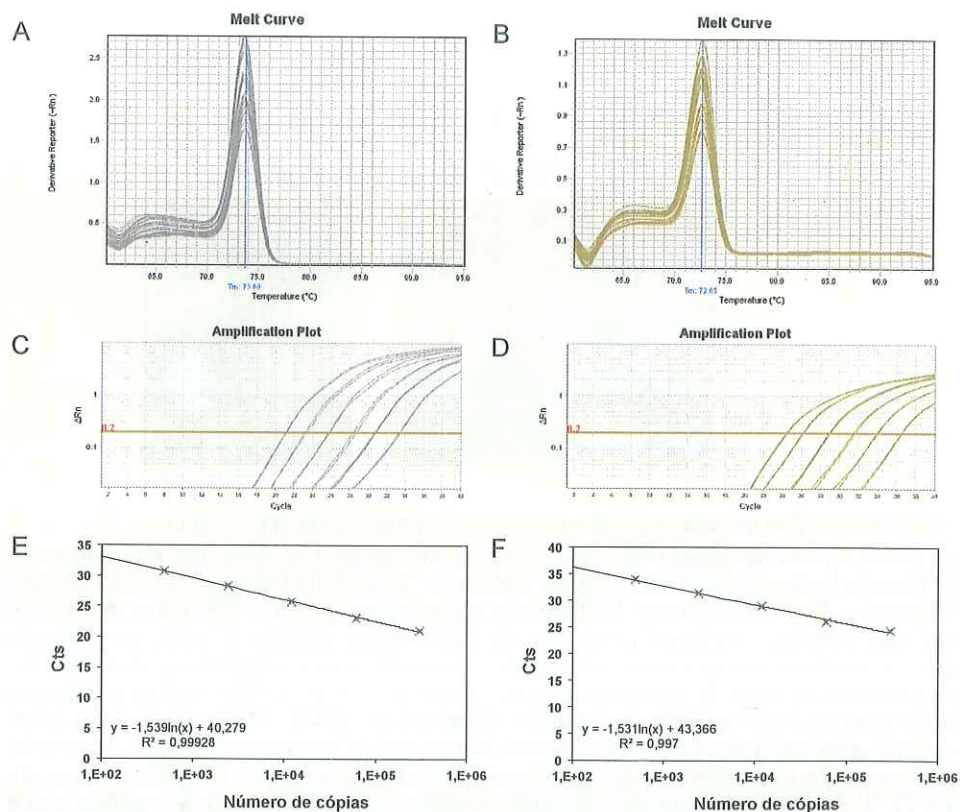


Figura S 8: Resumo dos resultados obtidos para o cálculo do número de cópias do gene *xyIA* por qPCR. A-B: Curva de *Melt* demonstrando a especificidade dos oligos BCO_003/004 e BCO_005/006 utilizados para quantificar as cópias do gene de referência (única cópia) e *xyIA*, respectivamente. C-D: *Amplification plot* das seis diluições utilizadas para construção da curva padrão. E: Curva padrão para o gene de referência. Relação do CT e número de cópias. F: Curva padrão para o gene *xyIA*. Relação do CT e número de cópias.

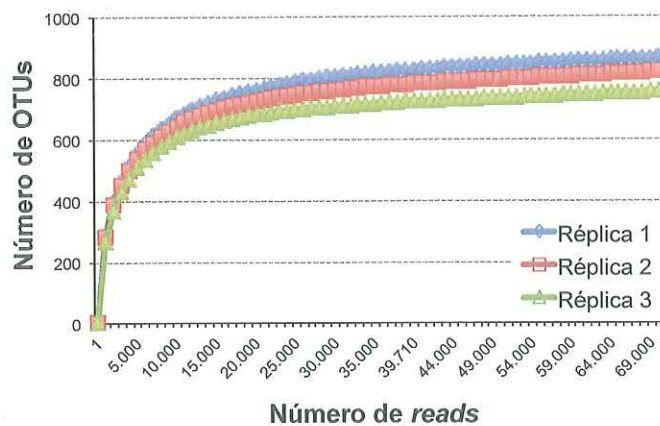


Figura S 9: Curva de rarefação.

Exemplo da análise de rarefação do sequenciamento da região 16S de amostras (triplicadas) de DNA total extraído do solo (OGM/1DAA). Nota-se que com aproximadamente 70.000 *reads* (sequências obtidas pelo sequenciamento) ocorre a saturação do sequenciamento. Dessa forma, todas as OTUs (i.e., classes de micro-organismos) presentes na amostra de solo então representadas no conjunto de dados analisados.

EM BRANCO

5.2. Tabelas suplementares



Tabela S 1: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento e montagem do genoma da linhagem Celere-2L.

Número de <i>reads</i>	2.711.916
Cobertura do genoma ¹	136x
Número de <i>contigs</i> (>1000 pb)	238
Total do genoma montado (Mpb)	11,5
Maior <i>contig</i> (pb)	344.218
Tamanho médio dos <i>contigs</i> (pb)	48.201
N50 (pb)	122.958
Número de cópias do gene <i>xylA</i>	38

¹Calculada considerando um genoma de 12 milhões de pares de base.

Tabela S 2: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região 16S de amostras de DNA total extraída da água. É importante notar que para todas as bibliotecas a quantidade de *reads* (sequências obtidas pelo sequenciamento) é suficiente para obter saturação da amostragem. Obtida a partir de 70.000 *reads*.

Biblioteca	Coleta (DAA)	Réplica	# Sequências	# Seq. Sobrepostas	% Seq. Sobrepostas
OGM	1	1	327.357	319.733	97,67%
OGM	1	2	264.886	256.988	97,02%
OGM	1	3	319.903	310.820	97,16%
Parental	1	1	344.956	337.525	97,85%
Parental	1	2	257.628	250.033	97,05%
Parental	1	3	274.174	267.871	97,70%
OGM	15	1	342.956	335.717	97,89%
OGM	15	2	535.716	526.879	98,35%
OGM	15	3	386.558	379.074	98,06%
Parental	15	1	377.034	369.475	98,00%
Parental	15	2	413.126	405.901	98,25%
Parental	15	3	303.574	297.119	97,87%
OGM	30	1	380.185	373.450	98,23%
OGM	30	2	443.786	436.500	98,36%
OGM	30	3	352.120	344.715	97,90%
Parental	30	1	350.270	343.179	97,98%
Parental	30	2	511.028	500.431	97,93%
Parental	30	3	335.462	328.338	97,88%

DAA: Dias após a aplicação

Tabela S 3: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS de amostras de DNA total extraída da água. É importante notar que para todas as bibliotecas a quantidade de *reads* (sequências obtidas pelo sequenciamento) é suficiente para obter saturação da amostragem. Obtida a partir de 70.000 *reads*.

Biblioteca	Coleta (DAA)	Réplica	#Sequências	#Seq. Sobrepostas	%Seq. Sobrepostas
OGM	1	1	546.414	521.361	95%
OGM	1	2	402.833	382.863	95%
OGM	1	3	2.094.511	2.016.131	96%
Parental	1	1	474.326	455.587	96%
Parental	1	2	460.235	441.049	96%
Parental	1	3	536.119	511.453	95%
OGM	15	1	426.785	383.265	90%
OGM	15	2	329.255	294.315	89%
OGM	15	3	289.791	244.383	84%
Parental	15	1	413.099	327.535	79%
Parental	15	2	521.171	463.838	89%
Parental	15	3	495.125	437.219	88%
OGM	30	1	358.574	314.678	88%
OGM	30	2	294.922	256.644	87%
OGM	30	3	267.988	228.647	85%
Parental	30	1	371.633	330.229	89%
Parental	30	2	353.196	287.265	81%
Parental	30	3	343.607	302.003	88%

DAA: Dias após a aplicação

Tabela S 4: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região 16S de amostras de DNA total extraída do solo. É importante notar que para todas as bibliotecas a quantidade de *reads* (sequências obtidas pelo sequenciamento) é suficiente para obter saturação da amostragem. Obtida a partir de 70.000 *reads*.

Biblioteca	Coleta (DAA)	Réplica	# Sequências	# Seq. Sobrepostas	% Seq. Sobrepostas
OGM	1	1	510.310	500.360	98,05%
OGM	1	2	372.263	365.693	98,24%
OGM	1	3	508.352	499.542	98,27%
Parental	1	1	516.171	505.169	97,87%
Parental	1	2	731.868	719.591	98,32%
Parental	1	3	630.102	618.676	98,19%
OGM	15	1	710.911	700.995	98,61%
OGM	15	2	424.066	416.898	98,31%
OGM	15	3	213.259	209.567	98,27%
Parental	15	1	329.141	323.771	98,37%
Parental	15	2	718.835	706.746	98,32%
Parental	15	3	252.342	246.901	97,84%
OGM	30	1	419.336	410.759	97,96%
OGM	30	2	303.844	294.488	96,92%
OGM	30	3	713.177	697.594	97,82%
Parental	30	1	426.479	415.957	97,53%
Parental	30	2	317.750	309.374	97,36%
Parental	30	3	405.172	397.804	98,18%

DAA: Dias após a aplicação

Tabela S 5: Resumo dos principais resultados obtidos através do sequenciamento da região ITS de amostras de DNA total extraída do solo. É importante notar que para todas as bibliotecas a quantidade de *reads* (sequências obtidas pelo sequenciamento) é suficiente para obter saturação da amostragem. Obtida a partir de 70.000 *reads*.

Biblioteca	Coleta (DAA)	Réplica	#Sequências	#Seq. Sobrepostas	%Seq. Sobrepostas
OGM	1	1	282.886	260.346	92%
OGM	1	2	304.617	260.705	86%
OGM	1	3	285.953	246.405	86%
Parental	1	1	799.080	739.178	93%
Parental	1	2	380.071	346.076	91%
Parental	1	3	240.292	227.442	95%
OGM	15	1	638.049	552.187	87%
OGM	15	2	363.789	348.298	96%
OGM	15	3	520.954	489.208	94%
Parental	15	1	297.383	282.151	95%
Parental	15	2	279.586	265.044	95%
Parental	15	3	314.609	301.936	96%
OGM	30	1	404.893	384.506	95%
OGM	30	2	432.925	411.788	95%
OGM	30	3	772.454	725.729	94%
Parental	30	1	796.688	756.233	95%
Parental	30	2	269.741	253.475	94%
Parental	30	3	540.584	513.216	95%

DAA: Dias após a aplicação



EM BRANCO

5.3. Relatório de ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Toxidade aguda com *D. similis*

Inóculo: Parental

Réplicas: 1, 2 e 3





Handwritten text at the top of the page, mostly illegible due to fading. Some words like "Handwritten" and "Date" are faintly visible.

Handwritten text in a rectangular box, oriented vertically. The text is illegible due to fading.

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_002 (WT)

Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713.** Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1831/2014 - 4.0DP**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Cultivo e controle de sensibilidade	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística	4
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7



1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_002 (WT)** para *Daphnia similis*. Após 48 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal da amostra que causa a imobilidade de 50% dos organismos testados, nas condições de ensaio - CE(I)₅₀; 48h. A descrição detalhada das condições de manutenção e dos dados biológicos da cultura encontram-se arquivados no TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_002 (WT)**.

Protocolo nº: 1831/2014 – 4.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea).

Idade: Jovens com 6 a 24 horas.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 20/02/2014.

Temperatura da água: 19,5 a 19,9°C.

Fotoperíodo: sem iluminação.

Renovação do meio: estático.

Água de diluição e controle: Meio sintético MS.

Duração: 48 horas.

2.4 Cultivo e controle de sensibilidade

O cultivo dos organismos é realizado em Meio sintético MS (Keating, 1985). Mensalmente os organismos-teste são submetidos a um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de sódio. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CE(I)_{50}$; 48h média de 2,81 g NaCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) entre 1,69 a 3,93 g NaCl/L. O último ensaio realizado, correspondente ao período de avaliação do presente ensaio com a amostra, apresentou uma concentração efetiva inicial mediana de 3,40 g NaCl/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 493 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%.

Organismos jovens, com idade entre 6 e 24 horas, foram selecionados da cultura isolada 24 horas antes do início do ensaio. Foram adicionados cinco organismos em cada béquer, contendo aproximadamente 25 mL de solução-teste, e um controle composto somente por água de diluição, foram preparadas quatro réplicas para cada concentração.

Após 48 horas de exposição, foram contados os organismos imóveis em cada béquer. São considerados imóveis aqueles incapazes de nadar durante um período de 15 segundos de observação, após agitação leve do frasco, e também os aprisionados na superfície da água, mesmo que móveis.

No início e no final do ensaio foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição (controle) e de três concentrações preparadas. Além dessas análises, foi também determinada a dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da imobilidade dos organismos do controle com a das soluções-teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).



3. RESULTADOS

O resultado do ensaio com a amostra **BC_002 (WT)** está apresentado na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do ensaio. Apesar da imobilidade de 5% dos organismos do controle, o ensaio foi considerado válido porque está abaixo do limite de 10% estabelecido para a aceitação dos resultados (ABNT, 2009).

Devido à baixa toxicidade da amostra, a imobilidade dos organismos não foi significativa, nem mesmo na maior concentração preparada (2,00%), segundo a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999). Desta forma, a $CE(I)_{50}$ - concentração efetiva inicial mediana da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. **Norma NBR ISO/IEC 17025**. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

Keating, K.I. A system of defined (sensu stricto) media for daphnid (Cladocera) culture. *Water Research*, V. 19, N°. 1, p.73-78, 1985.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_002 (WT)**.

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	5
0,125%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,25%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,50%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
1,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
2,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_002 (WT)**.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,33	6,89	7,10	7,96	46,0
0,125%	6,91	7,00	7,25	7,98	-
0,50%	7,01	7,00	6,82	7,94	-
2,00%	6,96	7,01	5,47	7,87	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

RL1831/2014 - 4.0DP

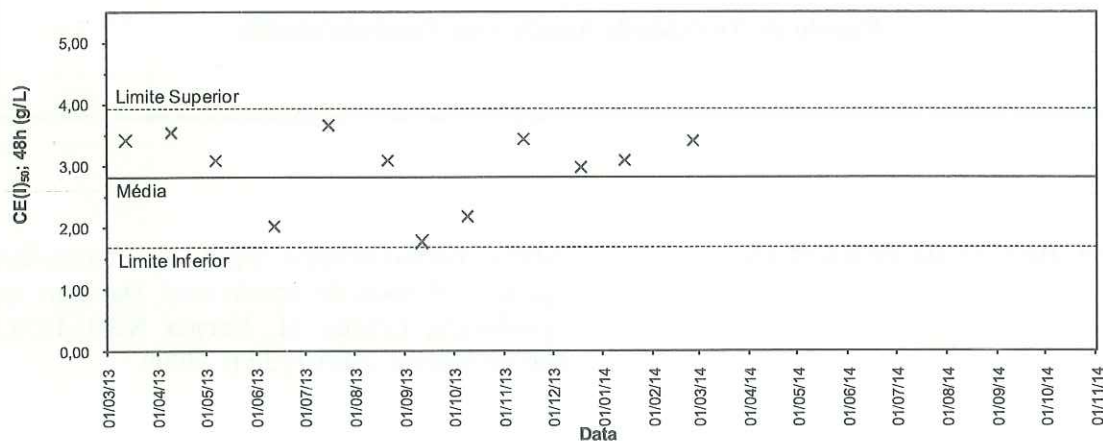
6/7
DQ – UGQ 429 – rev.01



ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO

Daphnia similis - Cloreto de Sódio - Publicada em 20/02/13



RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_002 (WT)

Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713.** Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1831/2014 - 5.0DP**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.



ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	3
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1 Dados da amostra	3
2.2 Dados do organismo-teste	3
2.3 Condições de ensaio	3
2.4 Cultivo e controle de sensibilidade	4
2.5 Procedimentos	4
2.6 Análise estatística	4
3. RESULTADOS	5
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
TABELAS	6
ANEXO 1	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_002 (WT)** para *Daphnia similis*. Após 48 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal da amostra que causa a imobilidade de 50% dos organismos testados, nas condições de ensaio - CE(I)₅₀; 48h. A descrição detalhada das condições de manutenção e dos dados biológicos da cultura encontram-se arquivados no TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_002 (WT)**.

Protocolo nº: 1831/2014 – 5.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea).

Idade: Jovens com 6 a 24 horas.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 20/02/2014.

Temperatura da água: 19,5 a 19,9°C.

Fotoperíodo: sem iluminação.

Renovação do meio: estático.

Água de diluição e controle: Meio sintético MS.

Duração: 48 horas.



2.4 Cultivo e controle de sensibilidade

O cultivo dos organismos é realizado em Meio sintético MS (Keating, 1985). Mensalmente os organismos-teste são submetidos a um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de sódio. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CE(I)_{50}$; 48h média de 2,81 g NaCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) entre 1,69 a 3,93 g NaCl/L. O último ensaio realizado, correspondente ao período de avaliação do presente ensaio com a amostra, apresentou uma concentração efetiva inicial mediana de 3,40 g NaCl/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspenso com 493 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%.

Organismos jovens, com idade entre 6 e 24 horas, foram selecionados da cultura isolada 24 horas antes do início do ensaio. Foram adicionados cinco organismos em cada béquer, contendo aproximadamente 25 mL de solução-teste, e um controle composto somente por água de diluição, foram preparadas quatro réplicas para cada concentração.

Após 48 horas de exposição, foram contados os organismos imóveis em cada béquer. São considerados imóveis aqueles incapazes de nadar durante um período de 15 segundos de observação, após agitação leve do frasco, e também os aprisionados na superfície da água, mesmo que móveis.

No início e no final do ensaio foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição (controle) e de três concentrações preparadas. Além dessas análises, foi também determinada a dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da imobilidade dos organismos do controle com a das soluções-teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

O resultado do ensaio com a amostra **BC_002 (WT)** está apresentado na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do ensaio. Apesar da imobilidade de 5% dos organismos do controle, o ensaio foi considerado válido porque está abaixo do limite de 10% estabelecido para a aceitação dos resultados (ABNT, 2009).

Devido à baixa toxicidade da amostra, a imobilidade dos organismos não foi significativa, nem mesmo na maior concentração preparada (2,00%), segundo a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999). Desta forma, a $CE(I)_{50}$ - concentração efetiva inicial mediana da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. **Norma NBR ISO/IEC 17025**. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

Keating, K.I. A system of defined (sensu stricto) media for daphnid (Cladocera) culture. *Water Research*, V. 19, Nº. 1, p.73-78, 1985.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.



TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_002 (WT)**.

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	5
0,125%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,25%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,50%	0/5	0/5	0/5	1/5	0/20	5
1,00%	1/5	0/5	0/5	0/5	0/20	5
2,00%	0/5	1/5	0/5	0/5	0/20	5

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_002 (WT)**.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,33	6,89	7,10	7,96	46,0
0,125%	7,03	6,96	7,00	7,97	-
0,50%	7,02	6,99	6,82	7,90	-
2,00%	6,94	7,02	5,68	7,71	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

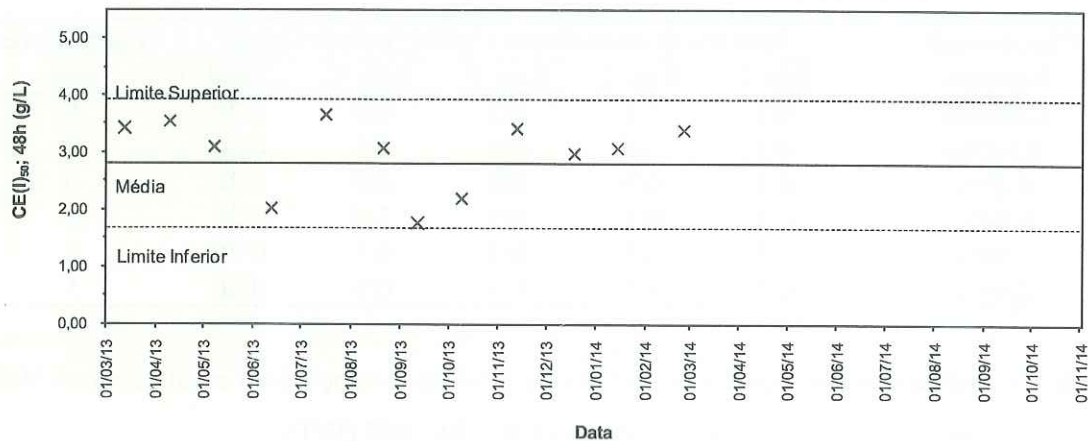
São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO
Daphnia similis - Cloreto de Sódio - Publicada em 20/02/13



RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_002 (WT)

Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Norma NBR 12713. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1831/2014 - 6.0DP**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Cultivo e controle de sensibilidade	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística	4
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7



1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_002 (WT)** para *Daphnia similis*. Após 48 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal da amostra que causa a imobilidade de 50% dos organismos testados, nas condições de ensaio - CE(I)₅₀; 48h. A descrição detalhada das condições de manutenção e dos dados biológicos da cultura encontram-se arquivados no TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_002 (WT)**.

Protocolo nº: 1831/2014 – 6.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea).

Idade: Jovens com 6 a 24 horas.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 20/02/2014.

Temperatura da água: 19,5 a 19,9°C.

Fotoperíodo: sem iluminação.

Renovação do meio: estático.

Água de diluição e controle: Meio sintético MS.

Duração: 48 horas.

2.4 Cultivo e controle de sensibilidade

O cultivo dos organismos é realizado em Meio sintético MS (Keating, 1985). Mensalmente os organismos-teste são submetidos a um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de sódio. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CE(I)_{50}$; 48h média de 2,81 g NaCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) entre 1,69 a 3,93 g NaCl/L. O último ensaio realizado, correspondente ao período de avaliação do presente ensaio com a amostra, apresentou uma concentração efetiva inicial mediana de 3,40 g NaCl/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 493 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%.

Organismos jovens, com idade entre 6 e 24 horas, foram selecionados da cultura isolada 24 horas antes do início do ensaio. Foram adicionados cinco organismos em cada béquer, contendo aproximadamente 25 mL de solução-teste, e um controle composto somente por água de diluição, foram preparadas quatro réplicas para cada concentração.

Após 48 horas de exposição, foram contados os organismos imóveis em cada béquer. São considerados imóveis aqueles incapazes de nadar durante um período de 15 segundos de observação, após agitação leve do frasco, e também os aprisionados na superfície da água, mesmo que móveis.

No início e no final do ensaio foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição (controle) e de três concentrações preparadas. Além dessas análises, foi também determinada a dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da imobilidade dos organismos do controle com a das soluções-teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).



3. RESULTADOS

O resultado do ensaio com a amostra **BC_002 (WT)** está apresentado na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do ensaio. Apesar da imobilidade de 5% dos organismos do controle, o ensaio foi considerado válido, porque está abaixo do limite de 10% estabelecido para a aceitação dos resultados (ABNT, 2009).

Devido à baixa toxicidade da amostra, a imobilidade dos organismos não foi significativa, nem mesmo na maior concentração preparada (2,00 %), segundo a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999). Desta forma, a $CE(I)_{50}$ - concentração efetiva inicial mediana da amostra foi considerada superior a 2,00 %.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Norma **NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma **NBR ISO/IEC 17025**. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

Keating, K.I. A system of defined (sensu stricto) media for daphnid (Cladocera) culture. Water Research, V. 19, Nº. 1, p.73-78, 1985.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra BC_002 (WT).

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	5
0,125%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,25%	0/5	0/5	1/5	0/5	1/20	5
0,50%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
1,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
2,00%	1/5	0/5	0/5	0/5	1/20	5

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra BC_002 (WT).

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,33	6,89	7,10	7,96	46,0
0,125%	6,99	6,98	6,84	7,95	-
0,50%	6,91	7,00	6,89	7,88	-
2,00%	6,92	7,00	5,89	7,50	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

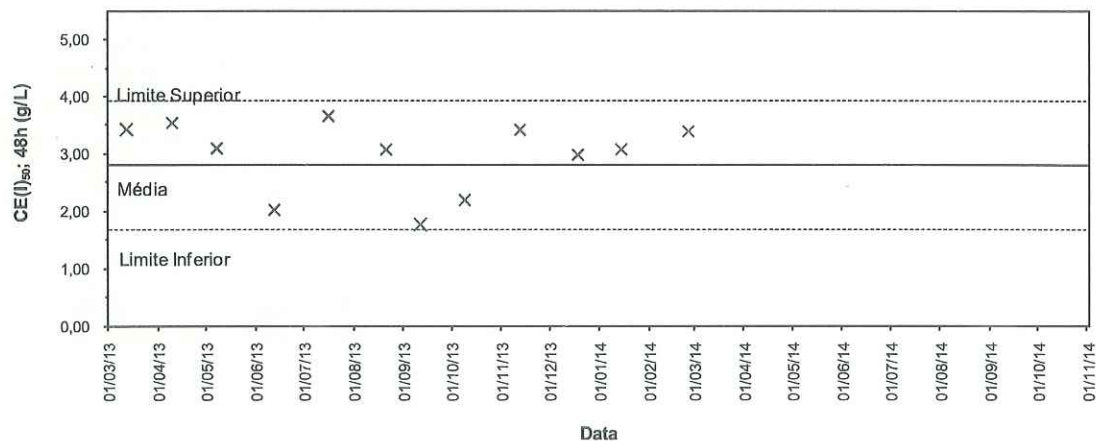
Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

RL1831/2014 - 6.0DP

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO
Daphnia similis - Cloreto de Sódio - Publicada em 20/02/13





TECHNICAL

1975

WORLD

TECHNICAL

TECHNICAL

Toxidade aguda com *D. similis*
Inóculo: OGM
Réplicas: 1, 2 e 3



PM BRANCO

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_001 (OGM)

Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713.** Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1830/2014 - 5.0DP**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Cultivo e controle de sensibilidade	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística	4
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_001 (OGM)** para *Daphnia similis*. Após 48 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal da amostra que causa a imobilidade de 50% dos organismos testados, nas condições de ensaio - CE(I)₅₀; 48h. A descrição detalhada das condições de manutenção e dos dados biológicos da cultura encontram-se arquivados no TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_001 (OGM)**.

Protocolo nº: 1830/2014 - 5.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea).

Idade: Jovens com 6 a 24 horas.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 20/02/2014.

Temperatura da água: 19,5 a 19,9°C.

Fotoperíodo: sem iluminação.

Renovação do meio: estático.

Água de diluição e controle: Meio sintético MS.

Duração: 48 horas.

2.4 Cultivo e controle de sensibilidade

O cultivo dos organismos é realizado em Meio sintético MS (Keating, 1985). Mensalmente os organismos-teste são submetidos a um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de sódio. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CE(I)_{50}$; 48h média de 2,81 g NaCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) entre 1,69 a 3,93 g NaCl/L. O último ensaio realizado, correspondente ao período de avaliação do presente ensaio com a amostra, apresentou uma concentração efetiva inicial mediana de 3,40 g NaCl/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 475 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%.

Organismos jovens, com idade entre 6 e 24 horas, foram selecionados da cultura isolada 24 horas antes do início do ensaio. Foram adicionados cinco organismos em cada béquer, contendo aproximadamente 25 mL de solução-teste, e um controle composto somente por água de diluição, foram preparadas quatro réplicas para cada concentração.

Após 48 horas de exposição, foram contados os organismos imóveis em cada béquer. São considerados imóveis aqueles incapazes de nadar durante um período de 15 segundos de observação, após agitação leve do frasco, e também os aprisionados na superfície da água, mesmo que móveis.

No início e no final do ensaio foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição (controle) e de três concentrações preparadas. Além dessas análises, foi também determinada a dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da imobilidade dos organismos do controle com a das soluções-teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).



3. RESULTADOS

O resultado do ensaio com a amostra **BC_001 (OGM)** está apresentado na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do ensaio. Apesar da imobilidade de 5% dos organismos do controle, o ensaio foi considerado válido porque está abaixo do limite de 10% estabelecido para a aceitação dos resultados (ABNT, 2009).

Devido à baixa toxicidade da amostra, a imobilidade dos organismos não foi significativa, nem mesmo na maior concentração preparada (2,00%), segundo a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999). Desta forma, a $CE(I)_{50}$ - concentração efetiva inicial mediana da amostra foi considerada superior a 2,00%

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. **Norma NBR ISO/IEC 17025**. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

Keating, K.I. A system of defined (sensu stricto) media for daphnid (Cladocera) culture. *Water Research*, V. 19, Nº. 1, p.73-78, 1985.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_001 (OGM)**.

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	5
0,125%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,25%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,50%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
1,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
2,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_001 (OGM)**.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,33	6,89	7,10	7,96	46,0
0,125%	7,08	6,93	6,74	7,87	-
0,50%	7,09	6,96	6,78	7,87	-
2,00%	7,00	6,98	5,75	7,84	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Maschetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

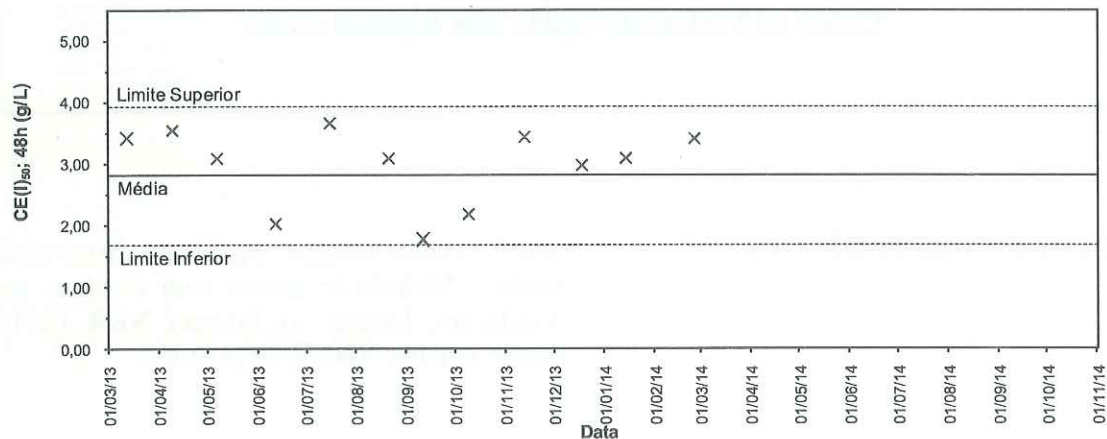
RL1830/2014 - 5.0DP



ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO

Daphnia similis - Cloreto de Sódio - Publicada em 20/02/13



RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_001 (OGM)

Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1830/2014 - 6.0DP**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.



ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Cultivo e controle de sensibilidade	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística	4
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_001 (OGM)** para *Daphnia similis*. Após 48 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal da amostra que causa a imobilidade de 50% dos organismos testados, nas condições de ensaio - CE(I)₅₀; 48h. A descrição detalhada das condições de manutenção e dos dados biológicos da cultura encontram-se arquivados no TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_001 (OGM)**.

Protocolo nº: 1830/2014 – 6.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea).

Idade: Jovens com 6 a 24 horas.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 20/02/2014.

Temperatura da água: 19,5 a 19,9°C.

Fotoperíodo: sem iluminação.

Renovação do meio: estático.

Água de diluição e controle: Meio sintético MS.

Duração: 48 horas.

2.4 Cultivo e controle de sensibilidade

O cultivo dos organismos é realizado em Meio sintético MS (Keating, 1985). Mensalmente os organismos-teste são submetidos a um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de sódio. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CE(I)_{50}$; 48h média de 2,81 g NaCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) entre 1,69 a 3,93 g NaCl/L. O último ensaio realizado, correspondente ao período de avaliação do presente ensaio com a amostra, apresentou uma concentração efetiva inicial mediana de 3,40 g NaCl/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspenso com 475 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%.

Organismos jovens, com idade entre 6 e 24 horas, foram selecionados da cultura isolada 24 horas antes do início do ensaio. Foram adicionados cinco organismos em cada béquer, contendo aproximadamente 25 mL de solução-teste, e um controle composto somente por água de diluição, foram preparadas quatro réplicas para cada concentração.

Após 48 horas de exposição, foram contados os organismos imóveis em cada béquer. São considerados imóveis aqueles incapazes de nadar durante um período de 15 segundos de observação, após agitação leve do frasco, e também os aprisionados na superfície da água, mesmo que móveis.

No início e no final do ensaio foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição (controle) e de três concentrações preparadas. Além dessas análises, foi também determinada a dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da imobilidade dos organismos do controle com a das soluções-teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

O resultado do ensaio com a amostra **BC_001 (OGM)** está apresentado na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do ensaio. Apesar da imobilidade de 5% dos organismos do controle, o ensaio foi considerado válido porque está abaixo do limite de 10% estabelecido para a aceitação dos resultados (ABNT, 2009).

Devido à baixa toxicidade da amostra, a imobilidade dos organismos não foi significativa, nem mesmo na maior concentração preparada (2,00%), segundo a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999). Desta forma, a $CE(I)_{50}$ - concentração efetiva inicial mediana da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. **Norma NBR ISO/IEC 17025**. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

Keating, K.I. A system of defined (sensu stricto) media for daphnid (Cladocera) culture. *Water Research*, V. 19, Nº. 1, p.73-78, 1985.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_001 (OGM)**.

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	5
0,125%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,25%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,50%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
1,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
2,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_001 (OGM)**.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,33	6,89	7,10	7,96	46,0
0,125%	7,05	6,97	6,96	7,92	-
0,50%	7,08	6,97	6,94	7,89	-
2,00%	7,04	7,02	6,27	7,76	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

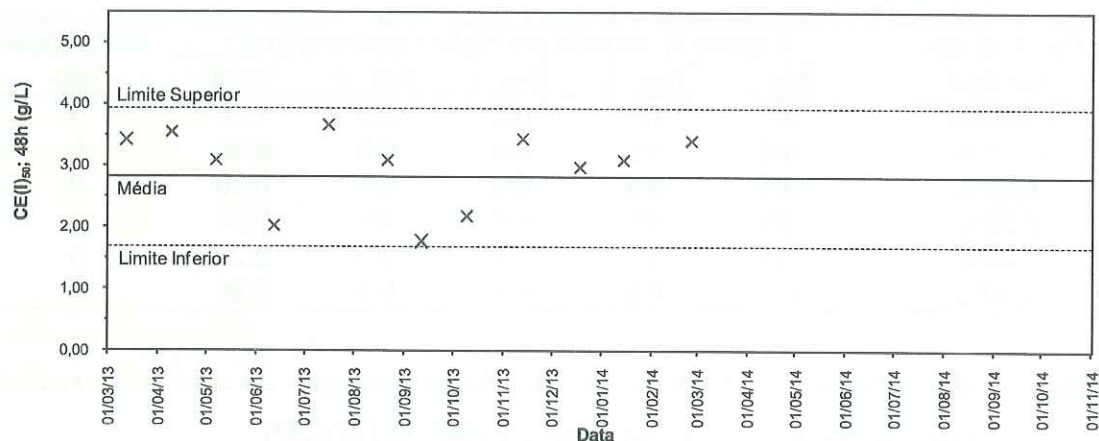
Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

RL1830/2014 - 6.0DP

6/7
DQ - UGQ 429 - rev.01

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO *Daphnia similis* - Cloreto de Sódio - Publicada em 20/02/13



RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_001 (OGM)

Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1830/2014 - 4.0DP**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Cultivo e controle de sensibilidade	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística	4
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7



1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_001 (OGM)** para *Daphnia similis*. Após 48 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal da amostra que causa a imobilidade de 50% dos organismos testados, nas condições de ensaio - CE(I)₅₀; 48h. A descrição detalhada das condições de manutenção e dos dados biológicos da cultura encontram-se arquivados no TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_001 (OGM)**.

Protocolo nº: 1830/2014 - 4.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea).

Idade: Jovens com 6 a 24 horas.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 20/02/2014.

Temperatura da água: 19,5 a 19,9°C.

Fotoperíodo: sem iluminação.

Renovação do meio: estático.

Água de diluição e controle: Meio sintético MS.

Duração: 48 horas.

2.4 Cultivo e controle de sensibilidade

O cultivo dos organismos é realizado em Meio sintético MS (Keating, 1985). Mensalmente os organismos-teste são submetidos a um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de sódio. A carta-controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CE(I)_{50}$; 48h média de 2,81 g NaCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) entre 1,69 a 3,93 g NaCl/L. O último ensaio realizado, correspondente ao período de avaliação do presente ensaio com a amostra, apresentou uma concentração efetiva inicial mediana de 3,40 g NaCl/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspenso com 475 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%.

Organismos jovens, com idade entre 6 e 24 horas, foram selecionados da cultura isolada 24 horas antes do início do ensaio. Foram adicionados cinco organismos em cada béquer, contendo aproximadamente 25 mL de solução-teste, e um controle composto somente por água de diluição, foram preparadas quatro réplicas para cada concentração.

Após 48 horas de exposição, foram contados os organismos imóveis em cada béquer. São considerados imóveis aqueles incapazes de nadar durante um período de 15 segundos de observação, após agitação leve do frasco, e também os aprisionados na superfície da água, mesmo que móveis.

No início e no final do ensaio foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição (controle) e de três concentrações preparadas. Além dessas análises, foi também determinada a dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da imobilidade dos organismos do controle com a das soluções-teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

O resultado do ensaio com a amostra **BC_001 (OGM)** está apresentado na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do ensaio. Apesar da imobilidade de 5% dos organismos do controle, o ensaio foi considerado válido porque está abaixo do limite de 10% estabelecido para a aceitação dos resultados (ABNT, 2009).

Devido à baixa toxicidade da amostra, a imobilidade dos organismos não foi significativa, nem mesmo na maior concentração preparada (2,00%), segundo a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999). Desta forma, a $CE(I)_{50}$ - concentração efetiva inicial mediana da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). **Norma NBR 12713**. Rio de Janeiro, ABNT, 23 p., 2009.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. **Norma NBR ISO/IEC 17025**. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

Keating, K.I. A system of defined (sensu stricto) media for daphnid (Cladocera) culture. *Water Research*, V. 19, Nº. 1, p.73-78, 1985.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_001 (OGM)**.

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	5
0,125%	1/5	0/5	0/5	0/5	1/20	5
0,25%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
0,50%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
1,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
2,00%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* para a amostra **BC_001 (OGM)**.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,33	6,89	7,10	7,96	46,0
0,125%	6,99	6,93	7,13	7,85	-
0,50%	7,07	6,95	6,75	7,83	-
2,00%	7,00	7,00	5,68	7,77	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

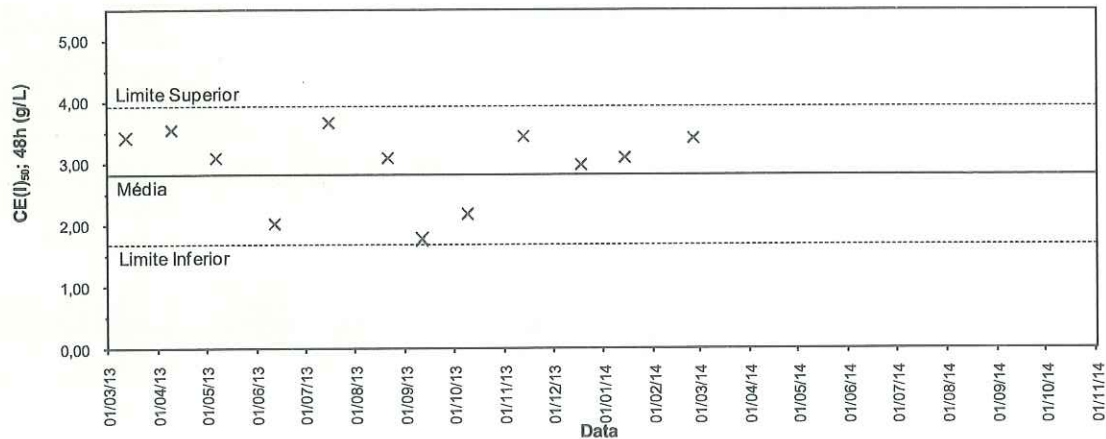
Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

RL1830/2014 - 4.0DP

ANEXO 1

TECAM
Laboratórios

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO
Daphnia similis - Cloreto de Sódio - Publicada em 20/02/13





TECHNICAL

RECEIVED
JAN 10 1960

5.4. Relatório de ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio*

Toxidade aguda com *D. rerio*

Inóculo: Parental

Réplicas: 1, 2 e 3



EM BRANCO

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_002 (WT)

Ensaio de Toxicidade Aguda com Peixes

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. Norma NBR 15088. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1831/2014 - 3.0PX**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Manutenção e controle de sensibilidade.....	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística	5
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_002 (WT)** para peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha. Após 96 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal inicial da amostra que causa letalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições de ensaio – concentração letal inicial mediana - CL(I)₅₀; 96h.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_002 (WT)**.

Protocolo nº: 1831/2014 - 3.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: tubo plástico.

Estado Físico: sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan).

Período de aclimação: 8 dias.

Peso do grupo controle: 2,1212 g.

Comprimento médio total do grupo controle: $2,4 \pm 0,2$ cm.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 22/02/2014.

Temperatura da água: 23,1 a 25,1°C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Água de diluição: água mole reconstituída.

Duração: 96 horas.

Aeração: sim.

RL1831/2014 - 3.0PX

3/7
DQ – UGQ 431 – rev.01

2.4 Manutenção e controle de sensibilidade

Para o presente ensaio, foram obtidos peixes de aquicultores idôneos, que cultivam e os mantêm até o início da idade adulta. Ao chegarem ao Tecam os peixes foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do ensaio. A manutenção foi realizada com água mole reconstituída, os organismos foram alimentados diariamente. Durante esse período não foram observados sinais de doenças e nem administrados medicamentos de qualquer espécie. No caso de mortalidade acima de 5% nos 7 dias que antecedem o ensaio, todo o lote deve ser rejeitado.

Para cada novo lote de peixes, é realizado um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de potássio. A carta controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CL(I)_{50}$; 96h média de 977,0 mg KCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) de 708,0 a 1246 mg KCl/L. O resultado do ensaio com o lote de peixes utilizado no presente estudo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) obtida foi de 746,4 mg KCl/L, com intervalo de confiança de 602,2 a 925,2 mg KCl/L (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 493 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%. A amostra foi diluída com a mesma água utilizada para a manutenção dos organismos (água mole reconstituída).

A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes e durante todo o período do ensaio. Organismos em boas condições, foram distribuídos aleatoriamente em aquários contendo dois litros de solução, foram utilizados 10 peixes para cada concentração. Um grupo com 10 organismos foi adicionado em água mole reconstituída e utilizado como controle.

A cada 24 horas foram feitas observações sobre as condições dos organismos, sendo registrado: mortalidade, movimentos anormais de natação e quaisquer outras irregularidades. Ao final do ensaio os organismos sobreviventes foram eutanasiados, os peixes do grupo controle foram preservados em álcool 30% para determinação dos dados biométricos (peso total e comprimento). Foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido antes e

depois das renovações em três concentrações testadas além da análise da dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da mortalidade dos animais do controle com a das soluções teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

Os resultados do ensaio com a amostra **BC_002 (WT)** estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas das soluções. Os valores obtidos estão dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2011).

Após 96 horas de exposição, foi observado comportamento anormal dos organismos expostos às concentrações 1,00% e 2,00% (organismo no fundo). Nenhum comportamento anormal foi observado nas demais concentrações testadas e no grupo controle.

Após 96 horas de exposição, foi observada mortalidade de 10% dos organismos expostos na concentração 0,50%. Não foi observado mortalidade nas demais concentrações de ensaio e controle. A aplicação da Prova Exata de Fisher (Zar, 1999) indicou que a amostra não exerceu efeito tóxico significativo na concentração (0,50%). Por essa razão, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

USEPA **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. C.I. Weber. (ed.). 5ª ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/821-R-02-012, 2002.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra BC_002 (WT).

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,125%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,25%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,50%	1/10	1/10	1/10	1/10	10
1,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
2,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções-teste, realizadas no ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra BC_002 (WT).

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,32	7,38	7,58	6,74	43,0
0,125%	7,42	7,50	7,26	7,04	-
0,50%	7,42	7,56	6,97	6,61	-
2,00%	7,32	7,57	5,91	6,19	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

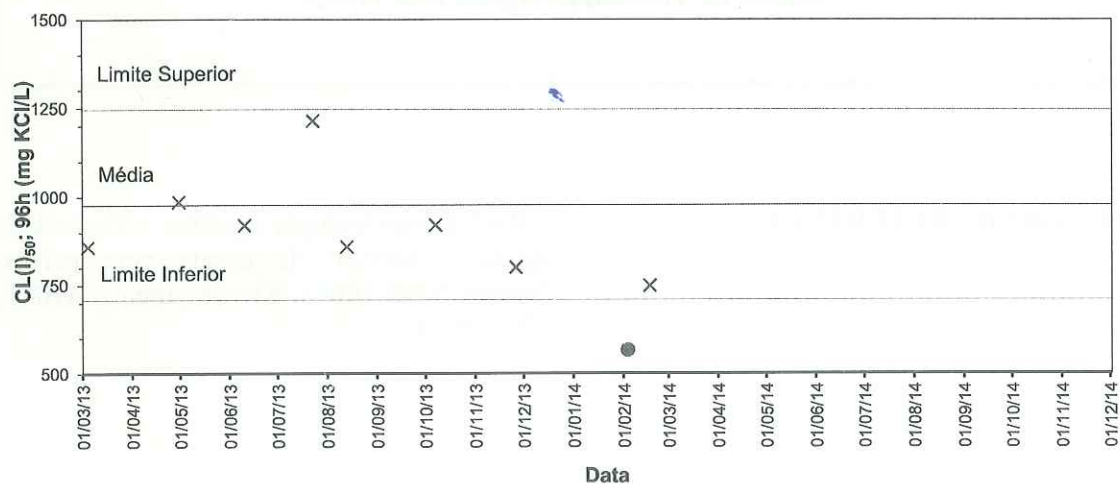
Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

RL1831/2014 - 3.0PX

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO
Danio rerio - Cloreto de Potássio - Publicada em 21/02/2013



● Teste reprovado por apresentar valor fora da faixa estabelecida na carta-controle.

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_002 (WT)

Ensaio de Toxicidade Aguda com Peixes

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1831/2014 - 2.0PX**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Manutenção e controle de sensibilidade.....	4
2.5	Procedimentos	4
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS.....	6
	ANEXO 1.....	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_002 (WT)** para peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha. Após 96 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal inicial da amostra que causa letalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições de ensaio – concentração letal inicial mediana - CL(I)₅₀; 96h.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_002 (WT)**.

Protocolo nº: 1831/2014 - 2.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan).

Período de aclimatação: 9 dias.

Peso do grupo controle: 1,7570 g.

Comprimento médio total do grupo controle: $2,3 \pm 0,3$ cm.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 19/02/2014.

Data de término: 23/02/2014.

Temperatura da água: 24,0 a 25,3°C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Água de diluição: água mole reconstituída.

Duração: 96 horas.

Aeração: sim.

RL1831/2014 - 2.0PX

2.4 Manutenção e controle de sensibilidade

Para o presente ensaio, foram obtidos peixes de aquicultores idôneos, que cultivam e os mantêm os até o início da idade adulta. Ao chegarem ao Tecam os peixes foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do ensaio. A manutenção foi realizada com água mole reconstituída, os organismos foram alimentados diariamente. Durante esse período não foram observados sinais de doenças e nem administrados medicamentos de qualquer espécie. No caso de mortalidade acima de 5% nos 7 dias que antecedem o ensaio, todo o lote deve ser rejeitado.

Para cada novo lote de peixes, é realizado um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de potássio. A carta controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CL(I)_{50}$; 96h média de 977,0 mg KCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) de 708,0 a 1246 mg KCl/L. O resultado do ensaio com o lote de peixes utilizado no presente estudo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) obtida foi de 746,4 mg KCl/L, com intervalo de confiança de 602,2 a 925,2 mg KCl/L (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 493 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%. A amostra foi diluída com a mesma água utilizada para a manutenção dos organismos (água mole reconstituída).

A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes e durante todo o período do ensaio. Organismos em boas condições, foram distribuídos aleatoriamente em aquários contendo dois litros de solução, foram utilizados 10 peixes para cada concentração. Um grupo com 10 organismos foi adicionado em água mole reconstituída e utilizado como controle.

A cada 24 horas foram feitas observações sobre as condições dos organismos, sendo registrado: mortalidade, movimentos anormais de natação e quaisquer outras irregularidades. Ao final do ensaio os organismos sobreviventes foram eutanasiados, os peixes do grupo controle foram preservados em álcool 30% para determinação dos dados biométricos (peso total e comprimento). Foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido antes e

depois das renovações em três concentrações testadas além da análise da dureza total da água de diluição.

3. RESULTADOS

Os resultados do ensaio com a amostra **BC_002 (WT)** estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas das soluções. Os valores obtidos estão dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2011).

Após 96 horas de exposição, foi observado comportamento anormal dos organismos expostos às concentrações 1,00% e 2,00% (natação lenta). Nenhum comportamento anormal foi observado nas demais concentrações testadas e no grupo controle.

Após 96 horas de exposição não foi observado mortalidade em nenhuma concentração testada e controle. Em função dos resultados obtidos, a concentração inicial letal mediana (CL(I)₅₀; 96h) da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

USEPA **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. C.I. Weber. (ed.). 5ª ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/821-R-02-012, 2002.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra BC_002 (WT).

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,125%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,25%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,50%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
1,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
2,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções-teste, realizadas no ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra BC_002 (WT).

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,51	8,28	7,45	7,30	43,0
0,125%	7,37	7,93	7,04	7,26	-
0,50%	7,54	7,88	7,01	6,88	-
2,00%	7,48	7,71	6,16	6,28	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

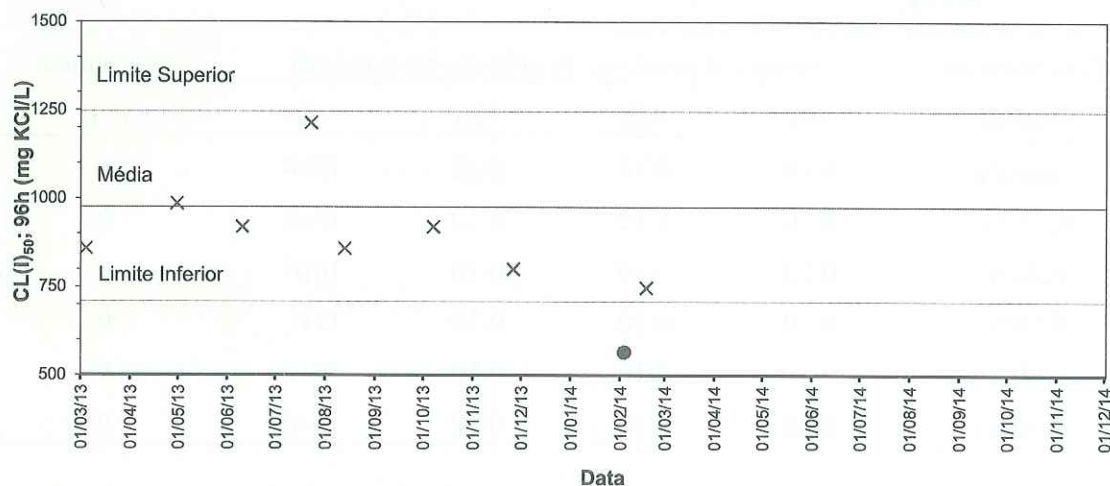
RL1831/2014 - 2.0PX

6/7

DQ - UGQ 431 - rev.01

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO
Danio rerio - Cloreto de Potássio - Publicada em 21/02/2013



● Teste reprovado por apresentar valor fora da faixa estabelecida na carta-controle.

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_002 (WT)

Ensaio de Toxicidade Aguda com Peixes

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1831/2014 - 1.0PX**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Manutenção e controle de sensibilidade.....	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística.....	5
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7



1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_002 (WT)** para peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha. Após 96 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal inicial da amostra que causa letalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições de ensaio – concentração letal inicial mediana - CL(I)₅₀; 96h.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_002 (WT)**.

Protocolo nº: 1831/2014 - 1.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan).

Período de aclimação: 8 dias.

Peso do grupo controle: 2,1212 g.

Comprimento médio total do grupo controle: $2,4 \pm 0,2$ cm.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 22/02/2014.

Temperatura da água: 23,1 a 25,1°C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Água de diluição: água mole reconstituída.

Duração: 96 horas.

Aeração: sim.

RL1831/2014 - 1.0PX

3/7

DQ – UGQ 431 – rev.01

2.4 Manutenção e controle de sensibilidade

Para o presente ensaio, foram obtidos peixes de aquicultores idôneos, que cultivam e os mantém até o início da idade adulta. Ao chegarem ao Tecam os peixes foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do ensaio. A manutenção foi realizada com água mole reconstituída, os organismos foram alimentados diariamente. Durante esse período não foram observados sinais de doenças e nem administrados medicamentos de qualquer espécie. No caso de mortalidade acima de 5% nos 7 dias que antecedem o ensaio, todo o lote deve ser rejeitado.

Para cada novo lote de peixes, é realizado um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de potássio. A carta controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CL(I)_{50}$; 96h média de 977,0 mg KCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) de 708,0 a 1246 mg KCl/L. O resultado do ensaio com o lote de peixes utilizado no presente estudo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) obtida foi de 746,4 mg KCl/L, com intervalo de confiança de 602,2 a 925,2 mg KCl/L (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 493 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%. A amostra foi diluída com a mesma água utilizada para a manutenção dos organismos (água mole reconstituída).

A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes e durante todo o período do ensaio. Organismos em boas condições, foram distribuídos aleatoriamente em aquários contendo dois litros de solução, foram utilizados 10 peixes para cada concentração. Um grupo com 10 organismos foi adicionado em água mole reconstituída e utilizado como controle.

A cada 24 horas foram feitas observações sobre as condições dos organismos, sendo registrado: mortalidade, movimentos anormais de natação e quaisquer outras irregularidades. Ao final do ensaio os organismos sobreviventes foram eutanasiados, os peixes do grupo controle foram preservados em álcool 30% para determinação dos dados biométricos (peso total e comprimento). Foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido antes e

depois das renovações em três concentrações testadas além da análise da dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da mortalidade dos animais do controle com a das soluções teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

Os resultados do ensaio com a amostra **BC_002 (WT)** estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas das soluções. Os valores obtidos estão dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2011).

Após 96 horas de exposição, foi observado comportamento anormal dos organismos expostos às concentrações 1,00% e 2,00% (organismo no fundo). Nenhum comportamento anormal foi observado nas demais concentrações testadas e no grupo controle.

Após 96 horas de exposição, foi observada mortalidade de 10% dos organismos expostos à concentração 1,00%. Não foi observado mortalidade nas demais concentrações de ensaio e controle. A aplicação da Prova Exata de Fisher (Zar, 1999) indicou que a amostra não exerceu efeito tóxico significativo na concentração testada (1,00 mg/L). Por essa razão, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

USEPA **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. C.I. Weber. (ed.). 5ª ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/821-R-02-012, 2002.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra **BC_002** (WT).

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,125%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,25%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,50%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
1,00%	1/10	1/10	1/10	1/10	10
2,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções-teste, realizadas no ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra **BC_002** (WT).

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,32	7,38	7,58	6,74	43,0
0,125%	7,34	7,53	7,35	6,23	-
0,50%	7,45	7,51	6,95	6,39	-
2,00%	7,33	7,54	5,86	6,15	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

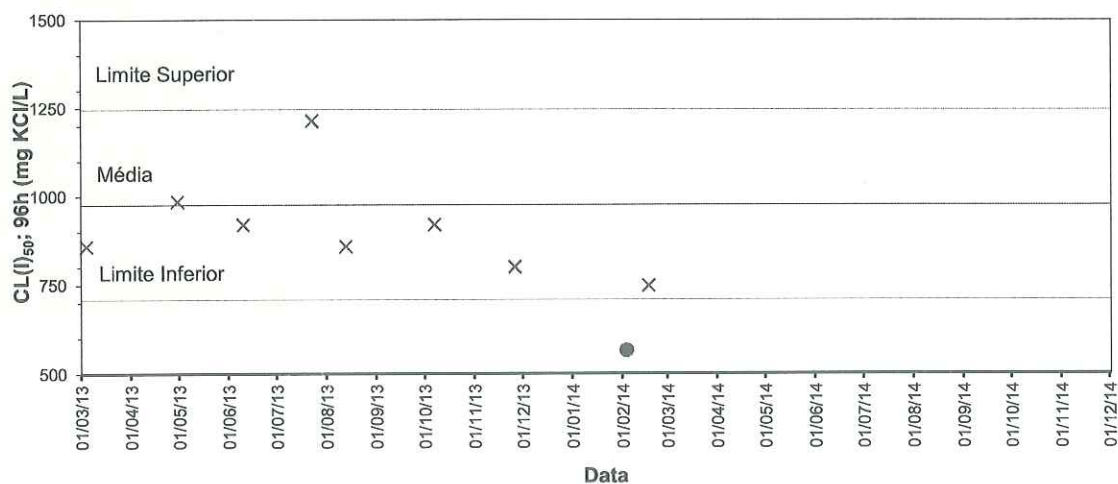
Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

RL1831/2014 - 1.0PX

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO

Danio rerio - Cloreto de Potássio - Publicada em 21/02/2013



● Teste reprovado por apresentar valor fora da faixa estabelecida na carta-controle.

EM BRANCO

Toxidade aguda com *D. rerio*
Inóculo: OGM
Réplicas: 1, 2 e 3



IN BRANCO

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_001 (OGM)

Ensaio de Toxicidade Aguda com Peixes

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1830/2014 - 2.0PX**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Manutenção e controle de sensibilidade.....	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística.....	5
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS.....	6
	ANEXO 1.....	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_001 (OGM)** para peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha. Após 96 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal inicial da amostra que causa letalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições de ensaio – concentração letal inicial mediana - CL(I)₅₀; 96h.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_001 (OGM)**.

Protocolo nº: 1830/2014 - 2.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan).

Período de aclimação: 8 dias.

Peso do grupo controle: 2,1212 g.

Comprimento médio total do grupo controle: $2,4 \pm 0,2$ cm.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 22/02/2014.

Temperatura da água: 23,1 a 25,1°C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Água de diluição: água mole reconstituída.

Duração: 96 horas.

Aeração: sim.

RL1830/2014 - 2.0PX

3/7

DQ – UGQ 431 – rev.01

2.4 Manutenção e controle de sensibilidade

Para o presente ensaio, foram obtidos peixes de aquicultores idôneos, que cultivam e os mantêm até o início da idade adulta. Ao chegarem ao Tecam os peixes foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do ensaio. A manutenção foi realizada com água mole reconstituída, os organismos foram alimentados diariamente. Durante esse período não foram observados sinais de doenças e nem administrados medicamentos de qualquer espécie. No caso de mortalidade acima de 5% nos 7 dias que antecedem o ensaio, todo o lote deve ser rejeitado.

Para cada novo lote de peixes, é realizado um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de potássio. A carta controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CL(I)_{50}$; 96h média de 977,0 mg KCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) de 708,0 a 1246 mg KCl/L. O resultado do ensaio com o lote de peixes utilizado no presente estudo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) obtida foi de 746,4 mg KCl/L, com intervalo de confiança de 602,2 a 925,2 mg KCl/L (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 475 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%. A amostra foi diluída com a mesma água utilizada para a manutenção dos organismos (água mole reconstituída).

A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes e durante todo o período do ensaio. Organismos em boas condições, foram distribuídos aleatoriamente em aquários contendo dois litros de solução, foram utilizados 10 peixes para cada concentração. Um grupo com 10 organismos foi adicionado em água mole reconstituída e utilizado como controle.

A cada 24 horas foram feitas observações sobre as condições dos organismos, sendo registrado: mortalidade, movimentos anormais de natação e quaisquer outras irregularidades. Ao final do ensaio os organismos sobreviventes foram eutanasiados, os peixes do grupo controle foram preservados em álcool 30% para determinação dos dados biométricos (peso total e comprimento). Foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido antes e

depois das renovações em três concentrações testadas além da análise da dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da mortalidade dos animais do controle com a das soluções teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

Os resultados do ensaio com a amostra **BC_001 (OGM)** estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas das soluções. Os valores obtidos estão dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2011).

Após 96 horas de exposição, foi observado comportamento anormal dos organismos expostos em todas as concentrações testadas (organismo no fundo). Nenhum comportamento anormal foi observado no grupo controle.

Após 96 horas de exposição, foi observada mortalidade igual a 10% dos organismos expostos a concentração 0,25%. Não foi observado mortalidade nas demais concentrações de ensaio. A aplicação da Prova Exata de Fisher (Zar, 1999) indicou que a amostra não exerceu efeito tóxico significativo na concentração testada (0,25%). Por essa razão, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

USEPA **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. C.I. Weber. (ed.). 5ª ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/821-R-02-012, 2002.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra BC_001 (OGM).

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,125%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,25%	1/10	1/10	1/10	1/10	10
0,50%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
1,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
2,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções-teste, realizadas no ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para amostra BC_001 (OGM).

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,32	7,38	7,58	6,74	43,0
0,125%	7,59	7,49	7,27	6,68	-
0,50%	7,61	7,56	7,08	6,81	-
2,00%	7,59	7,53	6,82	6,20	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

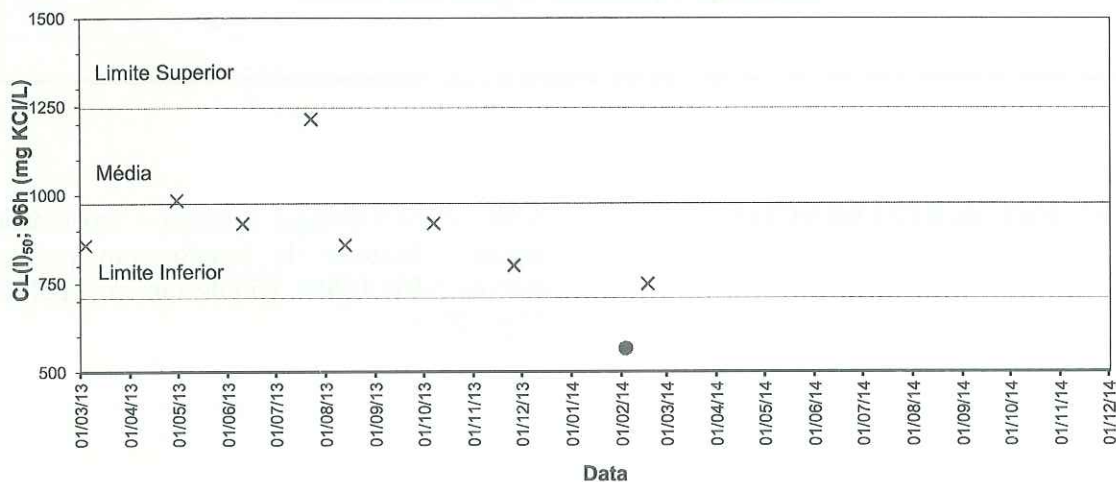
Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO

Danio rerio - Cloreto de Potássio - Publicada em 21/02/2013



● Teste reprovado por apresentar valor fora da faixa estabelecida na carta-controle.

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_001 (OGM)

Ensaio de Toxicidade Aguda com Peixes

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1830/2014 - 3.0PX**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.



ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Manutenção e controle de sensibilidade.....	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística	5
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS	6
	ANEXO 1	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_001 (OGM)** para peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha. Após 96 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal inicial da amostra que causa letalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições de ensaio – concentração letal inicial mediana - CL(I)₅₀; 96h.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_001 (OGM)**.

Protocolo nº: 1830/2014 - 3.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan).

Período de aclimatação: 8 dias.

Peso do grupo controle: 2,1212 g.

Comprimento médio total do grupo controle: $2,4 \pm 0,2$ cm.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 22/02/2014.

Temperatura da água: 23,1 a 25,1°C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Água de diluição: água mole reconstituída.

Duração: 96 horas.

Aeração: sim.

RL1830/2014 - 3.0PX

3/7
DQ – UGQ 431 – rev.01

2.4 Manutenção e controle de sensibilidade

Para o presente ensaio, foram obtidos peixes de aquicultores idôneos, que cultivam e os mantêm os até o início da idade adulta. Ao chegarem ao Tecam os peixes foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do ensaio. A manutenção foi realizada com água mole reconstituída, os organismos foram alimentados diariamente. Durante esse período não foram observados sinais de doenças e nem administrados medicamentos de qualquer espécie. No caso de mortalidade acima de 5% nos 7 dias que antecedem o ensaio, todo o lote deve ser rejeitado.

Para cada novo lote de peixes, é realizado um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de potássio. A carta controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CL(I)_{50}$; 96h média de 977,0 mg KCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) de 708,0 a 1246 mg KCl/L. O resultado do ensaio com o lote de peixes utilizado no presente estudo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) obtida foi de 746,4 mg KCl/L, com intervalo de confiança de 602,2 a 925,2 mg KCl/L (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspensão com 475 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%. A amostra foi diluída com a mesma água utilizada para a manutenção dos organismos (água mole reconstituída).

A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes e durante todo o período do ensaio. Organismos em boas condições, foram distribuídos aleatoriamente em aquários contendo dois litros de solução, foram utilizados 10 peixes para cada concentração. Um grupo com 10 organismos foi adicionado em água mole reconstituída e utilizado como controle.

A cada 24 horas foram feitas observações sobre as condições dos organismos, sendo registrado: mortalidade, movimentos anormais de natação e quaisquer outras irregularidades. Ao final do ensaio os organismos sobreviventes foram eutanasiados, os peixes do grupo controle foram preservados em álcool 30% para determinação dos dados biométricos (peso total e comprimento). Foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido antes e

depois das renovações em três concentrações testadas além da análise da dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da mortalidade dos animais do controle com a das soluções teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

Os resultados do ensaio com a amostra **BC_001 (OGM)** estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas das soluções. Os valores obtidos estão dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2011).

Após 96 horas de exposição, foi observado comportamento anormal dos organismos expostos às concentrações 1,00% (organismo na superfície) e 2,00% (organismo no fundo e superfície). Nenhum comportamento anormal foi observado nas demais concentrações testadas e no grupo controle.

Após 96 horas de exposição, foi observada mortalidade de 10% dos organismos expostos à concentração 2,00%. Não foi observada mortalidade nas demais concentrações de ensaio e controle. A aplicação da Prova Exata de Fisher (Zar, 1999) indicou que a amostra não exerceu efeitos tóxicos significativos nem mesmo na maior concentração testada (2,00%). Por essa razão, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

USEPA **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. C.I. Weber. (ed.). 5ª ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/821-R-02-012, 2002.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

RL1830/2014 - 3.0PX

5/7

DQ – UGQ 431 – rev.01

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra BC_001 (OGM).

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,125%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,25%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,50%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
1,00%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
2,00%	1/10	1/10	1/10	1/10	10

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções-teste, realizadas no ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra BC_001 (OGM).

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,32	7,38	7,58	6,74	43,0
0,125%	7,51	7,58	7,32	6,85	-
0,50%	7,54	7,60	7,11	6,82	-
2,00%	7,53	7,59	6,77	6,24	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do
TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

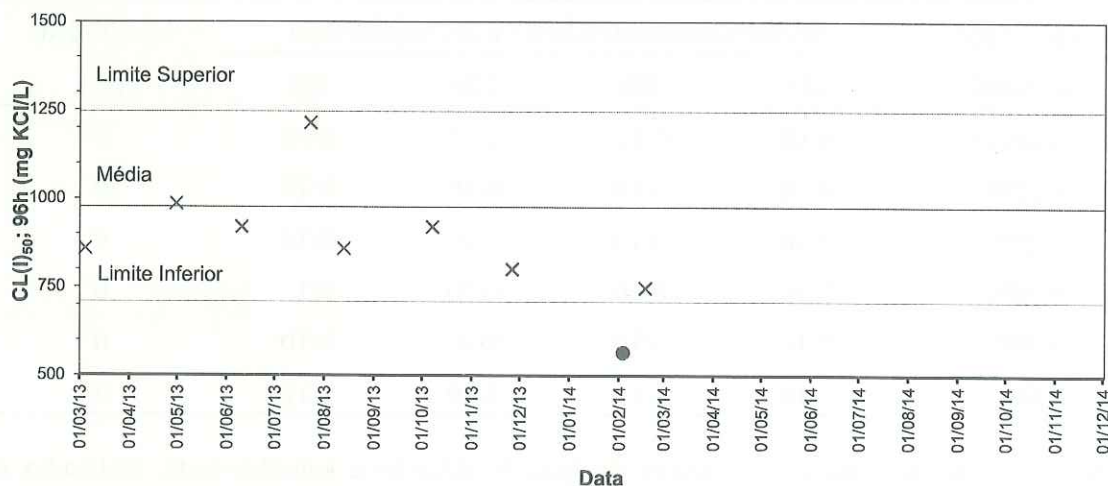
São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO
Danio rerio - Cloreto de Potássio - Publicada em 21/02/2013



● Teste reprovado por apresentar valor fora da faixa estabelecida na carta-controle.

RELATÓRIO DE ENSAIO

BC_001 (OGM)

Ensaio de Toxicidade Aguda com Peixes

MÉTODO DE REFERÊNCIA:

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

IDENTIFICAÇÃO:

Número do Relatório: **RL1830/2014 - 1.0PX**

SOLICITANTE:

GRANBIO INVESTIMENTO.
Av. Brigadeiro Faria Lima, 2277 CJ 1501
CEP: 01452-000
São Paulo/SP.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	3
2.1	Dados da amostra	3
2.2	Dados do organismo-teste	3
2.3	Condições de ensaio	3
2.4	Manutenção e controle de sensibilidade.....	4
2.5	Procedimentos	4
2.6	Análise estatística.....	5
3.	RESULTADOS	5
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	TABELAS.....	6
	ANEXO 1	7

1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda da amostra **BC_001 (OGM)** para peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha. Após 96 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal inicial da amostra que causa letalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições de ensaio – concentração letal inicial mediana - CL(I)₅₀; 96h.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Dados da amostra

Identificação da amostra: **BC_001 (OGM)**.

Protocolo nº: 1830/2014 - 1.0.

Data de entrada: 18/02/2014.

Data de fabricação: 17/02/2014.

Data de vencimento: 19/02/2014.

Nº do Lote: Não informado.

Acondicionamento: Tubo plástico.

Estado Físico: Sólido.

2.2 Dados do organismo-teste

Espécie: *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan).

Período de aclimação: 8 dias.

Peso do grupo controle: 2,1212 g.

Comprimento médio total do grupo controle: $2,4 \pm 0,2$ cm.

2.3 Condições de ensaio

Data de início: 18/02/2014.

Data de término: 22/02/2014.

Temperatura da água: 23,1 a 25,1°C.

Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Água de diluição: água mole reconstituída.

Duração: 96 horas.

Aeração: sim.

RL1830/2014 - 1.0PX

3/7

DQ – UGQ 431 – rev.01

2.4 Manutenção e controle de sensibilidade

Para o presente ensaio, foram obtidos peixes de aquicultores idôneos, que cultivam e os mantêm os até o início da idade adulta. Ao chegarem ao Tecam os peixes foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do ensaio. A manutenção foi realizada com água mole reconstituída, os organismos foram alimentados diariamente. Durante esse período não foram observados sinais de doenças e nem administrados medicamentos de qualquer espécie. No caso de mortalidade acima de 5% nos 7 dias que antecedem o ensaio, todo o lote deve ser rejeitado.

Para cada novo lote de peixes, é realizado um ensaio de sensibilidade com a substância de referência, cloreto de potássio. A carta controle de sensibilidade, utilizando dados acumulados de vários ensaios, indica uma $CL(I)_{50}$; 96h média de 977,0 mg KCl/L, com limites de controle (média $\pm$ 2.desvios-padrão) de 708,0 a 1246 mg KCl/L. O resultado do ensaio com o lote de peixes utilizado no presente estudo está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) obtida foi de 746,4 mg KCl/L, com intervalo de confiança de 602,2 a 925,2 mg KCl/L (Anexo 1).

2.5 Procedimentos

O pallet de células foi ressuspenso com 475 mL de água deionizada, correspondendo a concentração de 15g/L de células, essa solução foi considerada solução estoque 100,0%. A partir desta solução foram realizadas as seguintes concentrações-teste: 0,125%; 0,25%; 0,50%; 1,00% e 2,00%. A amostra foi diluída com a mesma água utilizada para a manutenção dos organismos (água mole reconstituída).

A alimentação dos peixes foi suspensa 24 horas antes e durante todo o período do ensaio. Organismos em boas condições, foram distribuídos aleatoriamente em aquários contendo dois litros de solução, foram utilizados 10 peixes para cada concentração. Um grupo com 10 organismos foi adicionado em água mole reconstituída e utilizado como controle.

A cada 24 horas foram feitas observações sobre as condições dos organismos, sendo registrado: mortalidade, movimentos anormais de natação e quaisquer outras irregularidades. Ao final do ensaio os organismos sobreviventes foram eutanasiados, os peixes do grupo controle foram preservados em álcool 30% para determinação dos dados biométricos (peso total e comprimento). Foram realizadas análises de pH e teor de oxigênio dissolvido antes e

depois das renovações em três concentrações testadas além da análise da dureza total da água de diluição.

2.6 Análise estatística

Para comparação da mortalidade dos animais do controle com a das soluções teste foi aplicada a Prova Exata de Fisher (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

Os resultados do ensaio com a amostra **BC_001 (OGM)** estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os resultados das análises físicas e químicas das soluções. Os valores obtidos estão dentro das faixas estabelecidas para a aceitação dos resultados (ABNT, 2011).

Após 96 horas de exposição, foi observado comportamento anormal dos organismos expostos às concentrações 1,00% e 2,00% (organismo no fundo). Nenhum comportamento anormal foi observado nas demais concentrações testadas e no grupo controle.

Após 96 horas de exposição, foi observada mortalidade de 10% dos organismos expostos nas concentrações 1,00% e 2,00%. Não foi observada mortalidade nas demais concentrações de ensaio. A aplicação da Prova Exata de Fisher (Zar, 1999) indicou que a amostra não exerceu efeitos tóxicos significativos nem mesmo na maior concentração testada (2,00%). Por essa razão, a concentração letal inicial mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) da amostra foi considerada superior a 2,00%.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. **Norma NBR 15088**. Rio de Janeiro, ABNT, 22 p., 2011.

ABNT Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Norma NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, ABNT, 31 p., 2005.

USEPA **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. C.I. Weber. (ed.). 5ª ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/821-R-02-012, 2002.

Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra **BC_001** (OGM).

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,125%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,25%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
0,50%	0/10	0/10	0/10	0/10	0
1,00%	1/10	1/10	1/10	1/10	10
2,00%	2/10	2/10	2/10	2/10	20

Tabela 2 - Análises físicas e químicas da água de diluição e soluções-teste, realizadas no ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para a amostra **BC_001** (OGM).

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O ₂ /L)		Dureza total (mg CaCO ₃ /L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,32	7,38	7,58	6,74	43,0
0,125%	7,99	7,53	7,35	6,72	-
0,50%	7,85	7,54	7,06	6,54	-
2,00%	7,67	7,57	6,39	6,55	-

Notas: Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra analisada.
Ensaio realizado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.
A reprodução parcial deste relatório de ensaio requer autorização formal por parte do TECAM Laboratórios.
Amostragem sob responsabilidade do solicitante.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2014.

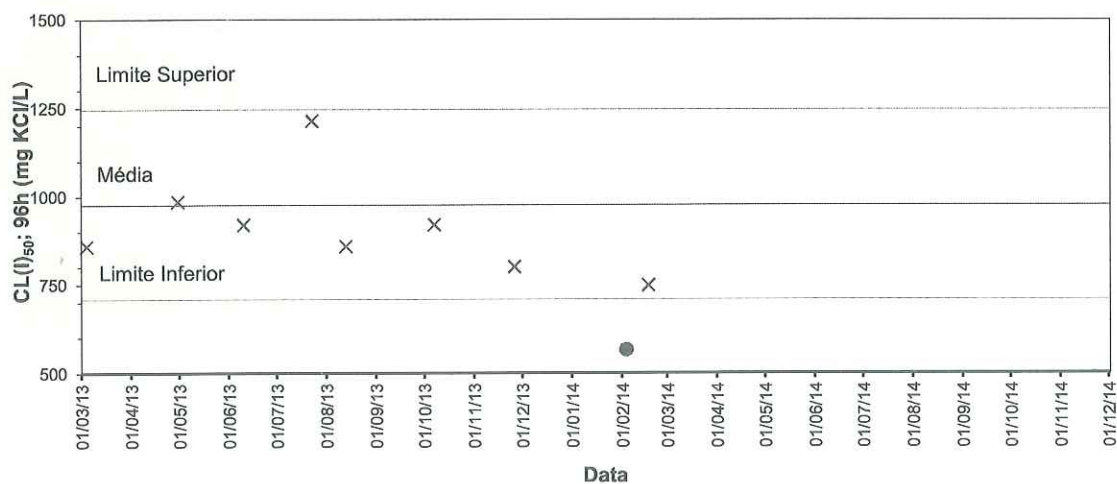
Aline Mrotzeck

Aline Mrotzeck Masquetto
Bióloga (BSc)
CRBio 89054/01-D

RL1830/2014 - 1.0PX

ANEXO 1

CARTA-CONTROLE DE AVALIAÇÃO
Danio rerio - Cloreto de Potássio - Publicada em 21/02/2013



● Teste reprovado por apresentar valor fora da faixa estabelecida na carta-controle.

EMILIO BRUNICO

5.5. Método de ensaio de toxicidade aguda com minhocas



EM
BRANCO



NORMA
BRASILEIRA

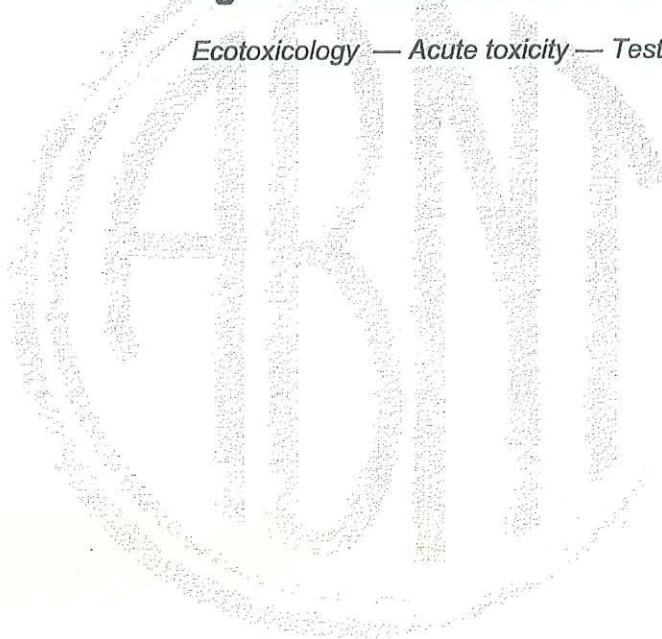
ABNT NBR
15537

Primeira edição
19.11.2007

Válida a partir de
19.12.2007

**Ecotoxicologia terrestre — Ecotoxicidade
aguda — Método de ensaio com minhocas**

Ecotoxicology — Acute toxicity — Test with earthworm



Palavras-chave: Solo. Minhoca. Monitoramento. Substância química.
Descriptors: Soil. Earthworm. Monitoring. Chemicals.

ICS 13.020.40

ISBN 978-85-07-00776-0



ASSOCIAÇÃO
BRASILEIRA
DE NORMAS
TÉCNICAS

Número de referência
ABNT NBR 15537:2007
11 páginas

©ABNT 2007



© ABNT 2007

Todos os direitos reservados. A menos que especificado de outro modo, nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida ou por qualquer meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia e microfilme, sem permissão por escrito pela ABNT.

Sede da ABNT

Av. Treze de Maio, 13 - 28º andar

20031-901 - Rio de Janeiro - RJ

Tel.: + 55 21 3974-2300

Fax: + 55 21 2220-1762

abnt@abnt.org.br

www.abnt.org.br

Impresso no Brasil



Sumário

Página

Prefácio.....	iv
1 Escopo.....	1
2 Termos e definições.....	1
3 Reagentes e materiais.....	2
4 Substrato.....	3
5 Organismos-teste.....	4
6 Carta-controle de sensibilidade.....	4
7 Ensaio.....	5
7.1 Princípio.....	5
7.2 Concentrações-teste.....	5
7.3 Ensaio preliminar.....	6
7.4 Ensaio definitivo.....	6
8 Expressão dos resultados.....	8
8.1 Geral.....	8
8.2 Cálculo da CL(I)50; 14dias.....	8
8.3 Determinação qualitativa.....	8
8.4 Validade do resultado.....	8
9 Relatório.....	8
Anexo A (informativo) Cultivo de Eisenia fetida.....	9
A.1 Descrição da espécie.....	9
A.2 Cultivo dos organismos.....	9
Anexo B (informativo) Carta-controle.....	10
Bibliografia.....	11

Prefácio

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é o Foro Nacional de Normalização. As Normas Brasileiras, cujo conteúdo é de responsabilidade dos Comitês Brasileiros (ABNT/CB), dos Organismos de Normalização Setorial (ABNT/ONS) e das Comissões de Estudo Especiais Temporárias (ABNT/CEET), são elaboradas por Comissões de Estudo (CE), formadas por representantes dos setores envolvidos, delas fazendo parte: produtores, consumidores e neutros (universidades, laboratórios e outros).

Os Documentos Técnicos ABNT são elaborados conforme as regras da Diretivas ABNT, Parte 2.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) chama atenção para a possibilidade de que alguns dos elementos deste documento podem ser objeto de direito de patente. A ABNT não deve ser considerada responsável pela identificação de quaisquer direitos de patentes.

A ABNT NBR 15537 foi elaborada pela Comissão de Estudo Especial Temporária de Análises Ecotoxicológicas (ABNT/CEET-00:001.44). O Projeto circulou em Consulta Nacional conforme Edital nº 09, de 21.08.2007 a 20.09.2007, com o número de Projeto 00:001.44-007.



Ecotoxicologia terrestre — Ecotoxicidade aguda — Método de ensaio com minhocas

1 Escopo

Esta Norma especifica um método para avaliação da ecotoxicidade aguda para a espécie de minhoca *Eisenia fetida*, com amostras de solos e substâncias químicas.

2 Termos e definições

Para os efeitos deste documento, aplicam-se os seguintes termos e definições.

2.1

água processada

água com condutividade menor que 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, após tratamento por destilação, desionização ou ultrapurificação

2.2

amostra

volume ou massa definidos, retirados de substâncias químicas ou de solos-teste

2.3

carta-controle

representação gráfica da avaliação periódica dos resultados do ensaio com uma determinada substância de referência

2.4

concentração letal inicial mediana

CL(I)50

concentração nominal da amostra no início do ensaio, que causa efeito na sobrevivência de 50 % dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio

2.5

concentração-teste

substrato que consiste na adição de soluções-estoque ao solo artificial, ou solo natural, onde são expostos os organismos-teste

2.6

ensaio estático

ensaio realizado sem a renovação periódica das concentrações-teste

2.7

organismo-teste

organismo utilizado na realização do ensaio de toxicidade

2.8

solo-controle

substrato natural ou artificial que garanta a sobrevivência dos organismos-teste, utilizado na validação do ensaio e comparação de dados

2.9

solo-teste

amostra do solo integral suspeito de contaminação

2.10

solução-estoque

amostra sem diluição, ou diluída em água ou solvente, que é adicionada ao solo artificial ou natural, a partir da qual é preparada a concentração-teste

2.11

substância de referência

substância química utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste

3 Reagentes e materiais

3.1 Todos os reagentes utilizados na execução desta Norma devem ser de grau analítico p.a.

3.2 A vidraria nova, utilizada no ensaio ou no cultivo dos organismos, deve ser lavada com solução de ácido nítrico 10 % ou ácido clorídrico 10 %, água de torneira e água processada.

3.3 A vidraria utilizada no ensaio deve ser lavada conforme segue: detergente neutro, água de torneira, acetona, solução de ácido nítrico 10 % ou ácido clorídrico 10 %, água de torneira e água processada.

3.4 Outros tipos de lavagem complementar podem ser utilizados para a remoção dos contaminantes específicos.

NOTA A limpeza inadequada dos materiais utilizados no ensaio de toxicidade e na manutenção das culturas dos organismos pode influenciar no resultado do ensaio e na sobrevivência dos organismos.

3.5 Os materiais utilizados na execução desta Norma são os seguintes:

- a) areia industrial peneirada;
- b) balança analítica;
- c) balança semi-analítica;
- d) balão volumétrico;
- e) caulim;
- f) esfagno moído seco, turfa ou pó de casca de coco;
- g) estufa de secagem;
- h) frasco de coleta;
- i) luxímetro;
- j) medidor de pH;



- k) peneiras (tamis) com abertura de malha entre 0,05 mm e 0,2 mm;
- l) pipeta volumétrica ou automática;
- m) recipiente-teste de plástico ou de vidro, com capacidade para 2 L;
- n) termômetro.

4 Substrato

4.1 Para a realização dos ensaios, solo natural ou artificial podem ser utilizados como substrato.

4.2 O solo artificial pode ser preparado a partir dos componentes descritos na Tabela 1, previamente secos e misturados nas devidas proporções, de forma a apresentar uma massa homogênea.

Tabela 1 — Componentes para o preparo do solo artificial

Componente	Proporção %	Preparo
Esfagno moído seco, ou turfa ou pó de casca de coco	10	Remover restos vegetais ou granulados
Caulim	20	-
Areia industrial peneirada	70	Lavar com água processada, secar e peneirar para obtenção de areia com mais de 50 % das partículas entre 0,05 mm e 0,2 mm

4.3 Calcular a umidade do substrato conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Umidade inicial (\%)} = \frac{(P_u - P_s)}{P_s} \times 100$$

onde:

P_u é a massa de 10 g do substrato;

P_s é a massa resultante após a secagem de P_u em estufa com temperatura aproximada de 105 °C por 24 h.

4.4 A umidade final requerida para a realização do ensaio deve estar entre 35 % e 45 %.

4.5 Caso a umidade do substrato não esteja nessa faixa, adicionar água processada para a correção da umidade, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de água processada necessário (mL)} = \frac{(\text{umidade final} - \text{umidade inicial}) \times M}{100}$$

onde:

M é a massa de substrato úmido por recipiente-teste, expressa em gramas (g).

4.6 O substrato deve apresentar pH entre 5,5 e 7,0. A determinação do pH do solo deve ser efetuada conforme 4.6.1 a 4.6.3.

4.6.1 Preparar uma suspensão na proporção de 1:5 de substrato com água processada ou solução de cloreto de potássio (KCl) a 1 mol/L. Homogeneizar a suspensão e deixar em repouso no mínimo por 2 h e no máximo por 24 h.

4.6.2 Medir o pH do sobrenadante.

4.6.3 Caso seja necessário ajustar o pH do substrato, adicionar quantidades crescentes de carbonato de cálcio até o pH atingir a faixa especificada (entre 5,5 e 7,0) na pasta. Com base na quantidade de carbonato de cálcio utilizada em 50 g de pasta, calcular a quantidade proporcional desse reagente a ser adicionada na massa total do substrato ou diretamente nas replicatas das concentrações-teste.

5 Organismos-teste

5.1 Consiste em organismos adultos da minhoca da espécie *Eisenia fetida*, que podem ser obtidos nas condições estabelecidas no Anexo A.

5.2 Os organismos-teste devem ter idade superior a dois meses, com a presença de clitelo (ver Figura A.1) e possuir peso individual entre 300 mg e 600 mg.

5.3 Os organismos-teste devem pertencer a lotes homogêneos e estar aclimatados no solo artificial ou natural, por 24 h, antes de sua utilização no ensaio.

6 Carta-controle de sensibilidade

6.1 Mensalmente, a sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada através de um ensaio com a substância de referência cloroacetamida.

6.2 Alternativamente o ensaio com a substância de referência pode ser realizado em paralelo ao ensaio com a amostra. Caso o resultado não esteja dentro dos limites da carta-controle, repetir ambos os ensaios com o novo lote de organismos-teste.

6.3 O ensaio de sensibilidade deve ser realizado nas mesmas condições do ensaio definitivo (ver 7.4) e o resultado expresso em CL(I)50; 14 dias.

6.4 O valor obtido no ensaio de sensibilidade deve estar compreendido no intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente para o organismo-teste, que corresponde à carta-controle (ver Anexo B)

NOTA No caso de utilização de solo artificial, a CL(I)50; 14 dias de cloroacetamida encontra-se entre 20 mg/kg e 80 mg/kg.

6.5 Todos os procedimentos relacionados ao ensaio devem ser reavaliados, quando:

- a) dois resultados consecutivos estiverem além dos limites definidos na carta-controle; ou
- b) sete resultados consecutivos estiverem de um mesmo lado da linha de tendência central.

6.6 Durante o período de reavaliação dos procedimentos, não deve ser realizado novo ensaio com amostras, até que se obtenha um resultado do ensaio de sensibilidade dentro dos limites da carta-controle.



7 Ensaio

7.1 Princípio

Este método consiste na exposição de adultos da espécie de minhoca *Eisenia fetida* a várias concentrações da amostra por 14 dias, em sistema estático.

7.2 Concentrações-teste

7.2.1 As concentrações-teste consistem na adição de substância química ao substrato ou adição de soluções-estoque da substância química neste substrato, em proporções definidas, que são dispostas nos recipientes-teste. As Tabelas 2 e 3 apresentam exemplos de preparo das concentrações-teste.

7.2.2 As concentrações-teste devem ser preparadas imediatamente antes do início do ensaio.

7.2.3 As concentrações-teste devem estar na temperatura do ensaio (18 °C a 22 °C) no momento da transferência dos organismos.

7.2.4 Sempre que possível, a substância química (se solúvel até a concentração de 1 000 mg/L) deve estar na forma de soluções-estoque, ou seja, a substância química deve ser diluída em água processada antes da adição ao substrato. Para o cálculo dessas soluções, recomenda-se o uso da seguinte fórmula:

$$\text{Solução-estoque (mg/L)} = \frac{\text{concentração - teste (mg/kg)} \times M}{V \text{ (mL)}} \times 1\,000$$

Onde:

M é a massa de substrato úmido em cada replicata mais solução-estoque, expressa em gramas (g);

V é o volume da solução-estoque a ser adicionado ao substrato, em cada replicata.

8.2.5 Para substâncias insolúveis, utilizar acetona ou outro solvente que se volatilize rapidamente (como hexano ou clorofórmio), da seguinte forma: pesar a massa de amostra a ser utilizada em cada replicata, misturar com 1 mL de solvente ou o menor volume capaz de dissolvê-la; adicionar 10 g de areia, misturar bem, deixar evaporar o solvente por 1 h ou 2 h e misturar ao restante da massa de substrato.

Tabela 2 — Exemplo de preparo das concentrações-teste, considerando 1 % de teor de umidade inicial do substrato e utilização de amostra solúvel em água

Concentração-teste mg/kg de substrato	Solução-estoque mg/L	Peso final de substrato úmido 0,750 kg	
		Massa de substrato g	Volume ^a para ajustar a umidade a 35 % mL
1 000	2 941,17	495	255
100	294,11	495	255
10	29,41	495	255
1	2,94	495	255
0,1	0,29	495	255
Controle	Água processada	495	255

^a Volume de água processada ou de solução-teste a ser adicionado no início do ensaio.

Tabela 3 — Exemplo de preparo das concentrações-teste de substâncias insolúveis em água, considerando 1 % de teor de umidade inicial do substrato e uso de 10 g de areia + 1 mL de solvente orgânico para solubilização

Concentração-teste mg/kg de substrato	Massa da substância química mg	Volume de solvente para solubilização mL	Peso final de substrato úmido 0,750 kg		
			Massa de areia g	Massa de substrato g	Volume ^a para ajustar a umidade a 35 % mL
1 000	750	1	10	485	255
100	75	1	10	485	255
10	7,5	1	10	485	255
1	0,75	1	10	485	255
0,1	0,07	1	10	485	255
Controle	-	-	10	485	255
Controle + solvente	-	1	10	485	255

^a Volume de água processada a ser adicionado no início do ensaio.

7.3 Ensaio preliminar

7.3.1 Para avaliação de substâncias químicas, um ensaio preliminar pode ser realizado para estabelecer um intervalo de concentrações-teste a ser utilizado no ensaio definitivo.

7.3.2 Devem ser preparadas duplicatas para cada concentração-teste da amostra, e para cada uma utilizar no mínimo 10 organismos-teste.

7.3.3 Ao final do ensaio, é determinada a menor concentração-teste que causa letalidade a 100 % dos organismos e a maior concentração-teste na qual não se observa letalidade.

7.3.4 No ensaio preliminar, o tempo de exposição dos organismos pode ser de até sete dias.

7.4 Ensaio definitivo

7.4.1 Um resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade com minhocas é apresentado na Tabela 4.

7.4.2 Para os ensaios com substâncias químicas, preparar uma série de no mínimo cinco concentrações-teste de razão de diluição 10, utilizando informações conhecidas da amostra ou o intervalo de concentrações estabelecido no ensaio preliminar.



7.4.3 Para os ensaios nos quais pretende-se obter resultado qualitativo (isto é, tóxico ou não tóxico), não devem ser preparadas concentrações-teste.

7.4.4 Para cada concentração-teste, solo-teste e solo-controle, devem ser preparadas no mínimo quatro replicatas, colocando-se aproximadamente 0,750 kg do substrato em cada recipiente-teste.

NOTA As normas ISO e ASTM recomendam massas de substrato de 0,500 kg e 0,200 kg, respectivamente.

7.4.5 Os recipientes-teste devem ser cobertos com tampa perfurada para evitar o ressecamento do substrato.

7.4.6 Preparar um solo-controle com o mesmo número de replicatas das concentrações-teste, somente com solo e com os organismos-teste. No caso da utilização de solventes deve ser preparado um controle adicional contendo a concentração mais elevada desse agente (ver 7.2.5).

7.4.7 Em cada replicata devem ser adicionados sobre o substrato no mínimo 10 organismos previamente aclimatados (ver 5.3).

7.4.8 O ensaio deve ser conduzido sem alimentação dos organismos-teste.

7.4.9 O ensaio deve ser mantido em temperatura entre 18 °C e 22 °C, com luz contínua (luminosidade de 400 lux a 800 lux).

7.4.10 A mortalidade observada deve ser registrada no 7º dia e ao final do ensaio.

7.4.11 A mortalidade é avaliada pela transferência do solo do recipiente-teste para uma bandeja, seguida da segregação dos organismos-teste e aplicação de estímulo mecânico, com auxílio de uma pinça ou agulha. O organismo-teste é considerado morto quando não mostrar nenhuma reação ao estímulo mecânico. O organismo morto deve ser removido do ensaio.

7.4.12 Após o registro da mortalidade no 7º dia, os organismos vivos e o solo devem ser recolocados nos recipientes-teste de origem, onde são mantidos até o final do ensaio.

7.4.13 Diariamente, devem ser medidas a temperatura ambiente (máxima e mínima) e a umidade relativa do ar, enquanto a luminosidade deve ser medida no mínimo no início, no 7º dia e ao final do ensaio.

Tabela 4 — Resumo dos requisitos para o ensaio de ecotoxicidade aguda com minhocas

Requisitos	Condição
Tipo de ensaio	Estático
Duração	14 dias
Organismo-teste	Adultos de <i>Eisenia fetida</i> , com peso entre 300 mg e 600 mg
Substrato	Solo
Quantidade de solo na concentração-teste/recipientes	Aproximadamente 750 g
Número mínimo de concentrações	Cinco, mais o controle
Número mínimo de replicatas por concentração-teste, ou amostra de solo	Quatro
Número mínimo de organismos por replicata	10
Temperatura	18 °C a 22 °C
Fotoperíodo	Luz contínua
Alimentação	Nenhuma
Efeito observado	Mortalidade
Expressão dos resultados	CL(I)50;14dias, tóxico ou não tóxico

8 Expressão dos resultados

8.1 Geral

8.1.1 O resultado deve ser expresso em CL(I)50;14dias, ou de forma qualitativa (tóxico ou não tóxico).

8.1.2 Seja qual for a forma de expressão utilizada, o resultado deve referenciar o tempo de exposição do ensaio.

8.1.3 O resultado deve ser expresso em miligramas por quilograma de solo.

8.2 Cálculo da CL(I)50; 14dias

8.2.1 Ao final do ensaio com substância química, deve ser calculada a porcentagem de mortalidade para cada concentração-teste em relação ao número total de organismos utilizados.

8.2.2 A CL(I)50 deve ser calculada através de método estatístico apropriado.

NOTA Interpolação gráfica, Probitas, Trimmed Spearman-Kärber são exemplos de métodos estatísticos apropriados.

8.3 Determinação qualitativa

Ao final do ensaio com solo-teste, se não houver diferença estatisticamente significativa na mortalidade em relação ao controle, o resultado deve ser expresso como "não tóxico". Se houver diferença significativa, o resultado deve ser expresso como "tóxico".

NOTA Teste de hipóteses e prova exata de Fisher são exemplos de métodos estatísticos apropriados para a avaliação da significância dos resultados.

8.4 Validade do resultado

O resultado é considerado válido se, ao término do período de ensaio, a mortalidade dos organismos no controle for menor ou igual a 10 %.

9 Relatório

O relatório de ensaio deve possuir no mínimo as seguintes informações:

- a) referência do método e da espécie utilizados;
- b) todos os dados necessários para identificar a amostra;
- c) data e hora de coleta da amostra (quando aplicável) e do início do ensaio;
- d) dados biológicos (quantificação da mortalidade nas concentrações-teste) e físicos referentes ao ensaio;
- e) resultado do ensaio, com intervalo de confiança em nível de 95 % quando apropriado e método estatístico utilizado;
- f) qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições de ensaio;
- g) modificações e eventuais ocorrências durante a realização do ensaio.



Anexo A (informativo)

Cultivo de Eisenia fetida

A.1 Descrição da espécie

Eisenia fetida (subespécies *E. fetida fétida* e *E. fetida andrej*) é uma espécie de anelídeo que ocorre em solos ricos em matéria orgânica. Sua sensibilidade a agentes químicos assemelha-se à de outros organismos que habitam a maioria dos solos. Trata-se de uma espécie muito prolífica, sendo que cada adulto produz de dois a cinco casulos por semana (dos quais emergem vários organismos). É disponível no comércio e pode ser cultivada em uma variedade de materiais orgânicos.

A.2 Cultivo dos organismos

A.2.1 É recomendável misturar esterco de cavalo (ou de bovinos) com outro material (turfa ou esfagno ou pó de casca de coco), na proporção de 1:1, mas outros resíduos de origem animal também são apropriados.

A.2.2 A mistura deve manter um pH igual 7, possuir condutividade iônica baixa (< 6,0 milli-Siemens) e não ser excessivamente contaminada com amônia e urina animal.

A.2.3 Os organismos reprodutores podem ser mantidos em caixas com dimensões de 50 cm x 50 cm x 15 cm, ideais para cultivo em larga escala, podendo, desta forma, produzir acima de 1 000 organismos jovens em seis semanas.

A.2.4 Para produzir um número suficiente de organismos deve ser adicionado 1 kg de organismos (com peso de 1 g por indivíduo) em 20 kg de mistura.

A.2.5 Para obter organismos com idade e peso controlados, é conveniente iniciar o cultivo com casulos, os quais demoram de três a quatro semanas para eclodir e de sete a oito semanas para se tornar minhocas maduras.

A.2.6 Para o cultivo, os organismos devem ser mantidos em temperatura entre 18 °C e 22 °C.

Anexo B (informativo)

Carta-controlre

- B.1** A carta-controlre pode ser elaborada manualmente, em papel milimetrado ou em programa de computador.
- B.2** Após 20 resultados de ensaio de toxicidade, com substância de referência, calcular o valor-médio ($\bar{X}$), o desvio-padrão (σ) e o coeficiente de variação (CV).
- B.3** Na inexistência de 20 resultados de ensaio, deve ser calculada a média provisória com no mínimo cinco resultados, até que se completem os 20 resultados e se obtenha a média definitiva.
- B.4** Calcular dois desvios-padrão (2σ), superior e inferior à média obtida. Estes valores devem ser grafados na carta-controlre através de linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade.
- B.5** A cada 20 resultados de ensaio, recalculer o valor-médio ($\bar{X}$), o desvio-padrão (σ) e o coeficiente de variação (CV) para elaboração de uma nova carta-controlre.
- B.6** Os resultados de ensaio que ultrapassarem os limites de controle ($\pm 2\sigma$) ao longo do tempo não devem ser utilizados para os cálculos mencionados em B.5.



Bibliografia

1) ASTM E 1676-04:2004, *Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm Eisenia fetida and enchytraeid potworm Enchytraeus albidus*

2) EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997.

ISO 11268-1:1993, *Soil quality: effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*

ISO 10390:1994, *Soil quality: determination of pH*

KIEHL, E. J. **Manual de Edafologia – Relações solo-planta**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1979.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD. **Guideline for testing of chemicals. earthworm, acute toxicity tests**, 1984.



EM BRANCO

5.6. Relatório de ensaio: análise de compostos orgânicos voláteis (COVs)

Quantificação de COVs

Condição: Parental crescendo em glicose

Réplicas: 1, 2 e 3



EM BRANCO



TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 - Nova Paulínia
CEP 13140-285 - Paulínia - SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20816/2014-1.0



Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20816/2014-1.0

Identificação Cliente: WT G1

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:** 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20816/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropeno	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metilacetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA**TASQA Serviços Analíticos Ltda**

CNPJ 67.994.897/0001-97

Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia

CEP 13140-285 – Paulínia – SP

Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885

Home Page: <http://www.tasqa.com.br>**RELATÓRIO DE ENSAIO****Nº 20816/2014-1.0****Amostra: 20816/2014-1.0**

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroetano	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroetano	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroetano	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos****Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig****Supervisora****Lab. Orgânica****CRQ 04449813 - 4ª Região****Código para verificação de autenticidade deste documento:****3505221405143587****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20817/2014-1.0

Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20817/2014-1.0

Identificação Cliente: WT G2

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:** 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA**TASQA Serviços Analíticos Ltda**

CNPJ 67.994.897/0001-97

Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia

CEP 13140-285 – Paulínia – SP

Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885

Home Page: <http://www.tasqa.com.br>**RELATÓRIO DE ENSAIO****Nº 20817/2014-1.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20817/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropeno	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metilacetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

Amostra: 20817/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloreto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloreto de Etano	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroeteno	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroeteno	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos****Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**1907221405143957****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em **pesquisar**3º - Clique em **Abrir Documento**



TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 - Nova Paulínia
CEP 13140-285 - Paulínia - SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20818/2014-1.0



Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20818/2014-1.0

Identificação Cliente: WT G3

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:** 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20818/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropano	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[106-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metilacetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA**TASQA Serviços Analíticos Ltda**

CNPJ 67.994.897/0001-97

Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia

CEP 13140-285 – Paulínia – SP

Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885

Home Page: <http://www.tasqa.com.br>**RELATÓRIO DE ENSAIO****Nº 20818/2014-1.0****Amostra: 20818/2014-1.0**

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloreto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloreto de Etano	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroeteno	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroeteno	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos****Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig****Supervisora****Lab. Orgânica****CRQ 04449813 - 4ª Região****Código para verificação de autenticidade deste documento:****0509221405144534****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento

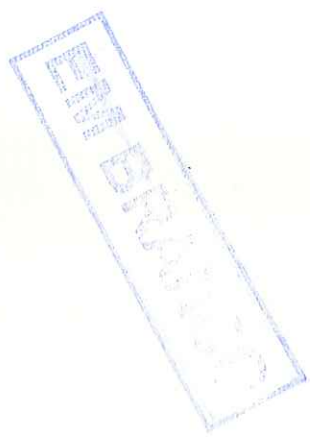


MINISTRE DES COMMUNICATIONS
ET DES RELATIONS PUBLIQUES

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information
Document released pursuant to the Access to Information Act



Document	Version	Date	Statut	Commentaire
Document 1	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 2	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 3	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 4	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 5	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 6	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 7	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 8	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 9	1.0	2011-01-01	En vigueur	
Document 10	1.0	2011-01-01	En vigueur	



Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information
Document released pursuant to the Access to Information Act

Quantificação de COVs
Condição: OGM crescendo em glicose
Réplicas: 1, 2 e 3



FT
US
BRANCO



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20819/2014-1.0



Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20819/2014-1.0

Identificação Cliente: OGM G1

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término: 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20819/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropeno	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metilacetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20819/2014-1.0****Amostra: 20819/2014-1.0**

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeteno	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroeteno	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroeteno	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas

⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.

⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.

Métodos**Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**4910221405144904****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**

1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20820/2014-1.0

Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20820/2014-1.0

Identificação Cliente: OGM G2

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:** 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA**TASQA Serviços Analíticos Ltda**

CNPJ 67.994.897/0001-97

Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia

CEP 13140-285 – Paulínia – SP

Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885

Home Page: <http://www.tasqa.com.br>**RELATÓRIO DE ENSAIO****Nº 20820/2014-1.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20820/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropeno	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metilacetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20820/2014-1.0****Amostra: 20820/2014-1.0**

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloreto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloreto de Etano	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroeteno	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroeteno	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos****Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**3512221405145591****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20821/2014-1.0



Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20821/2014-1.0

Identificação Cliente: OGM G3

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término: 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**“Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório.”**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20821/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropano	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metiletiletona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA**TASQA Serviços Analíticos Ltda**

CNPJ 67.994.897/0001-97

Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia

CEP 13140-285 – Paulínia – SP

Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885

Home Page: <http://www.tasqa.com.br>**RELATÓRIO DE ENSAIO****Nº 20821/2014-1.0****Amostra: 20821/2014-1.0**

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroetano	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroetano	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroetano	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.
ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos****Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig****Supervisora****Lab. Orgânica****CRQ 04449813 - 4ª Região****Código para verificação de autenticidade deste documento:****2214221405146291****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE
WASHINGTON, D. C.

OFFICE OF THE SECRETARY
WASHINGTON, D. C.
JAN 10 1935



No.		Name		Address		City		State		Country	
1		2		3		4		5		6	
7		8		9		10		11		12	
13		14		15		16		17		18	
19		20		21		22		23		24	
25		26		27		28		29		30	
31		32		33		34		35		36	
37		38		39		40		41		42	
43		44		45		46		47		48	
49		50		51		52		53		54	
55		56		57		58		59		60	
61		62		63		64		65		66	
67		68		69		70		71		72	
73		74		75		76		77		78	
79		80		81		82		83		84	
85		86		87		88		89		90	
91		92		93		94		95		96	
97		98		99		100		101		102	
103		104		105		106		107		108	
109		110		111		112		113		114	
115		116		117		118		119		120	
121		122		123		124		125		126	
127		128		129		130		131		132	
133		134		135		136		137		138	
139		140		141		142		143		144	
145		146		147		148		149		150	
151		152		153		154		155		156	
157		158		159		160		161		162	
163		164		165		166		167		168	
169		170		171		172		173		174	
175		176		177		178		179		180	
181		182		183		184		185		186	
187		188		189		190		191		192	
193		194		195		196		197		198	
199		200		201		202		203		204	
205		206		207		208		209		210	
211		212		213		214		215		216	
217		218		219		220		221		222	
223		224		225		226		227		228	
229		230		231		232		233		234	
235		236		237		238		239		240	
241		242		243		244		245		246	
247		248		249		250		251		252	
253		254		255		256		257		258	
259		260		261		262		263		264	
265		266		267		268		269		270	
271		272		273		274		275		276	
277		278		279		280		281		282	
283		284		285		286		287		288	
289		290		291		292		293		294	
295		296		297		298		299		300	
301		302		303		304		305		306	
307		308		309		310		311		312	
313		314		315		316		317		318	
319		320		321		322		323		324	
325		326		327		328		329		330	
331		332		333		334		335		336	
337		338		339		340		341		342	
343		344		345		346		347		348	
349		350		351		352		353		354	
355		356		357		358		359		360	
361		362		363		364		365		366	
367		368		369		370		371		372	
373		374		375		376		377		378	
379		380		381		382		383		384	
385		386		387		388		389		390	
391		392		393		394		395		396	
397		398		399		400		401		402	
403		404		405		406		407		408	
409		410		411		412		413		414	
415		416		417		418		419		420	
421		422		423		424		425		426	
427		428		429		430		431		432	
433		434		435		436		437		438	
439		440		441		442		443		444	
445		446		447		448		449		450	
451		452		453		454		455		456	
457		458		459		460		461		462	
463		464		465		466		467		468	
469		470		471		472		473		474	
475		476		477		478		479		480	
481		482		483		484		485		486	
487		488		489		490		491		492	
493		494		495		496		497		498	
499		500		501		502		503		504	
505		506		507		508		509		510	
511		512		513		514		515		516	
517		518		519		520		521		522	
523		524		525		526		527		528	
529		530		531		532		533		534	
535		536		537		538		539		540	
541		542		543		544		545		546	
547		548		549		550		551		552	
553		554		555		556		557		558	
559		560		561		562		563		564	
565		566		567		568		569		570	
571		572		573		574		575		576	
577		578		579		580		581		582	
583		584		585		586		587		588	
589		590		591		592		593		594	
595		596		597		598		599		600	
601		602		603		604		605		606	
607		608		609		610		611		612	
613		614		615		616		617		618	
619		620		621		622		623		624	
625		626		627		628		629		630	
631		632		633		634		635		636	
637		638		639		640		641		642	
643		644		645		646		647		648	
649		650		651		652		653		654	
655		656		657		658		659		660	
661		662		663		664		665		666	
667		668		669		670		671		672	
673		674		675		676		677		678	
679		680		681		682		683		684	
685		686		687		688		689		690	
691		692		693		694		695		696	
697		698		699		700		701		702	
703		704		705		706		707		708	
709		710		711		712		713		714	
715		716		717		718		719		720	
721		722		723		724		725		726	
727		728		729		730		731		732	
733		734		735		736		737		738	
739		740		741		742		743		744	
745		746		747		748		749		750	
751		752		753		754		755		756	
757		758		759		760		761		762	
763		764		765		766		767		768	
769		770		771		772		773		774	
775		776		777		778		779		780	
781		782		783		784		785		786	
787		788		789		790		791		792	
793		794		795		796		797		798	
799		800		801		802		803		804	
805		806		807		808		809		810	
811		812		813		814		815		816	
817		818		819		820		821		822	
823		824		825		826		827		828	
829		830		831		832		833		834	
835		836		837		838		839		840	
841		842		843		844		845		846	
847		848		849		850		851		852	
853		854		855		856		857		858	
859		860		861		862		863		864	
865		866		867		868		869		870	
871		872		873		874		875		876	
877		878		879		880		881		882	
883		884		885		886		887		888	
889		890		891		892		893		894	
895		896		897		898		899		900	
901		902		903		904		905		906	
907		908		909		910		911		912	
913		914		915		916		917		918	
919		920		921		922		923		924	
925		926		927		928		929		930	
931		932		933		934	</				

Quantificação de COVs
Condição: OGM crescendo em xilose
Réplicas: 1, 2 e 3





FIM BRANCO



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 - Nova Paulínia
CEP 13140-285 - Paulínia - SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20813/2014-1.0



Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20813/2014-1.0

Identificação Cliente: OGM X1

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:** 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20813/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropeno	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metiletilcetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20813/2014-1.0****Amostra: 20813/2014-1.0**

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeteno	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroeteno	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroeteno	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos****Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**2500221405142546****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20814/2014-1.0

Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20814/2014-1.0

Identificação Cliente: OGM X2

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término: 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20814/2014-1.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20814/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropeno	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metiletilcetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20814/2014-1.0****Amostra: 20814/2014-1.0**

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeteno	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroeteno	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroeteno	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos****Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:****Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**0902221405142998****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20815/2014-1.0



Data Emissão: 22/05/2014

DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20815/2014-1.0

Identificação Cliente: OGM X3

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término: 22/05/2014

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20815/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
1,1,1,2-Tetracloroetano	[630-20-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,1-Tricloroetano	[71-55-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2,2-Tetracloroetano	[79-34-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1,2-Tricloroetano	[79-00-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroetano	[75-34-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloroeteno	[75-35-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,1-Dicloropropeno	[563-58-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2,3-Triclorobenzeno	[87-61-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,3-Tricloropropano	[96-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Triclorobenzeno	[120-82-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2,4-Trimetilbenzeno	[95-63-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dibromo-3-cloropropano	[96-12-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,2-Dibromoetano	[106-93-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloroetano	[107-06-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,2-Dicloropropano	[78-87-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3,5-Triclorobenzeno	[108-70-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3,5-Trimetilbenzeno	[108-67-8]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,3-Diclorobenzeno	[541-73-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
1,3-Dicloropropano	[142-28-9]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
1,4-Diclorobenzeno	[106-46-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
2,2-Dicloropropano	[594-20-7]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
2-Clorotolueno	[95-49-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
4-Clorotolueno	[106-43-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Benzeno	[71-43-2]	ppmv	< LQ	ND	0,06	POP 86003
Bromobenzeno	[108-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromoclorometano	[74-97-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromodiclorometano	[75-27-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Bromofórmio	[75-25-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,2-Dicloroeteno	[156-59-2]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
cis-1,3-Dicloropropeno	[10061-01-5]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Clorobenzeno	[108-90-7]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorodibromometano	[124-48-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Clorofórmio	[67-66-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Estireno	[100-42-5]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Etilbenzeno	[100-41-4]	ppmv	< LQ	ND	0,05	POP 86003
Hexaclorobutadieno	[87-68-3]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Isopropilbenzeno (Cumeno)	[98-82-8]	ppmv	< LQ	ND	0,04	POP 86003
m+p-Xileno	[108-38-3; 106-42-3]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
Metilacetona	[78-93-3]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
n-Butilbenzeno	[104-51-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
n-Propilbenzeno	[103-65-1]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20815/2014-1.0



Amostra: 20815/2014-1.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
o-Xileno	[95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003
p-Isopropiltolueno	[99-87-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Piridina	[110-86-1]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
sec-Butilbenzeno	[135-98-8]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
terc-Butilbenzeno	[98-06-6]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroeto de Carbono	[56-23-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tetracloroetano	[127-18-4]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
Tolueno	[108-88-3]	ppmv	< LQ	ND	0,08	POP 86003
trans-1,2-Dicloroetano	[156-60-5]	mg/m³	< LQ	ND	2	POP 86003
trans-1,3-Dicloropropeno	[10061-02-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Tricloroetano	[79-01-6]	mg/m³	< LQ	ND	10	POP 86003
Xilenos	[1330-20-7][108-38-3][106-42-3][95-47-6]	ppmv	< LQ	ND	0,09	POP 86003

Notas

⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.

⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.

Métodos

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:

Vivian Rafaela Koenig

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:

5303221405143374

Instruções para a verificação de autenticidade de documentos

1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



RECEIVED FOR DEPOSIT

RECEIVED FOR DEPOSIT
IN THE
OFFICE OF THE
TREASURER
OF THE
UNITED STATES



DATE	DESCRIPTION	AMOUNT
1911		
1912		
1913		
1914		
1915		
1916		
1917		
1918		
1919		
1920		
1921		
1922		
1923		
1924		
1925		
1926		
1927		
1928		
1929		
1930		
1931		
1932		
1933		
1934		
1935		
1936		
1937		
1938		
1939		
1940		
1941		
1942		
1943		
1944		
1945		
1946		
1947		
1948		
1949		
1950		
1951		
1952		
1953		
1954		
1955		
1956		
1957		
1958		
1959		
1960		
1961		
1962		
1963		
1964		
1965		
1966		
1967		
1968		
1969		
1970		
1971		
1972		
1973		
1974		
1975		
1976		
1977		
1978		
1979		
1980		
1981		
1982		
1983		
1984		
1985		
1986		
1987		
1988		
1989		
1990		
1991		
1992		
1993		
1994		
1995		
1996		
1997		
1998		
1999		
2000		
2001		
2002		
2003		
2004		
2005		
2006		
2007		
2008		
2009		
2010		
2011		
2012		
2013		
2014		
2015		
2016		
2017		
2018		
2019		
2020		
2021		
2022		
2023		
2024		
2025		
2026		
2027		
2028		
2029		
2030		
2031		
2032		
2033		
2034		
2035		
2036		
2037		
2038		
2039		
2040		
2041		
2042		
2043		
2044		
2045		
2046		
2047		
2048		
2049		
2050		
2051		
2052		
2053		
2054		
2055		
2056		
2057		
2058		
2059		
2060		
2061		
2062		
2063		
2064		
2065		
2066		
2067		
2068		
2069		
2070		
2071		
2072		
2073		
2074		
2075		
2076		
2077		
2078		
2079		
2080		
2081		
2082		
2083		
2084		
2085		
2086		
2087		
2088		
2089		
2090		
2091		
2092		
2093		
2094		
2095		
2096		
2097		
2098		
2099		
2100		

EM BR 100

RECEIVED FOR DEPOSIT

5.7. Relatório de ensaio: perfil quali/quantitativo de compostos orgânicos voláteis (COVs)

Perfil quali/quantitativo de COVs

Condição: Parental crescendo em glicose

Réplicas: 1, 2 e 3



RECEIVED



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20816/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20816/2014-2.0

Identificação Cliente: WT G1

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:**

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20816/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20816/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Etanol	---	%	100	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:



Vivian Rafaela Koenig

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:

1205260905141258

Instruções para a verificação de autenticidade de documentos1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20817/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20817/2014-2.0

Identificação Cliente: WT G2

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:**

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**“Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório.”**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20817/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20817/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Perfil Quali/Quantitativo VOC	---	---	Ausente	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:



Vivian Rafaela Koenig

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:

4208260905142216

Instruções para a verificação de autenticidade de documentos1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20818/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20818/2014-2.0

Identificação Cliente: WT G3

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:**

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20818/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20818/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Perfil Quali/Quantitativo VOC	---	---	Ausente	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:



Vivian Rafaela Koenig

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:

1512260905143504

Instruções para a verificação de autenticidade de documentos1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento

Perfil quali/quantitativo de COVs
Condição: OGM crescendo em glicose
Réplicas: 1, 2 e 3



EM 27



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20819/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20819/2014-2.0

Identificação Cliente: OGM G1

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término:

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20819/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20819/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Etanol	---	%	100	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.
ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:



Vivian Rafaela Koenig

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:

4415260905143446

Instruções para a verificação de autenticidade de documentos1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20820/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20820/2014-2.0

Identificação Cliente: OGM G2

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término:

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20820/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20820/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Etanol	---	%	100	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.
ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:**Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**1919260905145948****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20821/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20821/2014-2.0

Identificação Cliente: OGM G3

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término:

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20821/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20821/2014-2.0

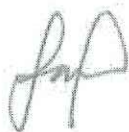
Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Etanol	---	%	100	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:**Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**5222260905147221****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento

Perfil quali/quantitativo de COVs
Condição: OGM crescendo em xilose
Réplicas: 1, 2 e 3



EN FRANCO



TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20813/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - **Cidade:** Campinas - **Bairro:** Technopark - **UF:** SP - **CEP:** 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20813/2014-2.0

Identificação Cliente: OGM X1

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - **Responsável pelo Transporte:** Solicitante

Dt Coleta: - **Dt Recebimento:** 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - **Dt Término:**

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20813/2014-2.0

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20813/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Etanol	---	%	100	---	---	EPA 8260 B

Notas

⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.

⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.
ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.

Métodos

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:

Vivian Rafaela Koenig

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:

0055260805140029

Instruções para a verificação de autenticidade de documentos

1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20814/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20814/2014-2.0

Identificação Cliente: OGM X2

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término:

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20814/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20814/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Etanol	---	%	100	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:**Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**2158260805140186****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento



TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 20815/2014-2.0



DADOS DO CLIENTE

Cliente: BioCelere Agroindustrial Ltda

CNPJ/CPF: 13.808.281/0001-55

Solicitante: Gleidson Silva Teixeira

Endereço: Avenida Pierre Simon de Laplace Bloco A Cond. Unic, 965 - Cidade: Campinas - Bairro: Technopark - UF: SP - CEP: 13.069-320 -

Caixa Postal:

Proposta Comercial Nº: 328/2014

OBJETIVO

Ensaio Laboratoriais Sem Comparativo.

DADOS DA AMOSTRA

Projeto Cliente: ---

Identificação TASQA: 20815/2014-2.0

Identificação Cliente: OGM X3

Estado Físico: Gasosa

Responsável pela Coleta: Solicitante - Responsável pelo Transporte: Solicitante

Dt Coleta: - Dt Recebimento: 08/05/2014 09:50

Análises Regulares

Dt Início: 08/05/2014 - Dt Término:

RESULTADOS:

Encontra(m)-se na(s) Tabela(s) da(s) página(s) seguinte(s) e refere-se exclusivamente à amostra analisada.

**"Este Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido na sua totalidade e sem alterações.
A reprodução parcial requer aprovação escrita do Laboratório."**

TASQA

TASQA Serviços Analíticos Ltda
CNPJ 67.994.897/0001-97
Praça 28 de Fevereiro, 55 – Nova Paulínia
CEP 13140-285 – Paulínia – SP
Fone/Fax: (19) 2138-8888 / (19) 2138-8885
Home Page: <http://www.tasqa.com.br>

RELATÓRIO DE ENSAIO**Nº 20815/2014-2.0**

>>> Os resultados da amostra a seguir não fazem parte do escopo de acreditação deste Laboratório <<<

Amostra: 20815/2014-2.0

Parâmetro	[CAS]	Unidade	Resultados ⁽³⁾	Incerteza Expandida ⁽²⁾	LQ ⁽¹⁾	Método
Perfil Quali/Quantitativo VOC	---	---	Ausente	---	---	EPA 8260 B

Notas⁽¹⁾ LQ = Limite de Quantificação.⁽²⁾ A incerteza expandida (U) relatada é baseada na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência k=2, para um nível de confiança de 95%.

ND = Incerteza não determinada / NA = Incerteza não se aplica.

⁽³⁾ A forma de expressão dos resultados pode contemplar também: NA = Não Avaliado / ND = Não Detectado.**Métodos**

✓ EPA = Environmental Protection Agency.

Resultado conferido e aprovado eletronicamente por:**Vivian Rafaela Koenig**

Supervisora
Lab. Orgânica
CRQ 04449813 - 4ª Região

Código para verificação de autenticidade deste documento:**4301260905140378****Instruções para a verificação de autenticidade de documentos**1º - Acesse a página <http://www.tasqa.com.br/conteudo/autenticidade>

2º - Digite o código de autenticidade do documento e clique em pesquisar

3º - Clique em Abrir Documento

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. James, S. a, Cai, J., Roberts, I. N. & Collins, M. D. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 453–60 (1997).
2. Kurtzman, C. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Res.* **4**, 233–245 (2003).
3. Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science.* **274**, 546–567 (1996).
4. Botstein, D. & Fink, G. R. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**, 695–704 (2011).
5. Donalies, U., Nguyen, H., Stahl, U. & Nevoigt, E. *Improvement of Saccharomyces yeast strains used in brewing, wine making and baking.* *Food Biotechnol.* 255 (Springer, 2008).
6. Sicard, D. & Legras, J.-L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C. R. Biol.* **334**, 229–36 (2011).
7. Vilanova, M. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on general composition and sensorial properties of white wines made from *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Food Technol. Biotechnol.* **43**, 79–83 (2005).
8. Mortimer, R. & Polsinelli, M. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* **150**, 199–204 (1999).
9. Murphy, H. a, Kuehne, H. a, Francis, C. a & Sniegowski, P. D. Mate choice assays and mating propensity differences in natural yeast populations. *Biol. Lett.* **2**, 553–6 (2006).
10. Tofalo, R. *et al.* Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Front. Microbiol.* **4**, 166 (2013).
11. Schuller, D., Alves, H., Dequin, S. & Casal, M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**, 167–77 (2005).
12. Stefanini, I. *et al.* Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13398–403 (2012).
13. Basso, L. C., de Amorim, H. V, de Oliveira, A. J. & Lopes, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1155–63 (2008).
14. Neiman, A. M. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **189**, 737–65 (2011).
15. Boram, W. R. & Roman, H. Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: a DNA repair mutation associated with elevated mitotic gene conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2828–32 (1976).
16. Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. & Rothstein, R. J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 6354–8 (1981).

17. Prado, F., Cortés-Ledesma, F., Huertas, P. & Aguilera, A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **42**, 185–98 (2003).
18. Aylon, Y. & Liefshitz, B. Molecular dissection of mitotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1403–1417 (2003).
19. Cheng, T. H., Chang, C. R., Joy, P., Yablok, S. & Gartenberg, M. R. Controlling gene expression in yeast by inducible site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* **28**, E108 (2000).
20. Ghosh, K. & Van Duyne, G. D. Cre-loxP biochemistry. *Methods* **28**, 374–83 (2002).
21. Witten, I., Steinberg, E. & Lee, S. Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* **72**, 721–733 (2011).
22. Nagy, a. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**, 99–109 (2000).
23. Hampel, S., Chung, P., McKellar, C. & Hall, D. Drosophila Brainbow: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nature* **8**, 253–259 (2011).
24. Nern, A., Pfeiffer, B. D., Svoboda, K. & Rubin, G. M. Multiple new site-specific recombinases for use in manipulating animal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14198–203 (2011).
25. Gibson, D. G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods Enzymol.* **498**, 349–61 (2011).
26. Träff-Bjerre, K. L., Jeppsson, M., Hahn-Hägerdal, B. & Gorwa-Grauslund, M.-F. Endogenous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**, 141–50 (2004).
27. Zhou, H., Cheng, J.-S., Wang, B. L., Fink, G. R. & Stephanopoulos, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **14**, 611–22 (2012).
28. Kim, S. R., Ha, S.-J., Kong, I. I. & Jin, Y.-S. High expression of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **14**, 336–43 (2012).
29. Kim, S. R. *et al.* Rational and Evolutionary Engineering Approaches Uncover a Small Set of Genetic Changes Efficient for Rapid Xylose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**, e57048 (2013).
30. Kim, S. R., Park, Y.-C., Jin, Y.-S. & Seo, J.-H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol. Adv.* **31**, 851–61 (2013).
31. Kuyper, M. *et al.* High level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Res.* **4**, 69–78 (2003).
32. Sikorski, R. & Hieter, P. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* (1989).

- 
33. Guerra, O. G. *et al.* A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *J. Microbiol. Methods* **67**, 437–45 (2006).
 34. Kim, J., Vanguri, S. & Boeke, J. Transposable Elements and Genome Organization: A Comprehensive Survey of Retrotransposons Revealed by the Complete *Saccharomyces* Genome Sequence. *Genome Res.* **8**, 464–478 (1998).
 35. Cheng, Z. & Menees, T. M. RNA branching and debranching in the yeast retrovirus-like element Ty1. *Science* **303**, 240–243 (2004).
 36. Perlman, P. S. & Boeke, J. D. Molecular biology. Ring around the retroelement. *Science* **303**, 182–4 (2004).
 37. Lesage, P. & Todeschini, a L. Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts. *Cytogenet. Genome Res.* **110**, 70–90 (2005).
 38. Buermans, H. P. J. & den Dunnen, J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim. Biophys. Acta* In Press (2014).
 39. Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A. & Zhang, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics* **38**, 95–109 (2011).
 40. Pareek, C. S., Smoczynski, R. & Tretyn, A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genet.* **52**, 413–35 (2011).
 41. Van Maris, A. J. A. *et al.* Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **108**, 179–204 (2007).
 42. Bhosale, S., Rao, M. & Deshpande, V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* **60**, 280–300 (1996).
 43. Vieille, C. & Hess, J. xylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1867–1875 (1995).
 44. Chang, C., Park, B., Lee, D. & Suh, S. structures of thermostable xylose isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: possible structural determinants of thermostability. *J. Mol. Biol.* **288**, 623–634 (1999).
 45. Meilleur, F., Snell, E. H., van der Woerd, M. J., Judge, R. A. & Myles, D. A. A. A quasi-Laue neutron crystallographic study of D-xylose isomerase. *Eur. Biophys. J.* **35**, 601–609 (2006).
 46. Madhavan, A. *et al.* Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 1067–78 (2009).
 47. Sanchez, S. & Smiley, K. Properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. *Appl. Microbiol.* **29**, 745–750 (1975).
 48. Callens, M., Kersters-Hilderson, H., Van Opstal, O. & De Bruyne, C. K. Catalytic properties of d-xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 696–700 (1986).
 49. Lehmacher, A. & Bisswanger, H. Isolation and characterization of an extremely thermostable D-xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB 8. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 679–686 (1990).

50. Kawai, Y. & HoRiTsU, H. Purification and Characterization of D-Xylose Isomerase from *Bifidobacterium ado.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1994 (1994).
51. Chandrakant, P. & Bisaria, V. Application of a compatible xylose isomerase in simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 32–39 (2000).
52. Brat, D., Boles, E. & Wiedemann, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2304–2311 (2009).
53. Lönn, A., Gárdonyi, M., van Zyl, W., Hahn-Hägerdal, B. & Otero, R. C. Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **269**, 157–163 (2002).
54. Sriprapundh, D., Vieille, C. & Zeikus, J. Directed evolution of *Thermotoga neapolitana* xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. *Protein Eng.* **16**, 683–690 (2003).
55. Lee, S., Jellison, T. & Alper, H. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5708–5716 (2012).
56. Sarthy, A. V. *et al.* Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1996–2000 (1987).
57. Moes, C. J., Pretorius, I. S. & van Zyl, W. H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (xylA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **18**, 269–274 (1996).
58. Amore, R., Wilhelm, M. & Hollenberg, C. The fermentation of xylose—an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 351–357 (1989).
59. Walfridsson, M. & Bao, X. fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4648–4651 (1996).
60. Kuyper, M. *et al.* Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* **5**, 925–34 (2005).
61. Brat, D., Boles, E. & Wiedemann, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2304–11 (2009).
62. Chu, B. & Lee, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol. Adv.* **25**, 425–441 (2007).
63. Vleet, J. Van & Jeffries, T. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 300–306 (2009). doi:10.1016/j.copbio.2009.06.001
64. Dudley, A. M., Janse, D. M., Tanay, A., Shamir, R. & Church, G. M. A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol. Syst. Biol.* **1**, 2005.0001 (2005).
65. He, X. & Zhang, J. Toward a molecular understanding of pleiotropy. *Genetics* **173**, 1885–91 (2006).
66. Stearns, F. W. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. *Genetics* **186**, 767–73 (2010).
67. Zheng, J. *et al.* Epistatic relationships reveal the functional organization of yeast transcription factors. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 420 (2010).

- 
68. Knight, C. G. *et al.* Unraveling adaptive evolution: how a single point mutation affects the protein coregulation network. *Nat. Genet.* **38**, 1015–22 (2006).
 69. Granek, J. a, Kayıkçı, Ö. & Magwene, P. M. Pleiotropic signaling pathways orchestrate yeast development. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 676–81 (2011).
 70. Snitkin, E. S. & Segre, D. Epistatic Interaction Maps Relative to Multiple Metabolic Phenotypes. *Plos Genet.* **7**, e10001294 (2011).
 71. Segrè, D., Deluna, A., Church, G. M. & Kishony, R. Modular epistasis in yeast metabolism. *Nat. Genet.* **37**, 77–83 (2005).
 72. Verstrepen, K. J. *et al.* Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends Biotechnol.* **22**, 531–7 (2004).
 73. Puligundla, P., Smogrovicova, D., Obulam, V. S. R. & Ko, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1133–44 (2011).
 74. Zhang, H. *et al.* Gene copy number variation (CNV) in haploid and diploid strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* (2013).
 75. Argueso, J. & Carazzolle, M. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res.* **19**, 2258–2270 (2009).
 76. Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A. & Guillamón, J. M. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7148–55 (2006).
 77. Makino, H., Fujimoto, J. & Watanabe, K. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **140**, 76–83 (2010).
 78. Otterstedt, K. *et al.* Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* **5**, 532–7 (2004).
 79. Scalcinati, G. *et al.* Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption. *FEMS Yeast Res.* **12**, 582–97 (2012).
 80. Liu, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 809–25 (2011).
 81. Canilha, L. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 989572 (2012).
 82. Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K. & Dalai, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**, 578–597 (2010).
 83. Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. & Gorwa-Grauslund, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 937–53 (2007).
 84. Cai, Z., Zhang, B. & Li, Y. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: reflections and perspectives. *Biotechnol. J.* **7**, 34–46 (2012).
 85. Lange, J. Lignocellulose conversion : an introduction to chemistry ,. *biofuels bioprod bioref* **1**, 39–48 (2007).
 86. Mitchell, A. & Herskowitz, I. Activation of meiosis and sporulation by repression of the RME1 product in yeast. *Nature* **319**, 738–742 (1986).

87. Chu, S. *et al.* The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699–705 (1998).
88. Kassir, Y., Adir, N. & Boger-Nadjar, E. Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int. Rev. Cytol.* **224**, 111–171 (2003).
89. Coluccio, A. E., Rodriguez, R. K., Kernan, M. J. & Neiman, A. M. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. *PLoS One* **3**, e2873 (2008).
90. Calahan, D., Dunham, M., DeSevo, C. & Koshland, D. E. Genetic analysis of desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **189**, 507–19 (2011).
91. Billi, D. & Potts, M. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* **153**, 7–12 (2002).
92. Chakrabortee, S. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18073–18078 (2007).
93. França, M., Panek, A. & Eleutherio, E. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* **10**, 167–170 (2005).
94. Herrero, E., Ros, J., G., B. & Cabisco, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1217–1235 (2008).
95. Hohmann, S. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **583**, 4025–4029 (2009).
96. Verghese, J. & Abrams, J. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 115–158 (2012).
97. Crowe, J. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 579–599 (1992).
98. Tunnacliffe, A. & Wise, M. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**, 791–812 (2007).
99. Evangelista, J. *Tecnologia de alimentos*. (Atheneu, 2003).
100. Taxis, C. & Knop, M. System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechniques* **40**, 73–78 (2006).
101. Kanda, K. *et al.* Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts. *J. Biotechnol.* **182–183**, 68–73 (2014).
102. Benjaphokee, S. *et al.* Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *N. Biotechnol.* **29**, 379–86 (2012).
103. Auesukaree, C. *et al.* Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Genet.* **50**, 301–10 (2009).
104. Jarolim, S. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in survival of heat shock. *Gene, Genomes, Genet.* **3**, 2321–33 (2013).
105. Chapman, P. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 7–15 (2002).
106. Boudou, A. & Ribeyre, F. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ. Health Perspect.* **105**, 21–35 (1997).

- 
107. Krull, M. & Barros, F. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* **7**, 2012 (2012).
 108. Zar, J. *Biostatistical analysis*. 1999 (Prentice-Hall, 1999).
 109. Foster, J. a, Bunge, J., Gilbert, J. a & Moore, J. H. Measuring the microbiome: perspectives on advances in DNA-based techniques for exploring microbial life. *Brief. Bioinform.* **13**, 420–9 (2012).
 110. Thomas, T., Gilbert, J. & Meyer, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* **2**, 3 (2012).
 111. Cheng, L., Fu, L., Angle, R. P. & Sandhu, H. S. Seasonal variations of volatile organic compounds in edmonton, Alberta. *Atmos. Environ.* **31**, 239–246 (1997).
 112. Goldstein, A. & Galbally, I. Known and unexplored organic constituents in the earth's atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 1515–1521 (2007).
 113. Korpi, A., Järnberg, J. & Pasanen, A.-L. Microbial volatile organic compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **39**, 139–93 (2009).
 114. Wilkins, C. & Larsen, K. of volatile (micro) biological compounds from household waste and building materials by thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectroscopy. *J. High Resolut. Chromatogr.* **18**, 373–377 (1995).
 115. Ljungdahl, P. O. & Daignan-Fornier, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**, 885–929 (2012).
 116. Chen, Y. *et al.* Development of *Saccharomyces cerevisiae* Producing Higher Levels of Sulfur Dioxide and Glutathione to Improve Beer Flavor Stability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 402–413 (2011).
 117. Divol, B., du Toit, M. & Duckitt, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 601–13 (2012).
 118. Tortora, G., Funke, B. & Case, C. *Microbiology: an introduction*. 960 (Benjamin Cummings, 2012).
 119. Park, H.-S. & Yu, J.-H. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 669–77 (2012).
 120. Macphail, M., Carpenter, R. J., Iglesias, A. & Wilf, P. First evidence for Wollemi Pine-type pollen (Dilwynites: Araucariaceae) in South America. *PLoS One* **8**, e69281 (2013).
 121. Basso, L., Basso, T. & Rocha, S. in *Biofuel Prod. - Recent Dev. Prospect.* **1530**, 85–100 (2011).
 122. Gietz, R. & Woods, R. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**, 816–831 (2001).
 123. Gietz, R. & Schiestl, R. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2**, 31–35 (2007).
 124. Bimboim, H. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
 125. Lee, C., Lee, S., Shin, S. G. & Hwang, S. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 371–6 (2008).

126. Schloss, P. D. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–41 (2009).
127. Li, W., Fu, L., Niu, B., Wu, S. & Wooley, J. Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief. Bioinform.* **13**, 656–68 (2012).
128. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590–6 (2013).
129. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
130. Zerbino, D. R. & Birney, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* **18**, 821–9 (2008).
131. Ausubel, F. M. *et al.* *Current protocols for molecular biology*. Peking Union Med. Coll. Press, Beijing 1998 (John Wiley & Sons, 1999).

Proposta de Liberação Comercial

Saccharomyces cerevisiae
Linhagem Celere-2L



UNIDADE IV

Plano de Monitoramento
Considerações Finais

Proposta de Liberação Comercial

Entreposto de Comércio Exterior

Unidade 12

Unidade 12

Unidade 12

EM EXAME

Unidade 12

PLANO DE MONITORAMENTO



Observando o disposto no Art. 3 da Resolução Normativa Nº 9 da CTNBio, a empresa BioCelere Agroindustrial Ltda. irá submeter o plano de monitoramento pós-liberação comercial, ou solicitar sua isenção, no prazo de 30 (trinta) dias, contados a partir da publicação do deferimento do pedido de liberação comercial da linhagem Celere-2L, considerando a avaliação de risco da CTNBio e o parecer contido na sua decisão técnica.

RECEIVED

Termo de Confidencialidade

As páginas 185 a 219 foram retiradas do Processo por conterem informações confidenciais.

Responsável



Robério Tomás Cirqueira

Data: 17 de Setembro de 2014

Termo de Confidencialidade

As páginas 185 a 219 foram retiradas do Processo por conterem informações confidenciais.

Responsável


Robério Tomás Cirqueira

Data: 17 de Setembro de 2014