RELATÓRIO DE BIOSSEGURANÇA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* LINHAGEM RN1016

15 de março de 2013

Rod. Anhanguera, km 104,5. Cond. Unic, bloco A. Techno Park. CEP: 13016-330 – Campinas – SP
_Tel 55 (11) 2739 0500 _Fax 55 (11) 2739 0510

I - Requerimento de Liberação Comercial

O Representante Legal e o Presidente da CIBio da BioCelere Agroindustrial Ltda. e vem por meio desta solicitar junto a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança a análise e emissão de parecer técnico para o Relatório de Biossegurança da linhagem RN1016 de Levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol.

O organismo a ser liberado comercialmente é uma levedura da espécie *S. cerevisiae* geneticamente modificada com a introdução do gene codificador da xilose isomerase (*XylA*), oriundo do fungo não patogênico *Piromyces* sp., aumento da expressão dos genes naturais de levedura *XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1* e deleção do gene *GRE3.*

Solicita-se a liberação para as finalidades de transporte, comercialização, produção industrial de etanol, descarte e quaisquer outras atividades relacionadas ao propósito desse OGM e progênies dele derivadas.

São Paulo, 15 de Março de 2013

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Representante Legal

Manoel Carnaúba
Representante Legal

Celso S. Fiori
Presidente da CIBio

II – Parecer Técnico da CIBio sobre a proposta

A levedura *Saccharomyces cerevisae* Linhagem RN1016, objeto deste pleito, é um organismo geneticamente modificado através da introdução por recombinação homóloga do gene *XylA* codificador da enzima xilose isomerase. Esta enzima garante à levedura a capacidade de fermentar a xilose, açúcar de 5 carbonos, capacitando-a de produzir etanol utilizando biomassa processada como fonte de carbono. Outras modificações produziram o aumento da expressão de genes endógenos da levedura, bem como a deleção de um gene, sem introdução de sequências de DNA exógenas, com a finalidade de aumentar a eficiência do processo fermentativo.

Leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas a 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 e verduras certamente faz com que toda a população mundial tenha contato frequente e direto com este microrganismo.

S. cerevisiae é a espécie de organismo eucarioto mais conhecida e estudada no mundo, sendo um importante modelo de estudo celular, alvo do primeiro programa de sequenciamento genético. Por este e outros motivos diversas Agências Reguladoras em todo o mundo isentam este organismo de restrições regulatórias. A agência *Food and Drug Administration* (FDA-USA), por exemplo, inclui a *S. cerevisiae* no grupo conhecido pela sigla "GRAS": *Generally Recognized as Safe*, devido às características mencionadas.

Com relação ao presente pleito, a utilização desta levedura se dará exclusivamente em sistemas fechados de fermentação, tendo como únicos subprodutos a lignina obtida da filtragem do hidrolisado fermentado, que é totalmente queimada no interior da indústria, e a vinhaça destilada tipicamente obtida do processo de produção de etanol, que é submetida a um tratamento com luz ultravioleta para garantir a esterilização, e pode ainda

passar por um processo de cozimento para concentração, conforme a conveniência.

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 parte do processo industrial de produção de etanol celulósico. Como mencionado, anteriormente, essa vinhaça ainda é submetida a tratamento com luz ultra-violeta, de modo a garantir a esterilização deste subproduto.

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) impacto na biodiversidade e organismos indicadores do solo e água;

(3) impacto nas características físico-químicas da água e do solo;

(4) impacto na micro biodiversidade da água e do solo;

(5) tolerância a agentes esterilizantes físicos e químicos e;

(6) potencial alergênico.

A linhagem RN1016 **não apresenta esporulação**, devido a sua constituição genética tipo MATa/MATa, e portanto não possui capacidade de persistir por períodos prolongados no solo ou quaisquer outras matrizes ambientais, e não resiste a dessecação, conforme demonstração experimental. A ausência de esporulação também limita o cruzamento de RN1016 com outras leveduras, restringindo sua reprodução ao ciclo vegetativo (não sexual).

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, onde direciona-se o inserto especificamente para o local desejado 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 RN1016 teve desempenho inferior à linhagens convencionais brasileiras em experimentos de competição em diferentes meios de cultura, se mostrando equivalente ou discretamente inferior a seu correspondente convencional. A modificação genética incluída na linhagem RN1016 não alterou características de adaptabilidade e resistência.

Nos experimentos de ecotoxicidade aguda, em concentrações elevadas de 25 até 200 mg/L de células puras, as leveduras da linhagem RN1016, bem como dos respectivos controles não-GM parental e comercial, não provocaram mortalidade em organismos indicadores de água (peixes e *Daphnia*). Da mesma forma, os testes em solo com concentrações de 400 mg/Kg de células puras não demonstraram qualquer toxicidade para espécies indicadoras de solo (minhocas). Os experimentos que avaliaram o comportamento de fuga (*Avoidance behaviour*) não identificaram qualquer indicação de *"evitação"* por parte das minhocas aos tratamentos (leveduras) em comparação ao controle positivo (ácido bórico).

A aplicação de vinhaça não filtrada produzida por fermentação com a linhagem RN1016 não causou alterações nas propriedades físicas, químicas e diversidade microbiana de solo de canavial quando comparada a seu equivalente convencional (parental), bem como à leveduras comerciais brasileiras. Através de uma análise completa de metagenômica do solo, este experimento demonstrou a equivalência em termos de biossegurança da aplicação em solo de resíduo (vinhaça) da indústria de etanol celulósico, utilizando-se a levedura RN1016, ao que atualmente se aplica pela indústria brasileira de etanol. Este estudo apresenta dados inéditos da avaliação do efeito da vinhaça tipicamente aplicada no solo de canaviais sobre a microbiota nativa, e faz a comparação com o efeito da vinhaça produzida pela levedura RN1016.

A avaliação da sobrevivência e potencial impacto de leveduras viáveis da Linhagem RN1016 em amostras naturais de solo e água demonstraram que esta linhagem não apresenta sobrevivência e dispersão, bem como não interfere na microbiota nativa de ambas as matrizes naturais, mostrando-se equivalente à linhagem selvagem.

Ainda, a levedura RN1016 se mostrou igualmente sensível a diferentes agentes esterilizantes e sanitizantes quando comparado a seu equivalente convencional e a uma linhagem comercial de levedura.

Os experimentos de avaliação da biossegurança da Linhagem RN1016 foram conduzidos sob responsabilidade e supervisão da Empresa BioCelere Agroindustrial Ltda. através de prestação de serviços por Laboratórios especializados e idôneos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por Empresas dedicadas como o Laboratório Tecam Ambiental e o Laboratório Athenas Agrícola, pela *High Throughput Sequencing Facility* (HTSF) da Universidade da Carolina do Norte (*Chapel Hill, North Carolina, USA*) e também pela Empresa holandesa DSM N.V. in Heerlen.

Por fim, o desenvolvimento e obtenção das linhagens de levedura GM que deram origem à RN1016 encontra-se publicado na literatura cientifica em periódicos *peer review* de circulação internacional especificamente citados neste documento e disponíveis ao público.

A Comissão Interna de Biossegurança da BioCelere Agroindustrial Ltda., tendo analisado o Relatório de Biosegurança da levedura RN1016 considera que a utilização industrial desta levedura não é potencial causadora de efeitos adversos a saúde humana, animal e ao meio ambiente, e portanto recomenda o deferimento do pleito com base nos diversos resultados experimentais apresentados e na vasta quantidade de informações disponíveis na literatura.

São Paulo, 15 de Março de 2013

Celso S. Fiori
Presidente da CIBio

III – Declaração de veracidade das informações fornecidas

Eu, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Representante Legal da BioCelere Agroindustrial Ltda. declaro que, no limite do meu conhecimento, todas os resultados aqui apesentados foram obtidos obedecendo todos os critérios de rigor científico, e as informações aqui apresentadas são completas, acuradas e verdadeiras.

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Representante Legal

Manoel Carnaúba
Representante Legal

IV - Índice de Conteúdo

I - Requerimento de Liberação Comercial..... 3

II – Parecer Técnico da CIBio sobre a proposta..... 5

III – Declaração de veracidade das informações fornecidas..... 9

IV – Índice de conteúdo..... 11

V – Lista de tabelas..... 19

VI – Lista de figuras..... 25

VII – Resumo Executivo..... 31

VIII – Plano de monitoramento pós-liberação comercial..... 37

1. Monitoramento Pós-liberação comercial – *Saccharomyces cerevisiae* Linhagem RN1016..... 37

IX – Informações relativas ao OGM..... 41

1. A identificação do evento de transformação genética, objetivo e utilização do OGM e seus derivados..... 41

1.1 Identificação do evento de transformação genética..... 41

1.2. A biologia e biossegurança de *Saccharomyces cerevisiae*..... 42

1.2.1. Aplicações de *S. cerevisiae*..... 42

1.3. A produção e mercado de etanol..... 45

1.3.1. Etanol no Brasil..... 45

1.3.2. Etanol celulósico (Segunda Geração)..... 48

1.3.3. Tendências do mercado mundial de etanol..... 51

1.3.4. Cenário atual do mercado de etanol no Brasil..... 52

1.4. Objetivo e utilização do OGM e seus derivados..... 56

1.4.1. Desvitalização da Levedura RN1016 durante o processo de produção de etanol celulósico..... 58

1.4.1.1. Avaliação da temperatura na viabilidade celular da Levedura RN1016. (Experimento 1 – IB/UNICAMP)..... 58

1.4.1.1.1. Material e Métodos..... 59

1.4.1.1.2. Resultados..... 60

1.4.1.2. Avaliação da temperatura na viabilidade celular da Levedura RN1016..... 65

1.4.1.2.1. Material e Métodos..... 65

1.4.1.2.2. Resultados..... 67

1.4.1.2.3. Conclusões finais..... 68

2. A classificação taxonômica do organismo a ser liberado..... 70

3. O gene introduzido, organismo de origem e sua função específica..... 71

3.1. A xilose isomerase..... 71

3.2. O organismo de origem: *Piromyces* sp..... 79

3.3. Outras modificações genéticas..... 82

4. Vetor utilizado..... 89

5. O mapa genético utilizado no processo de transformação (transgene/vetor), indicando as regiões que especificam função..... 90

6. O resumo das construções para obtenção do OGM..... 91

7. A classificação de risco do organismo geneticamente modificado de acordo com a Resolução Normativa n.º 2, de 27 de novembro de 2006..... 96

7.1. *Saccharomyces cerevisiae* – Organismo receptor..... 96

8. Os métodos utilizados para a modificação genética..... 97

8.1 Os elementos Ty..... 98

9. A caracterização molecular do inserto no organismo receptor..... 101

9.1. Introdução..... 101

9.2. Materiais e Métodos..... 103

9.2.1. Quantificação do número de cópias do gene *xilose isomerase* na linhagem RN1016..... 103

9.2.2. Localização do gene *xilose isomerase* no genoma da linhagem RN1016 103

9.3. Resultados e discussão..... 104

9.3.1. Número de cópias e localização no genoma..... 104

9.3.2. Sequências flanqueadoras do gene..... 109

9.4. Sequência nucleotídica do transgene inserido no OGM e respectivos elementos reguladores..... 110

10. O produto da expressão do gene inserido no organismo receptor, descrito em detalhes..... 111

11. As técnicas de detecção gerais e específicas do OGM, apresentando metodologia pertinente..... 117

11.1. Métodos moleculares..... 117

11.2. Métodos biológicos..... 118

11.3. Métodos bioquímicos..... 118

12. O padrão de herança genética do gene inserido..... 119

13. A descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos do gene inserido, quando observados..... 121

13.1. Introdução..... 121

13.2. Materiais e métodos..... 122

13.3. Resultados e discussão..... 123

13.4. Conclusão..... 126

14. O grau de estabilidade genotípica, especificando a metodologia utilizada e o número de gerações avaliadas..... 127

14.1. Estabilidade genotípica da Linhagem RN1016..... 127

14.1.1. Estabilidade genotípica de RN1016 – Avaliação Molecular..... 128

14.1.2. Estabilidade genotípica de RN1016 – Avaliação Bioquímica..... 131

14.2. Conclusões..... 133

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..... 135

16. As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos..... 137

16.1. Ensaios de Competição..... 138

16.1.1. Introdução..... 138

16.1.2. Materiais e Métodos..... 139

16.1.3. Resultados..... 141

16.1.4. Conclusão..... 144

X – Avaliação de Risco a saúde humana e animal..... 147

1. Avaliação do potencial alergênico da levedura RN1016..... 149

1.1. Materiais e métodos..... 151

1.2. Resultados e discussão..... 152

1.3. Conclusão..... 154

XI – Avaliação de risco ao meio ambiente..... 157

1. Sobre a possibilidade de o OGM produzir esporos e ser resistente ao dessecamento..... 157

1.1. Introdução..... 157

1.2. Materiais e Métodos..... 160

1.3. Resultados..... 161

1.4. Conclusão..... 163

2. Os agentes esterilizantes e antimicrobianos que possuem atividade contra o OGM e sua capacidade mutagênica para o OGM..... 164

2.1. Introdução..... 164

2.2. Materiais e Métodos..... 164

2.3. Resultados..... 166

3. Os possíveis efeitos do OGM sobre a qualidade da água, do ar e do solo.... 171

3.1. Ecotoxicologia Terrestre..... 171

3.1.1. Ecotoxicidade aguda: Avaliação da ecotoxicidade aguda da linhagem RN1016 de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) ao organismo indicador de solo *Eudrilus eugeniae*..... 173

3.1.1.1. Material e Métodos..... 173

3.1.1.2. Resultados e Conclusão..... 176

3.1.2. Avaliação do comportamento de fuga do organismo indicador *Eudrilus eugeniae* em solo contendo linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*..... 182

3.1.2.1. Material e Métodos..... 182

3.1.2.2. Resultados e Conclusão..... 185

3.2. Ecotoxicologia Aquática..... 189

3.2.1. Avaliação da ecotoxicidade aguda da Linhagem RN1016 de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) ao organismo indicador aquático *Daphnia similis.* 189

3.2.1.1. Material e Métodos..... 190

3.2.1.2. Resultados e conclusão..... 192

3.2.2. Avaliação da ecotoxicidade aguda da Linhagem RN1016 de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) ao organismo indicador aquático *Danio rerio*..... 196

3.2.2.1. Material e Métodos..... 197

3.2.2.2. Resultados e conclusão..... 198

3.3. Avaliação do Impacto da Levedura RN1016 na microbiota aquática de fontes naturais..... 202

3.3.1. Materiais e Métodos..... 202

3.3.2. Resultados e Conclusão..... 205

3.4. Conclusões finais..... 209

4. A sobrevivência e a dispersão do OGM na água, no ar e no solo..... 210

4.1. Sobrevivência da Levedura RN1016 no Solo..... 210

4.1.1. Introdução..... 210

4.1.2. Materiais e Métodos..... 212

4.1.3. Resultados e Discussão..... 213

4.1.4. Conclusão..... 216

4.2. Sobrevivência e dispersão da Levedura RN1016 na água e no solo em diferentes condições de temperatura e competição com flora nativa..... 217

4.2.1. Material e Métodos..... 218

4.2.2. Resultados..... 219

5. Avaliação do Impacto de vinhaça e resíduos celulares de RN1016 na propriedades químicas, físicas e biológicas do solo..... 225

5.1. Material e Métodos..... 225

5.2. Resultados e conclusão..... 229

5.2.1. Avaliação do impacto da vinhaça e células da Levedura RN1016 nas propriedades químicas do solo..... 229

5.2.2. Avaliação do impacto da vinhaça e células da Levedura RN1016 nas propriedades físicas do solo..... 251

5.2.3. Avaliação do impacto da vinhaça e resíduos celulares de RN1016 na comunidade microbiana do solo..... 255

5.2.3.1. Introdução..... 255

5.2.3.2. Materiais e métodos..... 257

5.2.3.3. Resultados e discussão..... 259

5.2.3.3.1. Avaliação sobre a comunidade bacteriana..... 260

5.2.3.3.2. Avaliação sobre a comunidade fúngica..... 267

5.2.3.4. Conclusões..... 273

XII. Considerações finais..... 275

XIII. Referências bibliográficas..... 277

V - Lista de Tabelas

Tabela 1. Ensaios realizados para determinar o efeito da temperatura nas linhagens RN1016, CEN.PK e PE-2..... 60

Tabela 2. Efeito da temperatura no número de células por mililitro..... 61

Tabela 3. Relação de tratamentos térmicos, tempo de incubação, tempos de coleta e pH do meio de cultivo..... 67

Tabela 4. Atividade específica e máxima taxa de crescimento para XI clonadas em *Saccharomyces cerevisiae*..... 77

Tabela 5. Lista das modificações genéticas empregadas na linhagem RN1016 sem introdução de sequências exógenas. 82

Tabela 6. Iniciadores utilizados para construção do cassete de expressão do gene *XKS1*..... 84

Tabela 7. Iniciadores utilizados para construção do cassete de expressão do gene *XylA*..... 92

Tabela 8. Iniciadores utilizados na técnica de qPCR para determinar o número de cópias da *Xilose isomerase* da levedura RN1016..... 103

Tabela 9. Componentes de reação de PCR padrão..... 117

Tabela 10. Sequência de iniciadores sugeridos para detecção do gene *XylA* na linhagem RN1016..... 117

Tabela 11. Quantidade de cultura utilizada como inóculo nos ensaios de competição..... 140

Tabela 12. Contagem do número de colônias presentes na mistura inicial de linhagens utilizada como inóculo nos ensaios de competição..... 142

Tabela 13. Peso médio das minhocas, média total e desvio padrão..... 177

Tabela 14. Resumo dos dados e Análise de Variância (ANOVA) do peso das minhocas no Tempo 0..... 178

Tabela 15. Resumo dos dados e Análise de Variância (ANOVA) do peso das minhocas no Tempo 7 dias..... 179

Tabela 16. Resumo dos dados e Análise de Variância (ANOVA) do peso das minhocas no Tempo 14 dias..... 180

Tabela 17. Avaliações do comportamento de fuga das minhocas aos tratamentos utilizados..... 187

Tabela 18. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem R1016 de levedura..... 193

Tabela 19. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle parental não GM (CEN.PK)..... 193

Tabela 20. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle comercial Pedra 2..... 194

Tabela 21. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem RN1016..... 194

Tabela 22. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem controle CEN.PK..... 194

Tabela 23. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem comercial Pedra 2..... 195

Tabela 24. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem RN1016..... 199

Tabela 25. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle comercial Pedra 2..... 200

Tabela 26. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle comercial Pedra 2..... 200

Tabela 27. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem RN1016..... 201

Tabela 28. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem controle CEN.PK..... 201

Tabela 29. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem comercial Pedra 2..... 201

Tabela 30. Resumo das análises microbiológicas realizadas com as amostras de água contendo a levedura RN1016 e controles..... 204

Tabela 31. Resultados das leituras de UFCs dos microrganismos em sistema PCA..... 207

Tabela 32. Valor da densidade ótica usada como base para o cálculo do volume de cultura adicionado nas amostras de solo autoclavado..... 213

Tabela 33. Número médio de colônias de leveduras no solo ao longo do tempo..... 214

Tabela 34. Planejamento experimental..... 218

Tabela 35. Tempos de coleta..... 219

Tabela 36. Resultados da análise química (Macronutrientes) para os diferentes tratamentos e repetições..... 230

Tabela 37. Resultados da análise química (Micronutrientes) para os diferentes tratamentos e repetições..... 231

Tabela 38. Análise de Variância conjunta para o analito **Enxofre** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 234

Tabela 39. Análise de Variância para o analito **Enxofre** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta..... 234

Tabela 40. Análise de Variância para o analito **Enxofre** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta..... 235

Tabela 41. Análise de Variância para o analito **Enxofre** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta..... 235

Tabela 42. Análise de Variância conjunta para o analito **Cálcio** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 236

Tabela 43. Análise de Variância para o analito **Cálcio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta..... 236

Tabela 44. Análise de Variância para o analito **Cálcio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta..... 237

Tabela 45. Análise de Variância para o analito **Cálcio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta..... 237

Tabela 46. Análise de Variância conjunta para o analito **Magnésio** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 238

Tabela 47. Análise de Variância para o analito **Magnésio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta..... 238

Tabela 48. Análise de Variância para o analito **Magnésio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta..... 239

Tabela 49. Análise de Variância para o analito **Magnésio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta..... 239

Tabela 50. Análise de Variância conjunta para o analito **Potássio** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 240

Tabela 51. Análise de Variância para o analito **Potássio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta..... 240

Tabela 52. Análise de Variância para o analito **Potássio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta..... 241

Tabela 53. Análise de Variância para o analito **Potássio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta..... 241

Tabela 54. Análise de Variância conjunta para o analito **Fósforo** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2)..... 242
Tabela 55. Análise de Variância para o analito **Fósforo** compreendendo as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2)..... 242
Tabela 56. Análise de Variância para o analito **Fósforo** compreendendo as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2)..... 243
Tabela 57. Análise de Variância para o analito **Fósforo** compreendendo as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2)..... 243
Tabela 58. Análise de Variância conjunta para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 244
Tabela 59. Análise de Variância para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta..... 244
Tabela 60. Análise de Variância para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta..... 245
Tabela 61. Análise de Variância para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta..... 245
Tabela 62. Análise de Variância conjunta para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 246
Tabela 63. Análise de Variância para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta..... 246
Tabela 64. Análise de Variância para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta..... 247
Tabela 65. Análise de Variância para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta..... 247
Tabela 66. Análise de Variância conjunta para o analito **Boro** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 248
Tabela 67. Análise de Variância conjunta para o analito **Cobre** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 248
Tabela 68. Análise de Variância conjunta para o analito **Ferro** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos, exceto o controle negativo sem aplicação..... 249
Tabela 69. Análise de Variância conjunta para o analito **Manganês** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos, exceto o controle negativo sem aplicação..... 249
Tabela 70. Análise de Variância conjunta para o analito **Zinco** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos..... 250

Tabela 71. Análise das propriedades físicas do solo para os diferentes tratamentos com e sem aplicação de vinhaça não filtrada ao longo do tempo..... 252

Tabela 72. Análise de Variância conjunta (ANOVA) da fração **argila** presente nas diferentes amostras de solo avaliadas..... 253

Tabela 73. Análise de Variância conjunta (ANOVA) da fração **silte** presente nas diferentes amostras de solo avaliadas..... 253

Tabela 74. Análise de Variância conjunta (ANOVA) da fração **areia** presente nas diferentes amostras de solo avaliadas..... 253

VI - Lista de Figuras

Figura 1. Etapas do processo de produção de etanol celulósico..... 50

Figura 2. Volume de oferta e demanda de etanol no Brasil..... 53

Figura 3. Balança comercial de etanol no Brasil..... 54

Figura 4. Placas de RN1016 que receberam as suspensões celulares submetidas aos tratamentos de Tempo X Temperatura..... 62

Figura 5. Placas de CEN.PK que receberam as suspensões celulares submetidas aos tratamentos de Tempo X Temperatura..... 62

Figura 6. Placas de Pedra-2 que receberam as suspensões celulares submetidas aos tratamentos de Tempo X Temperatura..... 63

Figura 7. Efeito dos tratamentos de Tempo X Temperatura no número de células viáveis de levedura por mililitro..... 64

Figura 8. Esquema da metodologia utilizada no experimento em questão..... 66

Figura 9. Gráfico de decaimento da viabilidade de RN1016 submetida a diferentes condições de temperatura..... 67

Figura 10. Isomerização reversível de D-xilose a D-xilulose, catalisada pela enzima xilose isomerase..... 71

Figura 11. Inferência filogenética de xiloses isomerases de diferentes espécies. 74

Figura 12. Via metabólica simplificada da conversão de xilose em etanol..... 83

Figura 13. Mapa gênico do plasmídeo pRS415ADHXKScyc utilizado para o aumento da expressão de *XKS1*..... 83

Figura 14. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do plasmídeo p415ADHXKS1..... 84

Figura 15. Estratégia de substituição dos promotores dos genes da via das pentose-fosfato..... 86

Figura 16. Representação das etapas do processo de deleção do gene *GRE3*.. 87

Figura 17. Mapa gênico do plasmídeo pAKX002 utilizado para construção do cassete de expressão do gene *XylA*..... 91

Figura 18. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção de expressão do gene *XylA*..... 92

Figura 19. Mapa gênico do plasmídeo pRN801..... 94

Figura 20. Principais linhagens intermediárias usadas na obtenção de RN1016. 95

Figura 21. Quantificação do número de cópias do gene xilose isomerase na levedura RN1016..... 105

Figura 22: Representação do aumento do número de cópias do gene xilose isomerase por engenharia evolutiva..... 106

Figura 23: Detecção da posição das cópias do gene *Xilose isomerase* no genoma da linhagem RN1016..... 108

Figura 24 - Confidencial. Representação esquemática do cassete de expressão e recombinação de *XylA*..... AP

Figura 25 - Confidencial. Sequência completa do cassete de expressão e recombinação de *XylA*..... AP

Figura 26. Isomerização reversível de D-xilose a D-xilulose, catalisada pela enzima xilose isomerase..... 111

Figura 27. Curva de crescimento das linhagens CEN.PK e RN1016 em meio YEDP 2% contendo glicose como única fonte de carbono..... 124

Figura 28. Quantificação do consumo de glicose e produção de etanol das linhagens CEN.PK e RN1016 em meio YEPD 2% contendo glicose como única fonte de carbono..... 125

Figura 29: Parâmetros de desempenho fermentativo das linhagens CEN.PK e RN1016 cultivadas em YEPD 2% contendo glicose como única fonte de carbono..... 125

Figura 30. Estabilidade do gene *XylA* no genoma da linhagem RN1016**.** **Repetição 1**..... 129

Figura 31. Estabilidade do gene *XylA* no genoma da linhagem RN1016. **Repetição 2**..... 129

Figura 32. Estabilidade do gene *XylA* no genoma da linhagem RN1016. **Repetição 3**..... 130

Figura 33. Avaliação em tempo real da produção de etanol em biorreator pela levedura RN1016..... 132

Figura 34. Avaliação da produção acumulada de etanol pela levedura RN1016. 132

Figura 35. Representação esquemática dos ensaios de competição..... 141

Figura 36. Desempenho das linhagens RN1016 e CEN.PK durante nove ciclos de co-cultivo..... 143

Figura 37 - Confidencial. Desempenho das linhagens RN1016 e PE-2 durante nove ciclos de co-cultivo..... AP

Figura 38 - Confidencial. Desempenho das linhagens RN1016 e CAT-1 durante nove ciclos de co-cultivo..... AP

Figura 39: Árvore de decisão da FAO/WHO para avaliação da alergenicidade de alimentos geneticamente modificados (WHO 2001)..... 150

Figura 40. Teste de alergenicidade baseado na homologia da sequência de Xilose isomerase de acordo com as regras da FAO/WHO (WHO, 2001)..... 153

Figura 41. Diferentes fases da divisão celular na espécie *S. cerevisiae*..... 158

Figura 42. Principais fatores envolvidos no processo de esporulação..... 159

Figura 43. Ensaio de esporulação das leveduras RN1016 e PE-2..... 162

Figura 44. Efeito do antibiótico higromicina sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2..... 166

Figura 45. Efeito do antibiótico genteticina sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2..... 167

Figura 46. Efeito do etanol sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2..... 168

Figura 47. Efeito do hipoclorito de sódio sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2..... 169

Figura 48. Recipientes utilizados nos experimentos de ecotoxicidade aguda..... 174

Figura 49. Pesagem dos conjuntos de 10 minhocas, efetuada antes da disposição nos recipientes com devidos tratamentos..... 176

Figura 50. Evolução do peso das minhocas ao longo do tempo..... 178

Figura 51. Representação esquemática do experimento de avaliação do comportamento de fuga..... 184

Figura 52. Fotos da montagem e condução do experimento de comportamento de fuga..... 185

Figura 53. Coleta de amostra de água no Lago do Instituto de Biologia da Unicamp..... 203

Figura 54. Coleta de amostra de água no Ribeirão da Avenida Romeu Tórtima. Barão Geraldo. Campinas – SP..... 203

Figura 55. Coleta de amostra de água da rede pública (torneira). Campinas – SP..... 203

Figura 56. Placas das amostras 2, 5 e 8 em meio PCA..... 206

Figura 57. Porcentagem de células viáveis de levedura no solo..... 214

Figura 58. Colônias oriundas do plaqueamento de solução de solo nos diferentes tempos de coleta..... 215

Figura 59. Representação gráfica do número médio de células de levedura viáveis no solo ao longo do tempo..... 215

Figura 60. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água esterilizada mantida a 8°C..... 220

Figura 61. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água esterilizada mantida a 25°C..... 220

Figura 62. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água não esterilizada mantida a 8°C..... 221

Figura 63. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água não esterilizada mantida a 25°C..... 221

Figura 64. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo esterilizado mantido a 8°C..... 222

Figura 65. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo esterilizado mantido a 25°C..... 222

Figura 66. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo não esterilizado mantido a 8°C..... 223

Figura 67. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo não esterilizado mantido a 25°C..... 223

Figura 68. Coleta de amostras de solo..... 228

Figura 69: Região variada v4 do gene ribossomal 16S sequenciada por *reads paired-end* de 250 bp..... 256

Figura 70. Gel de agarose 0,7% para avaliar a qualidade do DNA genômico extraído de amostras de solo suplementado com diferentes fontes de vinhaça... 259

Figura 71. Efeito da aplicação de diferentes vinhaças sobe a comunidade bacteriana do solo de canavial..... 261

Figura 72. Efeito da vinhaça não filtrada derivada da fermentação do hidrolisado pela levedura PE-2 sobre a comunidade bacteriana do solo de canavial..... 264
Figura 73. Efeito da vinhaça não filtrada derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras PE-2 e RN1016 sobre a comunidade bacteriana do solo de canavial..... 265
Figura 74. Efeito da vinhaça não filtrada derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras CEN.PK e RN1016 sobre a comunidade bacteriana do solo de canavial..... 266
Figura 75. Efeito da aplicação de diferentes vinhaças sobe a comunidade de fungos do solo de canavial..... 268
Figura 76. Efeito da vinhaça derivada da fermentação do hidrolisado pela levedura PE-2 sobre a comunidade de fungos do solo utilizado para o cultivo de cana-de-açúcar..... 270
Figura 77. Efeito da vinhaça derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras PE-2 e RN1016 sobre a comunidade de fungos do solo utilizado para o cultivo de cana-de-açúcar..... 271
Figura 78. Efeito da vinhaça derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras CEN.PK e RN1016 sobre a comunidade de fungos do solo utilizado para o cultivo de cana-de-açúcar..... 272

VII – Resumo Executivo

Os números que mostram o crescimento populacional são cada vez mais utilizados para ilustrar a demanda por alimentos no mundo. Observando estes números por uma perspectiva mais ampla, rapidamente ampliamos essa demanda a uma série de outros recursos necessários ao desenvolvimento humano. Entre os recursos de demanda crescente, tem destaque a Energia, independente de sua forma ou natureza. Os combustíveis são hoje uma das principais fontes de energia necessárias para o desenvolvimento econômico e social da população mundial.

Nos dias atuais, a matriz de combustíveis no Brasil e no mundo é majoritariamente apoiada em fontes fósseis, que utilizam o petróleo como principal componente de transformação. A busca por fontes alternativas e por tecnologias que permitam a transformação destas fontes em combustíveis tem sido o foco de Empresas e Instituições de Pesquisa nos últimos anos.

A utilização de fontes renováveis para a produção de combustíveis e bioquímicos tem se desenvolvido ao longo dos anos como uma alternativa promissora e sustentável. As fontes de biomassa lignocelulósica contém um enorme potencial calorífico, que hoje em dia é pouco utilizado em todo o mundo. Recentemente, novas tecnologias foram desenvolvidas e otimizadas, tornando economicamente viável, em escala comercial, a utilização destas matrizes como fontes de açúcares fermentescíveis. Estima-se que, com a utilização de resíduos das usinas brasileiras de açúcar e álcool, como palha e bagaço, é possível aumentar a produção nacional de etanol em 50%, sem a necessidade de expandir a área plantada. Este é um dos objetivos da empresa brasileira GraalBio Investimentos SA. e de sua subsidiária tecnológica BioCelere Agroindustrial Ltda.

A levedura RN1016 é de propriedade da Empresa DSM N.V. in Heerlen (Delft, Holanda). A Empresa brasileira GraalBio SA., detentora da subsidiária BioCelere Agroindustrial Ltda., irá utilizar comercialmente a levedura RN1016, e colocará o Brasil em posição de pioneirismo com a operação em escala comercial da primeira planta de etanol celulósico do hemisfério sul. Esta planta terá capacidade estimada de produção anual de 82 milhões de

litros de etanol utilizando palha e bagaço como fonte de biomassa e açúcares fermentescíveis.

A BioCelere Agroindustrial Ltda. é uma empresa brasileira de tecnologia, que investe em pesquisa e desenvolvimento com o objetivo de criar inovações tecnológicas capazes de contribuir com o fornecimento de etanol e bioquímicos produzidos com base em fontes renováveis. A GraalBio Investimentos SA. tem como um de seus sócios o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES.

A GraalBio é uma empresa 100% brasileira fundada em junho de 2011 com o objetivo de tornar o Brasil o país pioneiro na produção de etanol e bioquímicos de fontes sustentáveis. Para isso, a Empresa assume o risco da inovação e busca integrar tecnologias de modo a viabilizar economicamente a produção de etanol celulósico, partindo inicialmente de subprodutos das usinas brasileiras de açúcar e álcool.

Dentre as tecnologias que viabilizaram a exploração comercial destas fontes renováveis de açúcares, está o desenvolvimento de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* capazes de fermentar açúcares de 5 carbonos, como a xilose e a arabinose, além da tradicional glicose de 6 carbonos.

A Levedura *S. cerevisiae* cepa RN1016 expressa o gene *XylA*, codificador da enzima xilose isomerase. Este gene é oriundo do microrganismo não patogênico *Piromyces* sp., e catalisa a conversão de D-xilose em D-xilulose. Além da inserção do gene *XylA*, outros genes endógenos da levedura, que participam do metabolismo de açúcar, tiveram sua expressão aumentada com a finalidade de tornar mais eficiente o processo fermentativo de carboidratos, especialmente de 5 carbonos. Este aumento de expressão se deu através da utilização de promotores constitutivos da própria levedura.

Estes genes são: *XKS1* (codificador de uma xiluloquinase), *TAL1* (codificador de uma transaldolase), *TKL1* (codificador de uma transcetolase), *RPE1* (codificador de uma D-ribulose-5-fosfato epimerase) e *RKI1* (codificador de uma ribose-5-fosfato ceto-isomerase). A linhagem RN1016 ainda apresenta a deleção do gene *GRE3* (codificador de uma aldose redutase), visto que esse gene é responsável pela produção de xilitol a partir

da xilose, diminuindo o rendimento de etanol.

No decorrer deste Relatório de Biossegurança diversos resultados experimentais e informações científicas demonstram a biossegurança da Linhagem RN1016 de levedura. A utilização desta cepa para produção de etanol no Brasil marca o início de uma nova e promissora era na produção sustentável do biocombustível etanol no país.

RELATÓRIO DE BIOSSEGURANÇA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* LINHAGEM RN1016

MONITORAMENTO PÓS-LIBERAÇÃO COMERCIAL

Ref. ANEXO I, Resolução Normativa N° 05

São Paulo, 15 de Março de 2013

Rod. Anhanguera, km 104,5. Cond. Unic, bloco A. Techno Park. CEP: 13016-330 – Campinas – SP
_Tel 55 (11) 2739 0500 _Fax 55 (11) 2739 0510

1. Monitoramento Pós-liberação comercial – *Saccharomyces cerevisiae* linhagem RN1016;

A exposição ambiental dos microrganismos utilizados para produção de etanol é bastante reduzida, uma vez que toda a reação de fermentação e posterior destilação ocorrem no interior de dornas e destiladores alimentados por tubulações fechadas. Esta observação é igualmente válida para a produção de etanol celulósico (2G), para a qual pretende-se utilizar a levedura RN1016.

O subproduto da Usina de etanol é a vinhaça, que se origina da destilação do caldo fermentado. Atualmente, a vinhaça é um importante mecanismo de retorno ao solo do canavial de nutrientes retirados com a colheita da cana. Este produto é aplicado na forma de fertirrigação, substituindo a utilização de fertilizantes químicos para suprimento, principalmente, de potássio e fósforo, além da água que é parte da vinhaça. Ainda na Usina, a vinhaça é frequentemente concentrada por processo térmico, semelhante a um cozimento. Este processo facilita o armazenamento, transporte e aplicação do produto. As Usinas de etanol celulósico poderão concentrar a vinhaça produzida através do processo térmico mencionado, conforme a conveniência.

Experimentos descritos no decorrer deste Relatório de Biossegurança demonstraram que as células da Levedura RN1016, bem como de seu equivalente convencional e controle comercial, são totalmente eliminadas após tratamento térmico por condições de tempo e temperatura significativamente inferiores àquelas empregadas no processo de destilação. Este processo garante que células viáveis da levedura RN1016 não serão dispostas no meio ambiente.

O monitoramento pós-liberação comercial é exigência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança como parte do processo de solicitação de Emissão de Parecer Técnico sobre OGMs. A Resolução Normativa Nº 9

de 2 de dezembro de 2011 define as diretrizes para preparo e condução do monitoramento pós-liberação comercial.

O monitoramento pós-liberação comercial tem o objetivo de "*obter informações que possam indicar efeitos adversos decorrentes da liberação comercial do OGM sobre o ambiente ou sobre a saúde humana ou animal, em consonância com sua aplicação de uso*" (RN09, Art. 1, §1º).

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 do OGM, em consonância com a avaliação de risco da CTNBio, bem como com o parecer contido na sua decisão técnica*.

RELATÓRIO DE BIOSSEGURANÇA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* LINHAGEM RN1016

INFORMAÇÕES RELATIVAS AO OGM

Ref. ANEXO II, Resolução Normativa N° 05

São Paulo, 15 de Março de 2013

Rod. Anhanguera, km 104,5. Cond. Unic, bloco A. Techno Park. CEP: 13016-330 – Campinas – SP
_Tel 55 (11) 2739 0500 _Fax 55 (11) 2739 0510

IX – Informações relativas ao OGM

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

1.1. Identificação do evento de transformação genética;

O organismo geneticamente modificado objeto deste Relatório de Biossegurança para o qual solicita-se à CTNBio a emissão de parecer técnico é a linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* **RN1016**.

1.2. A biologia e biossegurança de *Saccharomyces cerevisiae*;

Saccharomyces cerevisiae é um organismo eucarionte e unicelular ubíquo, comumente conhecido como levedura, assim como uma diversidade de outras 1500 espécies distribuídas em 100 diferentes gêneros. A linhagem de levedura padrão de laboratório S288c foi o primeiro eucarioto a ter o genoma sequenciado, revelando uma estrutura composta por aproximadamente 6000 genes distribuídos em 16 cromossomos (Goffeau *et al*., 1996). A quantidade destes cromossomos nas células pode variar naturalmente sob a forma haplóide (16 cromossomos) ou diplóide, quando a célula possui dois pares de cada um dos cromossomos (32 no total).

A reprodução destas leveduras ocorre por um evento de duplicação de cromossomos seguido de divisão celular (mitose), em um processo conhecido como brotamento que mantém o número original de cromossomos da célula mãe. Além disso, uma levedura diploide pode também ser originada através do cruzamento entre dois isolados haploides. Estes haploides devem obrigatoriamente ser opostos quanto à diferenciação sexual, isto é, uma célula deve possuir o sexo “a” (MATa) e outra o “alfa” (MATalfa), gerando uma célula MATa/MATalfa. Por outro lado, um haploide pode ser originado por uma célula diploide através de um evento de meiose, que produz quatro gametas haploides (esporos), sendo dois “a” e outros dois “alfa”.

Culturas puras de cada um destes esporos podem se manter haploides quando a linhagem possuir a característica heterotálica, ou seja, não sendo capaz de mudar o sexo. Entretanto, isto não ocorre em linhagens homotálicas, onde a cultura adquire a configuração diploide através do cruzamento de seus esporos irmãos. Linhagens heterotálicas são particularmente interessantes do ponto de vista da manipulação genética, devido à facilidade de se trabalhar com organismos haploides.

1.2.1. Aplicações de *S. cerevisiae;*

A popularidade de *S. cerevisiae* na pesquisa básica e aplicada é sem dúvida influenciada pela sua classificação como um organismo GRAS (sigla em inglês para *Generally Recognized As Safe*) e sem restrição para o consumo humano pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA). Recentemente, foi demonstrado também a ausência de vantagens adaptativas e reprodutivas de uma levedura modificada por engenharia genética para produção de vinho nos EUA e Canadá em relação ao seu parental selvagem (Schoeman *et al*., 2009). As leveduras da espécie S. cerevisiae não apresentam histórico de patogenicidade e seres humanos ou animais, salvo casos bastante raros de pacientes severamente imunocomprometidos, sem que estes fatos isolados tenham levado a qualquer restrição de uso alimentar ou industrial do microrganismo.

Devido ao reduzido tamanho de seu genoma (12 milhões de pares de bases), uma ampla diversidade de técnicas disponíveis e a facilidade de manipulação, este microrganismo se tornou um importante modelo para estudos de biologia molecular e genética. Além das aplicações como modelo biológico, esta espécie é altamente versátil, sendo utilizada em uma variedade de processos biotecnológicos que envolvem fermentação alcoólica, isto é, a bioconversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono.

A capacidade de *Saccharomyces cerevisiae* de realizar fermentação alcoólica foi descrita em 1860 por Louis Pasteur (Pasteur, 1860). Apesar do conhecimento bioquímico deste processo ser recente, há milhares de anos a humanidade explora a capacidade fermentativa das leveduras como um modo de preservar a qualidade de bebidas e comidas (Sicard & Legras, 2011). Não há registros de quando o homem começou a conscientemente adicionar leveduras selecionadas para fabricação de pão, cerveja ou vinho, mas as primeiras evidências da ocorrência da fermentação que, provavelmente, se deram pela ocorrência natural de leveduras, datam do período Neolítico (McGovern *et al*., 2004).

Ao longo dos últimos anos, o desenvolvimento de novas técnicas, tanto no processo de fermentação como na biologia molecular, permitiram que as células de levedura se tornassem verdadeiros biorreatores para a produção

de uma diversidade de produtos. Entre eles, pode-se exemplificar a produção de proteínas heterólogas (Porro *et al*., 2011), ácidos orgânicos (Abbott *et al*., 2009), glicerol (Cordier *et al*., 2007), e a produção natural de derivados aromatizantes e complementos nutritivos proteicos, minerais e vitamínicos, e mais proeminentemente a produção de pães, de biomassa e etanol. Este último 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 biocombustível (etanol).

Linhagens de levedura da espécie *S. cerevisiae* são amplamente utilizadas para a produção de etanol. O Brasil é um modelo de produção deste combustível, utilizando como matéria prima o caldo da cana-de-açúcar. A possibilidade de utilizar biomassa vegetal, como resíduos da indústria de cana (palha e bagaço) e outros, vem se mostrando viável economicamente, após muitos anos de pesquisa. Essa tecnologia é chamada de **Etanol Celulósico**, ou **Etanol de Segunda Geração** (**2G**). A levedura RN1016 será utilizada para a produção de etanol 2G no Brasil pela Empresa brasileira GraalBio, colocando o país em uma posição de vanguarda e pioneirismo nesta tecnologia, contribuindo com a matriz energética brasileira e fornecendo uma alternativa sustentável e renovável para a produção de biocombustíveis.

1.3. A produção e o mercado de etanol;

1.3.1. Etanol no Brasil;

O etanol é um dos compostos químicos mais conhecidos na atualidade, fazendo parte da vida dos seres humanos a centenas de anos. Atualmente este álcool possui diversas aplicações, que vão desde a alimentação, como componente de bebidas e alimentos, até a utilização como biocombustível para automóveis e para a Indústria. O produto químico gerado pela fermentação de biomassa lignocelulósica pela levedura RN1016, ou por qualquer levedura de mesma capacidade, é essencialmente idêntico ao etanol amplamente produzido pelas usinas de açúcar e álcool no mundo.

O processo de produção de etanol no Brasil é o que apresenta maior viabilidade econômica entre os processos conhecidos. Por um lado, possui enorme capacidade produtiva, devido aos baixos custos de obtenção da matéria-prima e às condições geográficas e climáticas do país (Wheals *et al*., 1999). Por outro lado, com grande contribuição do Proálcool (Programa Nacional do Álcool) iniciado na década de 70, desenvolveu toda uma tecnologia de produção, distribuição e utilização de etanol (Goldemberg, 2008). Com isso, o Brasil é o mais eficiente produtor mundial e, em vista da necessidade global por combustíveis alternativos, se apresenta como um dos países capazes de liderar tal mudança de matriz produtiva no mundo.

A obtenção do etanol no Brasil se dá pela via fermentativa no interior das dornas, nas quais são adicionados a mistura de mosto (caldo ou melaço de cana-de-açúcar) e uma determinada concentração de leveduras (10 – 15%, m/v) (Amorim *et al*., 2011). Após o término da fermentação (8 a 15 horas), todo o conteúdo é centrifugado. O vinho, formado pelo mosto fermentado sem as leveduras, segue para as torres de destilação para obtenção do etanol. Já o leite de levedura, nome dado ao caldo de leveduras que sai da centrifugação, passa por um tratamento com ácido sulfúrico para reduzir o número de bactérias contaminantes (Oliva-Neto, 1990) e retorna à dorna, na qual será adicionada uma nova carga de mosto para um novo ciclo fermentativo (Meleiro & Maciel-Filho, 2000; Wheals *et al*., 1999). Este

processo é repetido a cada ciclo fermentativo ao longo de toda a safra, que compreende em média nove meses. O reaproveitamento de leveduras é um procedimento economicamente importante para a Usina de primeira geração, uma vez que a produção de um novo fermento iniciador com a quantidade de massa celular adequada necessita de tempo e um grande consumo de açúcar, o que torna o processo demorado, eleva os custos de produção e reduz a produtividade (Amorim *et al*., 2011; Meleiro & Maciel-Filho, 2000).

No processo industrial de fermentação, uma observação importante sistematizada nos últimos anos, é que a população das linhagens de levedura não é homogênea e nem constante durante a safra. As leveduras originais inoculadas em altas concentrações no início da safra muitas vezes são substituídas por linhagens selvagens em poucos dias durante o processo de fermentação (Basso *et al*., 2008; da Silva-Filho *et al*., 2005). Silva-Filho e colaboradores (2005) mostraram que, em alguns casos, essa substituição não era nem mesmo notada, pois não havia queda na produtividade da usina, possivelmente pelo fato das leveduras selvagens serem melhor adaptadas às condições da usina.

Estas observações modificaram ao longo do tempo a estratégia de seleção de inóculos iniciais para a fermentação. Nas últimas duas décadas, linhagens nativas isoladas das próprias dornas vêm sendo selecionadas por possuírem características de interesse e boa permanência nas dornas (Basso *et al*., 2008). Estas linhagens passaram então a ser produzidas comercialmente em larga escala e utilizadas como inóculos iniciais ao invés ou em conjunto com linhagens de panificação.

Dentre as poucas cepas selecionadas com características desejáveis, destacam-se: BG-1, SA-1, CAT-1 e PE-2, utilizadas largamente na produção de etanol no Brasil. Na safra de 2007, CAT-1 e PE-2 (Pedra-2) foram utilizadas por cerca de 150 usinas, respondendo por 60% do etanol produzido no Brasil (Basso *et al*., 2008). Entretanto, essas linhagens vêm perdendo gradativamente seu desempenho ao longo dos anos (Dr. Luiz Carlos Basso, comunicação pessoal), principalmente devido às alterações operacionais do processo, como a redução da queima da cana-de-açúcar, o aumento do teor alcoólico da fermentação e o aparecimento de linhagens selvagens mais

robustas.

Os esforços de pesquisa no setor estão focados no sentido de aumentar o rendimento e a produtividade para que o etanol se torne ainda mais competitivo internacionalmente. Isto engloba desde o desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar, incluindo plantas transgênicas, como também a expansão da área agrícola, inovações na linha de produção das usinas, seleção e desenvolvimento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar da importância biotecnológica, poucos estudos têm sido dedicados ao melhoramento genético das linhagens de levedura normalmente empregadas no processo fermentativo. Neste ponto, o escasso número de trabalhos sobre a compreensão genética e fisiológica das linhagens Brasileiras é um dos principais fatores limitantes para o progresso nesta área (Argueso & Pereira, 2010).

1.3.2. Etanol celulósico (Segunda Geração);

O etanol celulósico, ou de segunda geração (2G), é aquele produzido a partir de material lignocelulósico. Este material inclui resíduos vegetais agrícolas, florestais e de fontes urbanas, culturas energéticas (cana-de-açúcar, sogo) e culturas florestais. A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol ocorre através de três principais etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação.

A etapa de pré-tratamento tem a finalidade de aumentar a acessibilidade dos polímeros que constituem a parede celular vegetal aos componentes que realizarão o posterior processo de hidrólise. A hidrólise, ácida ou enzimática, é responsável por disponibilizar os açúcares componentes da celulose e da hemicelulose, que podem então ser convertidos em etanol via fermentação por microrganismos especializados.

Análises recentes mostram que a utilização de etanol celulósico como combustível tem um grande potencial de reduzir a dependência por petróleo, estabilizar os preços dos combustíveis, fortalecer a infraestrutura rural e ainda contribuir com a redução dos gases de efeito estufa (Bracmort, 2012). Além disso, este biocombustível não irá competir com a produção de alimentos, uma vez que resíduos das usinas de primeira geração serão utilizados no processo produtivo.

A palha e o bagaço derivados de cana-de-açúcar 1G, se destinadas à produção de etanol celulósico, oferecem um potencial de expansão da produção de etanol no Brasil em mais de 45% se comparada com a atual capacidade instalada. Isto representa uma potencial solução para o atual déficit interno anual de etanol, calculado em 2,4 bilhões de litros, e pode ser alcançado sem a necessidade de investimentos adicionais em áreas já cultivadas, sem a competição com culturas destinadas à alimentação e sem expansão da fronteira agrícola.

Baseado nestas perspectivas e nos atuais avanços das pesquisas, uma variedade de iniciativas estão em desenvolvimento em escala mundial. De acordo com as estimativas do governo americano, 220 plantas industriais estarão em funcionamento no país até 2020 (Bracmort, 2012). No Brasil, a expectativa é que as primeiras plantas demonstrativas e industriais que vêm

sendo desenvolvidas pelos grupos GraalBio, Odebrecht Agroindustrial, Petrobrás, Abengoa, Raízen e Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), entre outras, entrem em operação nos próximos anos. Para tanto, a utilização comercial de leveduras capazes de fermentar açúcares lignocelulósicos, como a Linhagem RN1016, se torna extremamente importante.

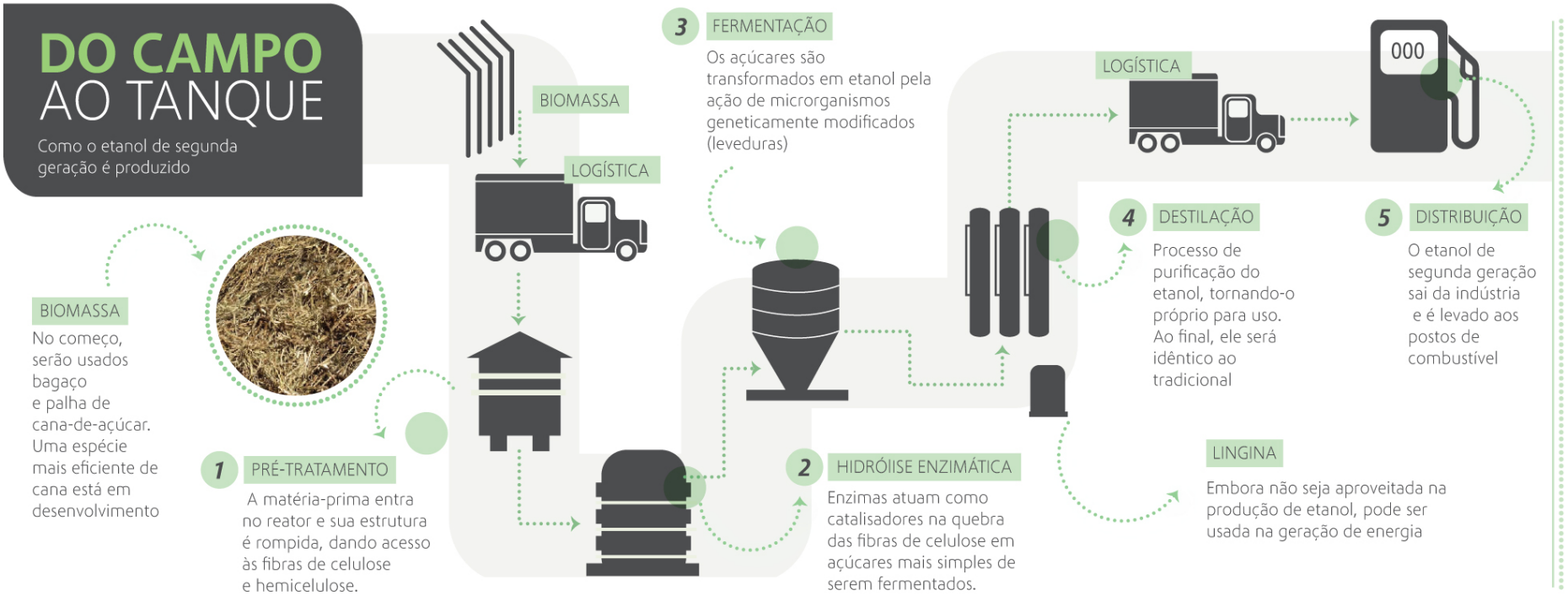

Figura 1. Etapas do processo de produção de etanol celulósico (Fonte: GraalBio Investimentos SA.).

1.3.3. Tendências do mercado mundial de etanol;

O mercado de leveduras destinadas à produção de biocombustíveis é impulsionado pela crescente demanda mundial por combustíveis renováveis, em especial pelo etanol. Este biocombustível pode ser produzido a partir da fermentação de diferentes matérias-primas, como milho, cevada, trigo, beterraba, cana-de-açúcar e, mais recentemente, material celulósico hidrolisado (Basso *et al*., 2010). Em 2010, Estados Unidos e Brasil foram responsáveis por 57% e 33%, respectivamente, dos 86 bilhões de litros de etanol produzidos mundialmente (Shrank & Farahmand, 2011).

Estes países, juntamente com a União Européia, Argentina, Canadá, China e Indonésia, foram responsáveis por mais de 90% da produção, consumo e comércio de biocombustíveis no mundo em 2012 (USDA, 2013). Este cenário no mercado global de biocombustíveis deve mudar pouco na próxima década. Somente para o etanol, a produção agregada destes países deverá aumentar cerca de 40% entre 2013 e 2022 (USDA, 2013).

No Brasil, o aumento contínuo da frota de carros movidos a bicombustíveis e a demanda por exportação (para ser misturado à gasolina utilizada nos EUA) favorecerá a expansão da cadeia produtiva até 2025, que conta hoje com aproximadamente 450 usinas de primeira geração instaladas. Projeções mais ambiciosas (substituir 10% da gasolina mundial) exigirão um aumento de cerca de 10 vezes na produção neste mesmo período (Leite, 2009). Para alcançar essas metas, o país tem investido na melhoria do processo convencional (isto é, etanol de primeira geração) e ao mesmo tempo no desenvolvimento de novas tecnologias para produzir biocombustíveis a partir de biomassa celulósica (etanol celulósico – segunda geração).

Nos EUA, o volume de combustíveis renováveis deverá atingir 136 bilhões de litros até 2022, o que corresponde a 30% de todo o volume de combustíveis do país (Bracmort, 2012). Deste volume, o Governo Americano propõe que 10% deverão ser provenientes de etanol e primeira geração e outros 45% de etanol celulósico. A União Europeia também estabelece metas de utilização de combustíveis provenientes de fontes renováveis. Em 2020, a

expectativa é de que a frota de automóveis deva ser abastecida com pelo menos 10% de biocombustíveis.

Neste ponto, as leveduras são componentes essenciais para ambos os sistemas de produção de etanol. Por esta razão, o aumento do número de usinas (para primeira geração) e a implementação de novas tecnologias (para a segunda geração) aumentarão consequentemente a demanda por microrganismos já utilizados e a necessidade de desenvolvimento de linhagens adequadas aos novos processos.

1.3.4. Cenário atual do mercado de etanol no Brasil;

Desde 2008, o mercado brasileiro de etanol vem apresentando um crescente descompasso entre a oferta efetiva e a demanda potencial por esse produto (Milanez *et al*., 2011). Pelo lado da demanda, as vendas de automóveis *flex* aumentaram cerca de 11% ao ano entre 2008 e 2010 segundo dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea). Tais vendas registraram a marca histórica de aproximadamente 2,876 milhões de unidades em 2010 e mantiveram-se praticamente estáveis em 2011. Como resultado, a frota atual de veículos *flex* em circulação já ultrapassa 14,5 milhões de unidades, com participação estimada de 46% na frota total de veículos leves (Fonte: Anfavea).

Do ponto de vista do suprimento, a oferta de etanol variou bastante neste mesmo período. Enquanto em 2008 e 2010 foram produzidos aproximadamente 27,5 bilhões de litros do produto, em 2011 houve uma significativa redução de quase 5 bilhões de litros, o que representa um decréscimo de 18% (Figura 2 - Fonte: DATAGRO). Esse quadro contrasta com o do período imediatamente anterior, quando a produção de etanol aumentou em média cerca de 13% ao ano entre 2003 e 2008 (Milanez *et al*., 2011). Estimativas recentes apontam uma tendência similar para esta próxima safra (Fonte: UNICA).

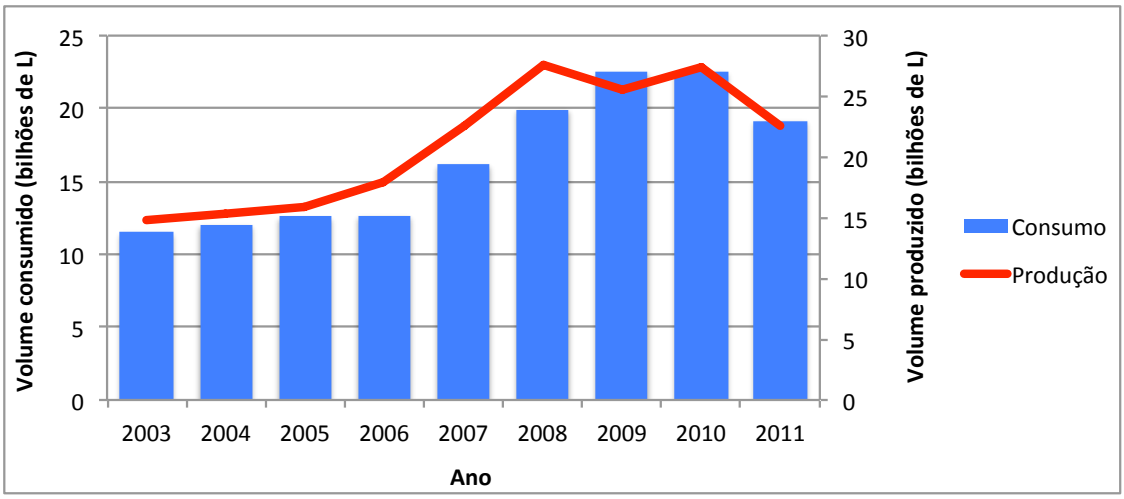

Figura 2. Volume de oferta e demanda de etanol no Brasil**.** Foram considerados os volumes totais de etanol anidro e hidratado no país durante o período de 2003 a 2011. Fonte: DATAGRO.

Baseado nas projeções de demanda brasileira, estima-se que adicionalmente 14,6 bilhões de litros sejam exigidos até 2015. Tendo em vista o desbalanço entre a oferta e a demanda, este volume representa um enorme desafio ao setor. Entretanto, levantamentos apontam que os grupos sucroenergéticos teriam condições de produzir apenas cerca de 2,63 bilhões de litros a mais até 2015. Nesse ano, o déficit poderia atingir 12 bilhões de litros e o déficit acumulado no período 2011-2015 seria de 32,4 bilhões de litros (Milanez *et al*., 2011). Como pode-se observar, a situação do suprimento do biocombustível etanol é potencialmente crítica.

Dada a estagnação recente da produção nacional de etanol, o país foi levado a importar o produto. Em 2011, o Brasil atingiu a marca histórica de aproximadamente 1,1 bilhão de litros de etanol, segundo dados da DATAGRO (Figura 3).

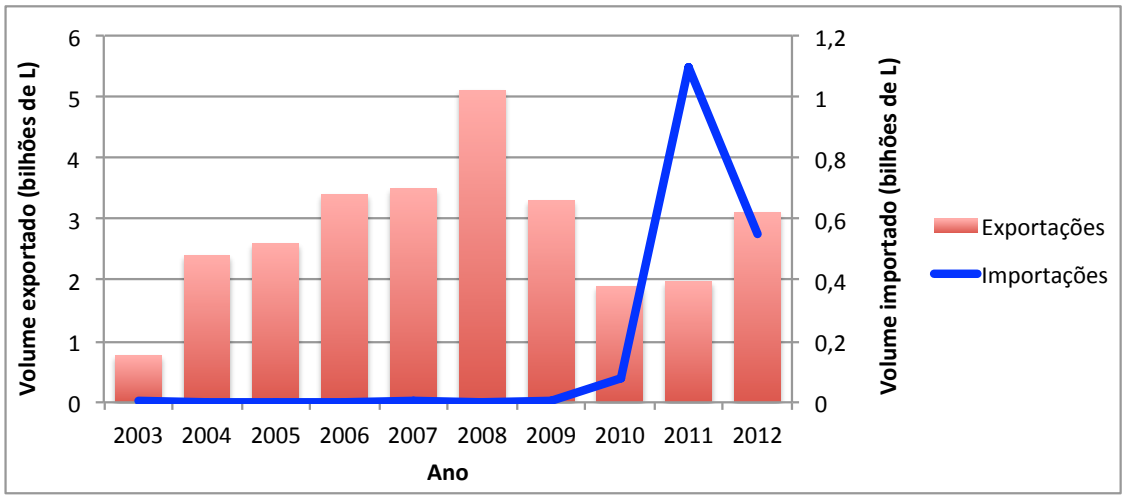

Figura 3. Balança comercial de etanol no Brasil**.** Foram considerados os volumes totais de etanol anidro e hidratado durante o período de 2003 a 2012. Fonte: DATAGRO.

Outros dois fatores agravantes também poderão contribuir para o déficit de etanol nos próximos anos no Brasil: a demanda interna da gasolina e o aumento das exportações para os EUA. O aumento da frota de veículos leves demandará mais gasolina e consequentemente mais etanol anidro obrigatoriamente misturado na mesma. O Governo Federal planeja ainda elevar em 5% a quantidade de etanol na gasolina para maio de 2013, o que também contribuirá significativamente para o aumento da demanda por etanol.

Duas recentes iniciativas do Governo Americano poderão influenciar positivamente para o aumento das exportações de etanol brasileiro e consequente demanda pelo produto. Em 2010, o governo dos EUA decidiu não renovar sua tarifa sobre a importação de etanol, o que aumenta o potencial de exportação do produto brasileiro. Aliado a esta iniciativa, um mandato federal americano exige que uma fração crescente de biocombustíveis sejam usados em sua frota a partir de 2006, atingindo 136 bilhões de litros, ou 30% do total de combustível no país, até 2022 (Bracmort, 2012). Esse volume será dividido conforme o tipo de matéria prima utilizada na obtenção do produto. Por exemplo, o volume consumido de um combustível avançado, como o etanol produzido no Brasil a partir de cana-de-açúcar, deve ser elevado dos atuais 2,85 bilhões de litros para 15 bilhões de litros em 2022 (Schnepf & Yacobucci, 2010).

Como nos EUA não há limitação de preço para o etanol, é factível que sejam negociados preços de venda maiores do que os praticados no Brasil. Desse modo, há possibilidade de que parcela maior da produção nacional seja direcionada para o mercado norte-americano, favorecendo a balança comercial brasileira (Milanez *et al*., 2011).

Esses números demonstram uma real e imediata necessidade de investimentos no setor nacional, sejam estes em construção e modernização de novas usinas de primeira geração, renovação e ampliação dos canaviais, redução da carga tributária, acesso a crédito agrícola e implantação e aprimoramento da tecnologia de produção de etanol celulósico.

Portanto, de forma a garantir que, de um lado, o etanol continue representando parcela importante da matriz nacional de combustíveis e, de outro, que o Brasil cumpra um papel relevante no comércio internacional de etanol, é de extrema importância a implementação dos pontos discutidos anteriormente de forma a acelerar o crescimento do setor sucroenergético e permitir um padrão de expansão ainda mais intenso do que o verificado recentemente (Milanez *et al*., 2011).

1.4. Objetivo e utilização do OGM e seus derivados;

O microrganismo objeto deste relatório foi modificado geneticamente para tornar-se apto a utilizar açúcares de 5 carbonos no processo de fermentação alcoólica. Desta maneira, esta levedura tem a capacidade de consumir não somente a sacarose, mas também açúcares derivados da biomassa lignocelulósica, uma vez disponibilizados por tratamentos específicos (item anterior).

A utilização de biomassa vegetal para produção de etanol e outras moléculas vem se destacando como uma alternativa viável e sustentável para contribuir com o atendimento da demanda energética nacional e mundial. Um volume muito grande de resíduos vegetais oriundos das Usinas de açúcar e álcool ou papel e celulose, que muitas vezes é queimado ou descartado, poderá ser utilizado como fonte de açúcares fermentescíveis na produção de etanol e outras moléculas. Este é o objetivo da Empresa que, através do presente pleito, solicita à CTNBio a emissão de Parecer Técnico para este Relatório de Biossegurança da Levedura RN1016.

A utilização comercial desta levedura geneticamente modificada será absolutamente restrita ao interior dos fermentadores e tubulações em usinas de produção de etanol. Trata-se de um sistema fechado, todo conectado por tubulações, sem exposição do OGM viável a ambientes externos durante o processo de produção de etanol. As leveduras utilizadas na fermentação são totalmente desvitalizadas anterior ao descarte em fases do processo inustrial:

(1) **Destilação**: Após o final da fermentação, o conteúdo das dornas é direcionado à coluna de destilação, onde se procede a separação do etanol por um processo térmico de destilação. Este processo envolve o emprego de temperaturas elevadas, de aproximadamente **80 a 85°C** por cerca de **10 a 12 minutos**. Como pode-se observar a seguir no resultado experimental descrito no subítem **1.4.1**, após 120 segundos à 60°C a levedura RN1016 é totalmente desvitalizada, bem como os respectivos controles. A etapa correspondente à destilação é, por si só, suficiente para eliminar com segurança 100% das leveduras utilizadas na fermentação.

(2) **Filtragem e queima da lignina**: Após a destilação, a vinhaça inicial é submetida a uma filtragem para remoção da lignina. Nesta etapa, a maior parte dos resíduos celulares das leveduras acabam permanecendo junto à lignina filtrada. Esta lignina filtrada é automaticamente direcionada ao forno de queima, uma vez que possui um alto poder calorífico. Este processo elimina por queima a maior parte dos resíduos das células utilizadas na fermentação que foram anteriormente desvitalizadas pelo processo de destilação.

(3) **Tratamento com luz ultravioleta**: Além dos tratamentos anteriores, suficientes para garantir a inativação das leveduras, a vinhaça filtrada ainda é submetida a tratamento com luz ultravioleta. Trata-se de uma medida extra de segurança que reforça a completa eliminação das leveduras antes do destino final da vinhaça.

Para maiores detalhes, um esquema simplificado do processo industrial destacando as etapas de esterilização é fornecido no **Apêndice Confidencial** que acompanha este relatório.

Tendo em vista estas etapas inerentes ao processo de produção de etanol celulósico, observa-se que as leveduras GM utilizadas na fermentação são completamente inativadas no interior da Usina, reduzindo dramaticamente qualquer chance de contato com o meio ambiente. No decorrer deste Relatório de Biossegurança uma série de resultados experimentais e informações relevantes são apresentados para demonstrar a Biossegurança da linhagem de levedura RN1016. Feita esta comprovação, torna-se factível a redução a níveis negligenciáveis do risco oriundo de uma improvável liberação acidental da levedura RN1016 no meio ambiente.

Para fins de ilustração, experimentos que comprovam a completa inativação da levedura RN1016 no processo industrial são apresentados neste item.

1.4.1. Desvitalização da Levedura RN1016 durante o processo de produção de etanol celulósico;

A utilização da Levedura geneticamente modificada RN1016 se dará exclusivamente no interior da Usina, dentro do sistema fechado que liga os fermentadores até a destilação, filtragem e concentração da vinhaça. Conforme já mencionado neste documento e descrito em detalhes nos próximos experimentos, as etapas do processo industrial são suficientes para garantir a completa inativação das células de levedura antes do final do processo.

Experimentos foram feitos para observar o efeito da temperatura e pH na viabilidade celular de RN1016 e controles ao longo do tempo. Estes experimentos demonstram que as condições de tempo e temperatura empregadas no processo industrial são consideravelmente superiores aquelas identificadas como suficientes para promover 100% de inativação das células da levedura RN1016, bem como dos controles.

Estes experimentos foram conduzidos nas dependências do Instituto de Biologia da UNICAMP e nos Laboratórios da Empresa DSM (Delft, Holanda).

1.4.1.1. Avaliação da temperatura na viabilidade celular da Levedura RN1016. (Experimento 1 – IB/UNICAMP);

O processo fermentativo é por si só uma etapa de estresse para a viabilidade das células de levedura, uma vez que no final do processo a concentração de etanol no meio praticamente limita a viabilidade celular. Após a fermentação este mosto fermentado é destilado para separar o etanol do restante da fração aquosa. Este processo de destilação emprega temperaturas de **80 a 85°C** por **10 a 12 minutos**.

Este experimento teve o objetivo de avaliar a relação Tempo/Temperatura suficiente para promover 100% de inativação das células de levedura.

1.4.1.1.1. Material e Métodos;

Para determinar o efeito da temperatura na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* RN1016 foram executados diferentes tratamentos em diferentes temperaturas. Para efeitos comparativos foram realizados ensaios paralelos da linhagem RN1016 com respectivos controles, conforme descrito abaixo.

Microrganismos

S. cerevisiae RN1016;

S. cerevisiae CEN.PK (controle parental não GM);

S. cerevisiae Pedra-2 (PE-2, comercial não GM).

Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado para crescimento das leveduras foi YPD 2%.

Composição: extrato de levedura, 10g/L; peptona, 20 g/L e glicose, 20 g/L. Para obter o respectivo meio sólido foi adicionado 20 g/L de ágar e foram oportunamente distribuídos em placas de Petri.

Inóculo

As linhagens de *S. cerevisiae* RN1016, CEN.PK e PE-2 foram reativadas a partir de culturas permanentes estocadas -80°C e propagadas em meio liquido YPD 2% a 250 rpm, 30°C até saturação celular (16 horas).

Ensaios

Em tubos de 250 µL foram adicionados 115 µL das culturas saturadas de *S. cerevisiae* RN1016, CEN.PK e PE-2 respectivamente. Os tubos com as culturas saturadas foram dispostos em termociclador devidamente programado, submetidos aos tratamentos detalhados na Tabela 1. Em seguida as culturas foram imediatamente dispostas (plaqueamento de superfície) em placas de Petri contendo meio YPD 2%. Antes do plaqueamento procedeu-se a diluição seriada das amostras para possibilitar a posterior contagem de colônias. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada linhagem avaliada. Após 48 horas de incubação em estufa a 30°C, as colônias de cada placa foram contabilizadas.

Tabela 1: Ensaios realizados para determinar o efeito da temperatura nas linhagens RN1016, CEN.PK e PE-2.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	30	0
2		45
3		90
4		135
5		180
6	60	45
7		90
8		135
9		180
10	70	45
11		90
12		135
13		180
14	80	45
15		90
16		135
17		180

1.4.1.1.2. Resultados;

O processo industrial para produção de etanol celulósico (2G) envolve múltiplas operações, sendo uma destas a “destilação”. A destilação é uma operação unitária que permite a separação do etanol do vinho fermentado obtido após a finalização da fermentação. No processo industrial a fermentação será realizada pela levedura geneticamente modificada RN1016.

O vinho produzido após a fermentação é constituído basicamente por água, etanol, lignina, levedura e outros resíduos de açúcares e subprodutos da fermentação. Assim, este vinho entra na coluna de destilação, onde o etanol é separado do restante dos componentes por evaporação. A vinhaça gerada é então filtrada e a lignina retida nos filtros, juntamente com a maior parte dos resíduos celulares, é levada às caldeiras para queima e geração de vapor.

A temperatura dentro da coluna de destilação atinge entre 80 a 85°C durante um tempo de residência de aproximadamente 10 a 12 minutos. Neste ponto a levedura geneticamente modificada RN1016 presente no vinho

também é submetida às altas temperaturas de destilação, onde a carga microbiológica viável é completamente eliminada.

Nestes ensaios, as culturas de células das linhagens RN1016, CEN.PK e PE-2 foram submetidas a temperaturas adjacentes às temperaturas que ocorrem na coluna de destilação (60 e 70°C), à própria temperatura de destilação (80°C) e uma temperatura controle (30°C). Os resultados destes ensaios são sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito da temperatura no número de células por mililitro.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Número de células/mL *		
			RN1016	CEN.PK	PE-2
1	30	0	9.40E+07	9.99E+07	9.07E+07
2		45	1.09E+08	1.01E+08	9.73E+07
3		90	9.80E+07	1.10E+08	1.06E+08
4		135	1.04E+08	9.89E+07	9.13E+07
5		180	1.20E+08	9.73E+07	9.60E+07
6	60	45	0	20000	0
7		90	0	0	0
8		135	0	0	0
9		180	0	0	0
10	70	45	0	0	0
11		90	0	0	0
12		135	0	0	0
13		180	0	0	0
14	80	45	0	0	0
15		90	0	0	0
16		135	0	0	0
17		180	0	0	0

*, A estimativa da concentração de células corresponde a média da triplicata executada para cada ensaio.

Na Tabela 2 é possivel observar que o tratamento com temperatura de 60°C por 90 segundos (1,5 minuto) é suficiente para reduzir a zero o número de unidades formadoras de colônia (UFC). Nestas condições, bem como nas seguintes com maior relação Tempo/Temperatura, não observou-se colônias nas placas. A partir da temperatura de 70°C não foi observado UFC nos diferentes tempos avaliados, partindo de 45 segundos, mesmo com o plaqueamento de todo o conteúdo dos tratamentos, sem diluição (Figuras 4 a 6).

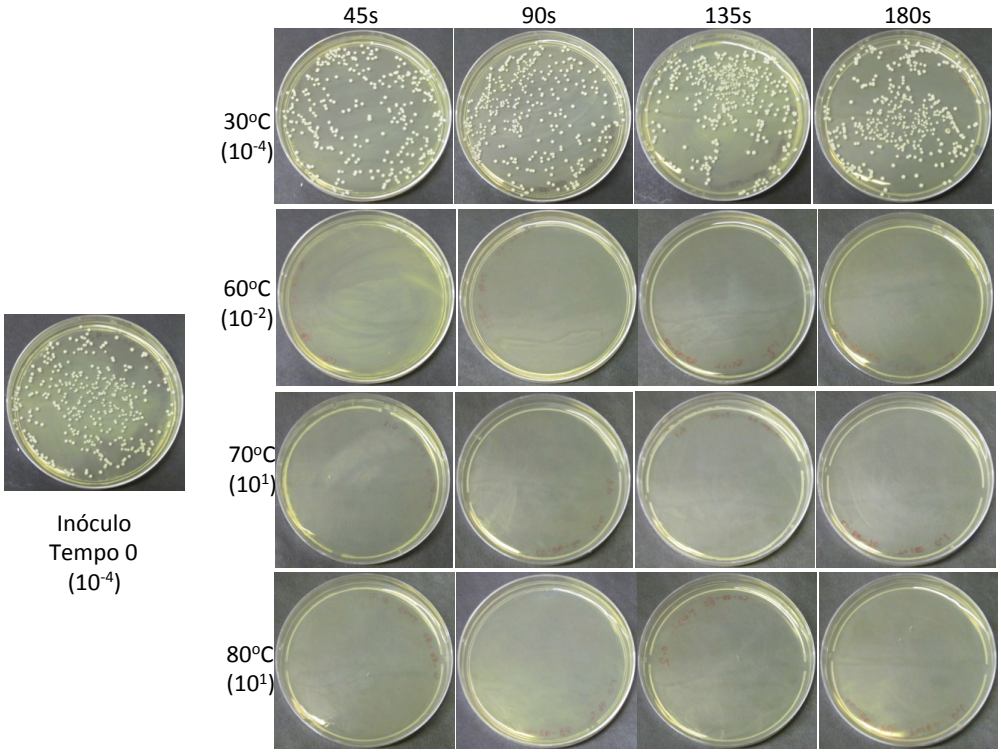

Figura 4. Placas de RN1016 que receberam as suspensões celulares submetidas aos tratamentos de Tempo *versus* Temperatura. Tratamento **RN1016**. Em parênteses a diluição empregada antes da disposição nas placas para possibilitar a contagem de UFCs.

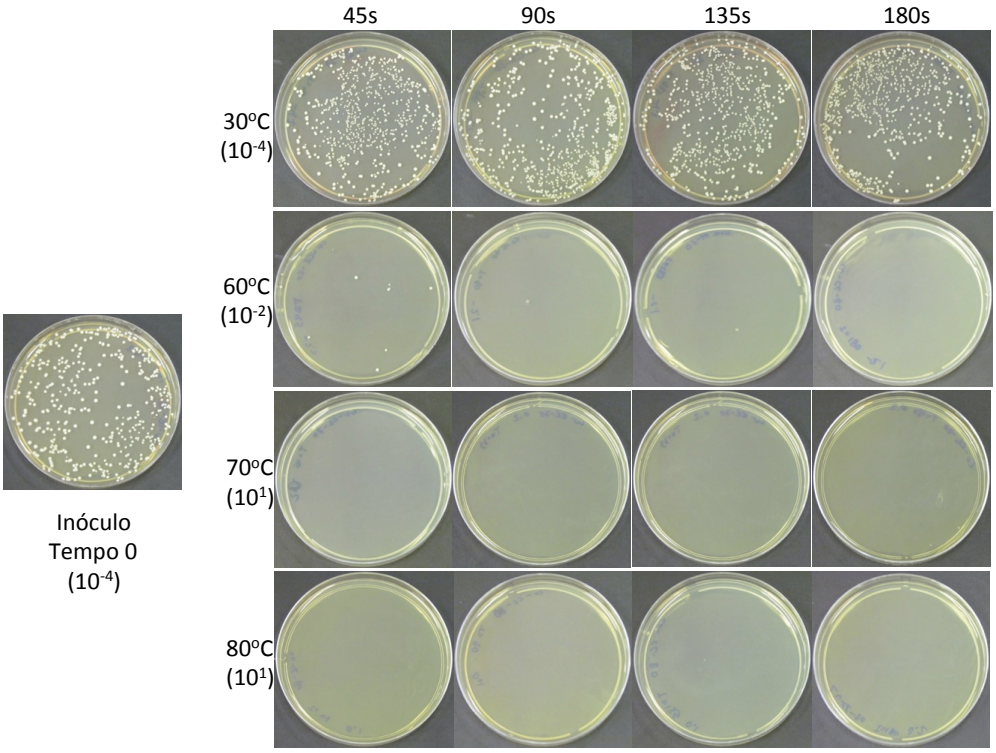

Figura 5. Placas e CEN.PK que receberam as suspensões celulares submetidas aos tratamentos de Tempo *versus* Temperatura. Tratamento **controle CEN.PK**. Em parênteses a diluição empregada antes da disposição nas placas para possibilitar a contagem de UFCs.

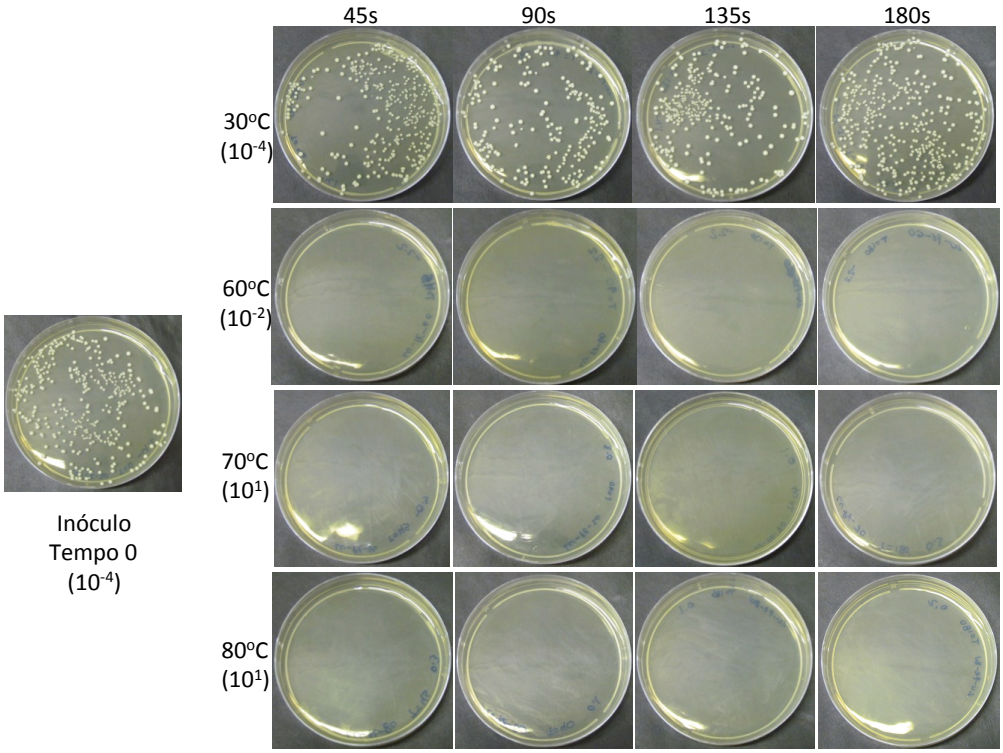

Figura 6. Placas de Pedra-2 que receberam as suspensões celulares submetidas aos tratamentos de Tempo *versus* Temperatura. Tratamento **controle comercial Pedra-2**. Em parênteses a diluição empregada antes da disposição nas placas para possibilitar a contagem de UFCs.

A Figura 7 fornece uma representação gráfica da viabilidade celular, medida pela formação de colônias (UFCs), das linhagens de levedura RN1016, controle parental CEN.PK e controle comercial Pedra 2 após tratamentos térmicos por diferentes intervalos de tempo.

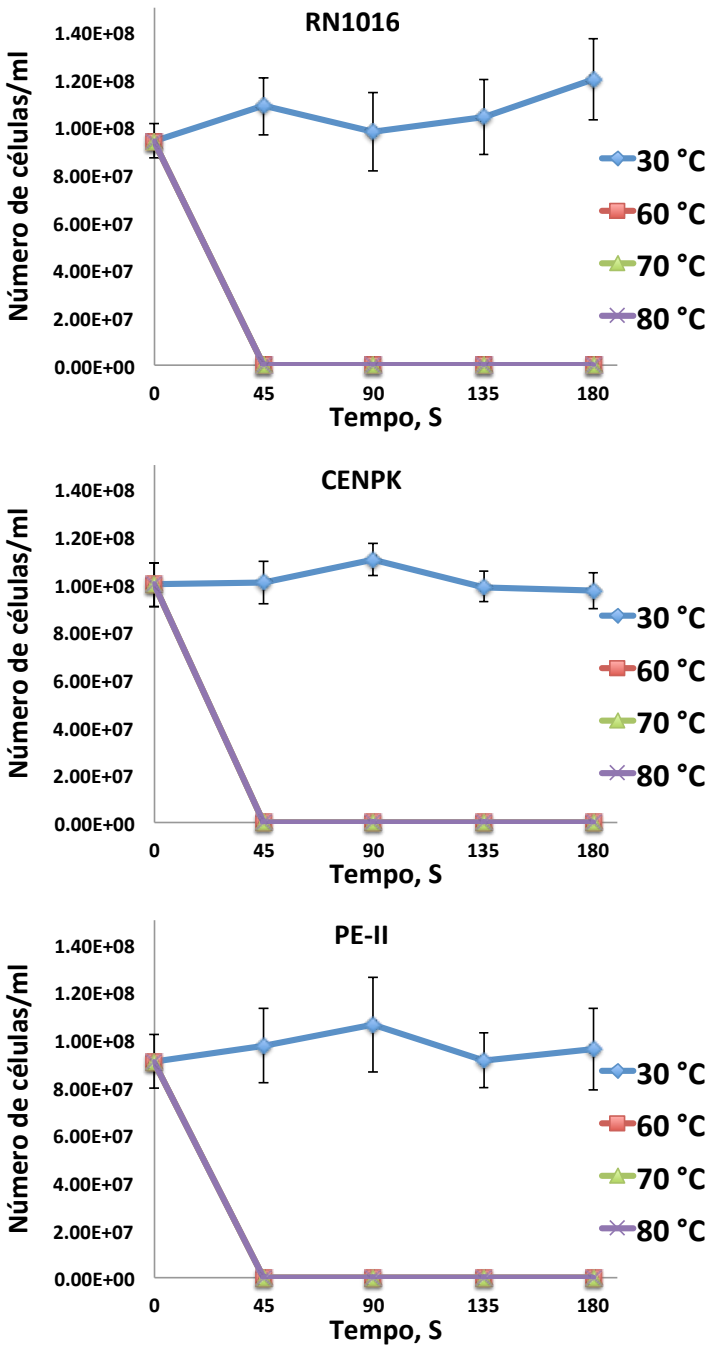

Figura 7. Efeito dos tratamentos de Tempo X Temperatura no número de células viáveis de levedura por mililitro.

Os resultados apresentados demonstram que tratamentos térmicos a partir de 60°C por 90 segundos (1,5 minuto) são suficientes para promover a inativação de 100% das células da levedura RN1016, bem como dos controles parental e comercial não GM.

1.4.1.2. Avaliação da temperatura na viabilidade celular da Levedura RN1016. (Experimento 2 – DSM N.V. in Heerlen. Delft / Holanda);

O processo de destilação é a etapa destinada à separação do etanol dos demais componentes do mosto fermentado. Como mencionado anteriormente, esse processo é dependente de temperatura. O tempo de retenção do produto da fermentação no interior do destilador é de aproximadamente 10 a 12 minutos. Tendo isso em vista, um teste de avaliação do efeito de diferentes temperaturas ao longo do tempo foi conduzido pelo período de 10 minutos, com diversas amostragens ao longo desse tempo. Neste experimento considerou-se também o pH da solução, que foi ajustado para a média de pH encontrado no processo fermentativo da Usina de etanol celulósico.

Dessa forma, pode-se visualizar o efeito da temperatura na viabilidade celular ao longo do tempo de destilação.

1.4.1.2.1. Materiais e Métodos;

Os inóculos de leveduras foram obtidos através de 24 horas de cultivo semi-anaeróbico utilizando meio de cultivo YPD sob agitação constante. As células foram precipitadas por leve centrifugação e transferidas para frascos plásticos contendo meio de cultura aquecido, obtendo-se a concentração final celular de 1g/L. Em seguida as culturas foram submetidas aos tratamentos térmicos em banho-maria com temperatura pré-ajustada. Para minimizar o efeito da elevação gradual da temperatura do meio, utilizou-se meio de cultura pré-aquecido para ressuspensão das células.

Amostras dos diferentes tratamentos foram aliquotadas (0,5mL) e utilizadas para a o preparo de diluições seriadas. Estas diluições foram plaqueadas em meio de cultivo semi-sólido e as placas da maior diluição que continham número de colônias superior a 50 foram selecionadas para contagem.

A metodologia do estudo é detalhada na Figura 8.

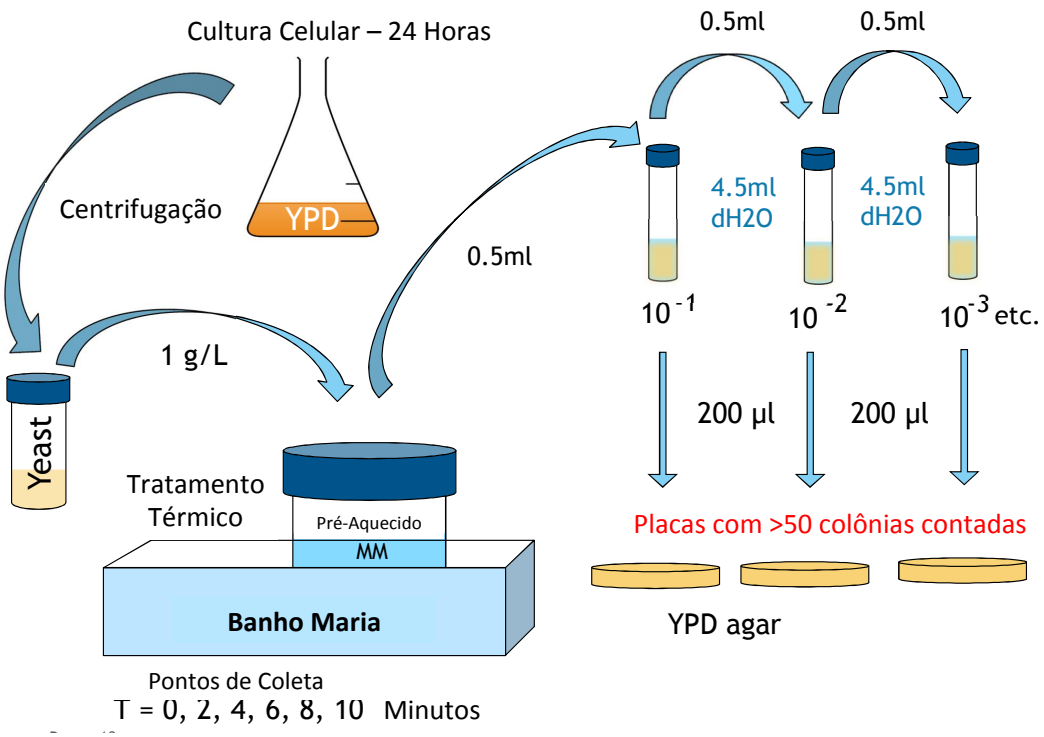

Figura 8. Esquema da metodologia utilizada no experimento em questão.

Tratamentos

A substância avaliada neste experimento foi a linhagem de levedura RN1016, objeto deste relatório de biossegurança.

As culturas foram submetidas a 8 tratamentos térmicos pelo período de 10 minutos, considerando que este é o tempo mínimo de retenção durante o processo industrial de destilação. Utilizou-se pH 5,0 no meio de cultura dos tratamentos, considerando também o pH do mosto submetido à destilação no processo industrial.

Durante o período de incubação foram amostradas alíquotas a cada 2 minutos, partindo do tempo 0 (zero) até o tempo 10 minutos. A Tabela 3 resume os tratamentos térmicos avaliados e os tempos de coleta das amostras.

Tabela 3. Relação de tratamentos térmicos, tempo de incubação, tempos de coleta e pH do meio de cultivo.

Meio	Temperatura ºC	Tempo Incubação (min)	Amostras (min)	pH
YPD	32	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5
	50	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5
	53	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5
	55	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5
	58	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5
	60	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5
	62	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5
	70	10	0, 2, 4, 6, 8, 10	5

1.4.1.2.2. Resultados;

O presente experimento teve o objetivo de determinar o tempo suficiente para promover a inativação das células de levedura nas diferentes condições de temperatura, considerando tempo e pH equivalentes aqueles aplicados no processo industrial.

As observações de contagem celular foram dispostas em forma de gráfico para visualização dos resultados, obtendo-se uma curva de decaimento da viabilidade celular para cada temperatura avaliada. O gráfico pode ser visualizado na Figura 9.

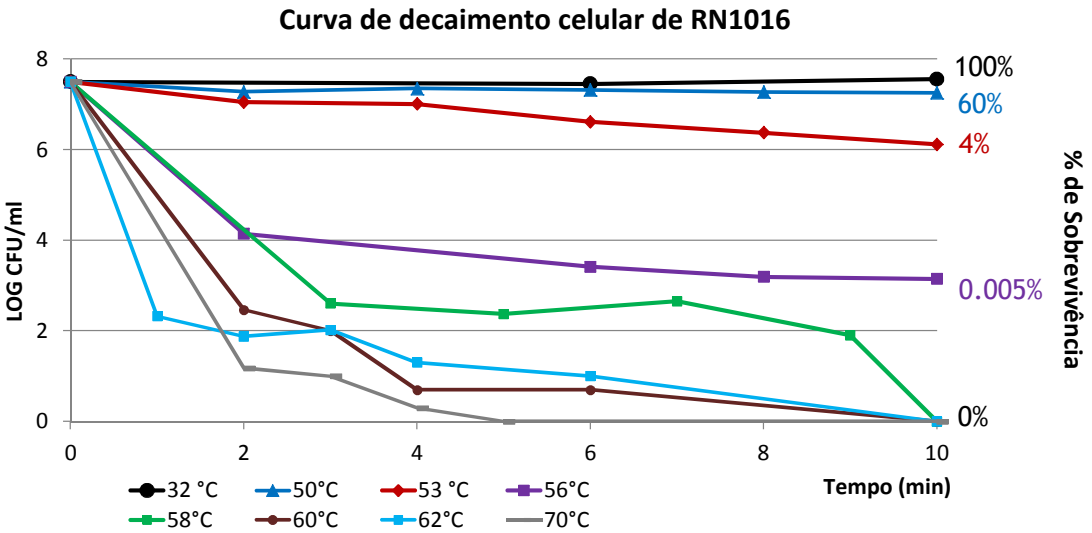

Figura 9. Gráfico de decaimento da viabilidade de RN1016 submetida a diferentes condições de temperatura.

De acordo com os dados apresentados na Figura 9, observa-se que após 2 minutos à temperatura de 56°C a viabilidade celular da Levedura RN1016 é bastante reduzida, atingindo um nível de aproximadamente 0,005% de sobrevivência. Quando submetida às temperaturas de 58, 60 e 62°C por cerca de 3 minutos as amostras já atingem níveis muito baixos de sobrevivência, inferiores a 0,005%. Analisando a curva referente ao tratamento de 70°C observa-se que em apenas 2 minutos de tratamento térmico as leveduras são quase totalmente inviabilizadas, o que é finalmente é observado após 5 minutos a 70°C.

Com relação ao experimento anterior, utilizou-se neste estudo um volume maior de cultura (5mL), e por este motivo obteve-se melhor resolução quanto ao efeito da temperatura na viabilidade celular de RN1016. Em ambos os casos observamos que a temperatura de 60°C por um tempo inferior a 2 minutos é suficiente para reduzir drasticamente a viabilidade celular de RN1016.

1.4.1.2.3. Conclusões finais;

Em conjunto, os experimentos apresentados neste tópico demonstram que células viáveis da levedura RN1016 atingem níveis quase indetectáveis quando submetidas a temperaturas de aproximadamente 60°C por até 2 minutos. Nos 10 minutos correspondentes ao processo de destilação temperaturas inferiores a 60°C foram suficientes para inativar completamente as culturas celulares de RN1016. O mesmo comportamento em resposta a temperatura foi observado com as linhagens CEN.PK (controle parental não GM) e Pedra-2 (controle comercial selvagem). Dessa maneira, as temperaturas de 80 a 85°C utilizadas no processo industrial garantem a completa eliminação das células de leveduras.

A destilação é a etapa responsável pela separação do etanol do restante do mosto fermentado. Trata-se de um processo térmico bem estabelecido, no qual a substância composta fica retida no destilador por 10 a 12 minutos. A temperatura empregada no processo de destilação é de 80 a 85°C, sendo suficiente para evaporação do etanol que tem ponto de ebulição de aproximadamente 78,4°C.

Conclui-se que esta etapa é suficiente para inviabilizar com total segurança todas as células que participaram da fermentação, não havendo mais OGM viável a partir desta etapa do processo.

2. A 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;

Classificação taxonômica completa:

Domínio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Saccharomycetes

Ordem: Saccharomycetales

Família: Saccharomycetaceae

Gênero: *Saccharomyces*

Espécie: ***Saccharomyces cerevisiae***

Classificação pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI):

Traduzido de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Saccharomyces cerevisiae

ID: 4932
Nome comum Genbank: **baker's yeast** (levedura de panificação)

nome comum: Levdura

Eukaryota;
Fungi;
Dikarya;
Ascomycota;
Saccharomycotina;
Saccharomycetes;
Saccharomycetales;
Saccharomycetaceae;
Saccharomyces.

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

O único gene exógeno introduzido na levedura *S. cerevisiae* para obtenção do evento RN1016 foi o gene *XylA*, oriundo do microrganismo não patogênico *Piromyces sp*., codificador da enzima xilose isomerase. Outras modificações genéticas foram feitas de modo a aumentar a expressão de genes endógenos da levedura para maximizar a eficiência do processo fermentativo. Estas modificações são detalhadas no ítem 3.3.

3.1. A xilose isomerase;

Xilose isomerase, também denominada de glicose isomerase, (XI, D-xilose isomerase, EC 5.3.1.5) catalisa a reação reversível de D-xilose a D-xilulose (Figura 10). Essa enzima tem sido foco de grupos de pesquisa, visto que também catalisa a isomerização de D-glicose e D-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) (van Maris *et al*., 2007).

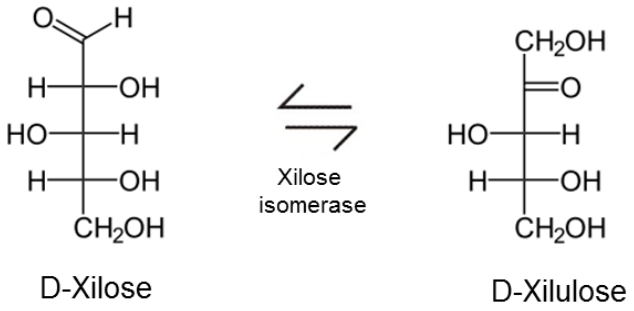

Figura 10. Isomerização reversível de D-xilose a D-xilulose, catalisada pela enzima xilose isomerase.

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 significante. Na época, a produção dessa enzima requeria xilose no meio de cultivo e melhores resultados eram alcançados na presença de arseniato. O processo de

isomerização foi realizado em escala industrial pela primeira vez em 1967 pela Clinton Corn Processing Co. nos EUA e sua forma imobilizada foi lançada comercialmente em 1974. Com uma demanda cada vez maior, e impulsionada pelo crescente mercado de HFCS, a produção dessa enzima comanda hoje uma enorme parcela na indústria de alimentos (Bhosale *et al*., 1996). 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 de XI de diversos microrganismos têm sido extensivamente estudadas. Tais pesquisas forneceram a descrição de um grande número de estruturas de XI e de sequências dos genes que codificam essa enzima em diversos organismos. Adicionalmente, seu mecanismo catalítico foi investigado, assim como novas descobertas envolvendo estruturas relacionadas à sua termoestabilidade foram obtidas na últimas duas décadas (Vieille *et al.*, 1995; Chang *et al*., 1999). Abaixo estão descritas importantes características dessa enzima, revisadas por Bhosale (1996):

- **Afinidade por substratos**: a enzima é capaz de isomerizar substratos específicos como principalmente a glicose e a xilose, e também a D-ribose, L-arabinose, L-ramnose, D-alose e 2-deoxiglicose. A isomerização máxima é obtida em substratos que possuem grupos hidroxila nos carbonos 3 e 4, como glicose e xilose, sendo que os valores de K_m descritos, para esses respectivos açúcares, variam de 0,086 a 0,920 M e 0,005 a 0,093 M.
- **Cofatores e inibidores**: XI requerem cátions divalentes 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 lixose.
- **Temperatura e pH**: a temperatura ótima da maior parte das XI varia entre 60 e 80ºC e aumenta na presença de Co^{2+}. O pH ótimo de ação dessa enzima, em sua maioria, varia entre 7 e 9.

Xilose isomerases, em geral, tem maior *Km* (constante de Michaelis-Menten) e menor *Kcat* (constante catalítica) para D-glicose do que para D-

xilose (Chang *et al*., 1999). A linearização e isomerização de D-xilose a D-xilulose ou da D-glicose a D-frutose ocorre no sítio ativo da xilose isomerase e requer uma transferência de hidrogênio entre os carbonos C1 e C2 do substrato. Evidências experimentais suportam um mecanismo de 2 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 Lys-182, His-53 e Asp-56 teriam um importante papel na abertura do anel. O sítio ativo é formado pelos resíduos Asp-56, 216, 244, 254, 256 e 286, His-53 e 219, Glu-180 e dois cátions divalentes como cofatores (Meilleur *et al*., 2006). Sequências de xilose isomerases apresentam sítio catalítico e regiões de ligação a cátions bem conservados.

Uma comparação de sequências de XI de diferentes organismos revelam que os números de resíduos de asparagina e glutamina diminuem com o aumento da termoestabilidade da enzima, presumidamente como estratégia para diminuir o potencial para desnaturação através de desaminação em altas temperaturas (Vieille *et al*., 1995).

Baseado em sequências de nucleotídeos, xilose isomerases são divididas em duas famílias: a família I inclui *XylA* de *Thermus* sp. e *Actinomycetes*, tem gene com conteúdo rico em GC e são 40 a 50 resíduos mais curtas na extremidade N-terminal. A família II tem baixo conteúdo GC, com extensão na região N-terminal e formam um grupo mais heterogêneo, agrupando *XylA* de muitas bactérias e eucariotos (Vieille *et al*., 1995; Madhavan *et al*., 2009).

Utilizando tal classificação, uma variedade de sequências de XI já foram descritas (Sanchez & Smiley, 1975; Callens *et al*., 1986; Lehmacher & Bisswanger, 1990; Kawai *et al*., 1994; Chandrakant & Bisaria, 2000; Brat *et al*., 2009). Como exemplo, o gene *XylA* do hipertermófilo *Thermotoga neapolitana* 5068 codifica um polipeptídeo de 444 resíduos, com peso molecular de 50,892 kDa e pertencente a família II de XI. A enzima nativa é um homotetrâmero, com peso molecular de 200 kDa e estável a altas temperaturas com atividade ótima de 95ºC e máxima atividade em pH 7,1 (Vieille *et al*., 1995).

O gene que codifica a XI está amplamente distribuído na natureza, principalmente em microrganismos procariotos, ocorrendo também em plantas, fungos e animais.

Após a sua descoberta em *Pseudomonas hydrophila*, um grande número de XI foram descobertas. A árvore filogenética abaixo (Figura 11) fornece uma boa indicação da diversidade e das relações filogenéticas entre as sequências de diferentes organismos. Animais e plantas estão agrupados nesta análise filogenética, formando *clusters* específicos, onde *Piromyces* sp. representa a espécie de fungo utilizada nessa análise. Essa análise demonstra a similaridade da proteína introduzida na levedura RN1016 com enzimas que ocorrem amplamente na natureza, entre animais e plantas, sem histórico de efeitos indesejados ou atividade alergênica.

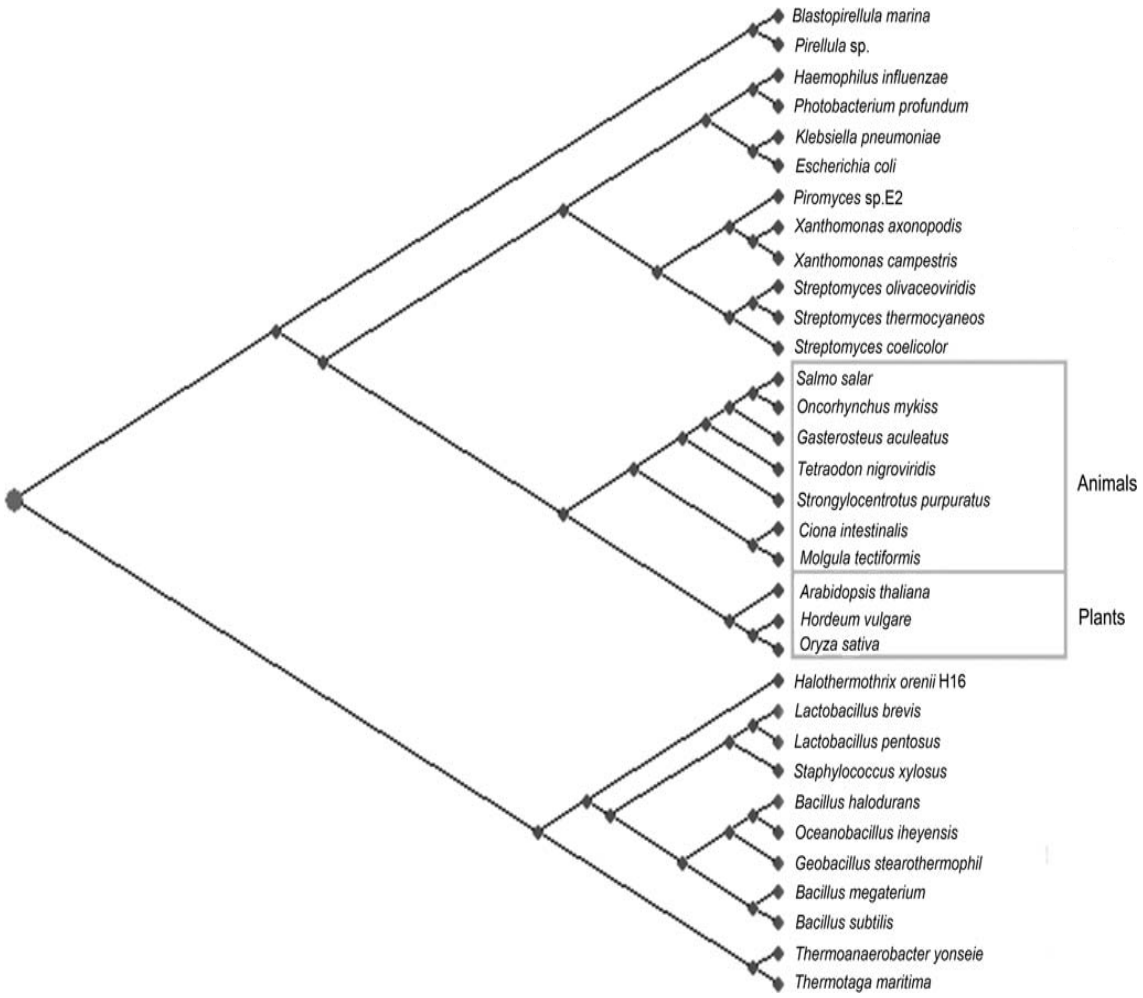

Figura 11. Inferência filogenética de xiloses isomerases de diferentes espécies. Animais e plantas estão destacados. A XI de *Piromyces* sp. E2 é a espécie de fungo utilizada na análise (Ding *et al*., 2009).

Grandes esforços têm sido dedicados em novos *screenings* e engenharia de proteínas para obter XI com atividades em temperaturas mais elevadas, visando aplicação na indústria de HFCS. Estratégias envolvendo adaptação e evolução dirigida de XI têm sido extensivamente empregadas, visando obter enzimas que apresentem maior atividade e termoestabilidade (Löon *et al*., 2002; Sriprapundh *et al*., 2003; Lee *et al*., 2012). Patel (2012) modificou o sítio catalítico da enzima, resultando na alteração da especificidade pelo substrato, aumentando a afinidade por D-lixose, L-arabinose e D-manose.

Outro foco de grande interesse, que diz respeito a esse documento, é a utilização da xilose isomerase como ferramenta na conversão de xilose em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O foco de estudo em engenharia metabólica de leveduras para utilização de xilose está concentrado em duas vias, que consistem na conversão de D-xilose a D-xilulose: a via Xilose Redutase – Xilitol Desidrogenase (XR-XDH) e a via Xilose Isomerase (XI). A via XR-XDH, presente em microrganismos eucariotos, consiste em duas reações de oxi-redução, mediada por NADPH/NADH e NAD+ respectivamente, levando a um desbalanço de cofatores e acúmulo de produtos secundários não desejados, tornando a via de xilose isomerase uma alternativa mais interessante.

A interconversão xilose a xilulose ocorre em um único passo na via da xilose isomerase (XI), evitando o desbalanço redox e a formação de subprodutos que diminuem o rendimento de etanol.

Por várias décadas, diversas tentativas de expressão heteróloga de XI bacterianas em *S. cerevisiae* não foram bem sucedidas. A tentativa de expressão do gene *XylA* 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 empacotamento da enzima, valor de pH intracelular sub-ótimo e a falta de cofatores específicos (Sarthy *et al*., 1987). Posteriormente, as tentativas de expressar as XI de *Clostridium thermosulfurogenes* (Moes *et al*.,1996), *Bacillus subtilis* e *Actinoplanes missouriensis* (Amore *et al*., 1989) também falharam em produzir uma enzima ativa em *S. cerevisiae* (van Maris *et al*., 2007). 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. A 85°C, a atividade dessa enzima foi superior a 1,0 µmol (mg proteína)$^{-1}$ min^{-1}, enquanto que a 30°C a atividade foi de apenas 0,04 µmol (mg proteína)$^{-1}$ min^{-1} (Walfridsson *et al*., 1996).

Sendo *S. cerevisiae* um microrganismo mesofílico, com pH citosólico levemente abaixo de 7 e temperatura ótima de crescimento em torno de 30ºC, a expressão heteróloga de genes que codificam XI nessa levedura tende a não alcançar atividade ótima, considerando as características dessa enzima descritas anteriormente (van Maris *et al*., 2007). Dessa maneira, as XI pertencentes aos fungos anaeróbicos *Piromyces* sp e *Orpinomyces* sp, por apresentarem atividade em temperaturas mais baixas, se mostram como duas alternativas promissoras para expressão em *S. cerevisiae* (Harhangi *et al*., 2003; Madhavan *et al*., 2009).

Estes fungos fazem parte da microflora ruminal de herbívoros e atuam na digestão de biomassa celulósica e hemicelulósica dentro do hospedeiro. Pertencem a família *Neocallimastigaceae*, com seis gêneros descritos denominados *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces* (Nicholson *et al*., 2005). Altas atividades específicas para celulases e hemicelulases presentes no rumem de herbívoros tem atraído grande atenção para a descoberta de novas potenciais enzimas de aplicação industrial (Qiu *et al*., 2000; Harhangi *et al*., 2003; Steenbakkers *et al*., 2008).

O polipeptídeo deduzido a partir da sequência de XI de *Piromyces* possui massa molecular de 49,4 kDa e pI calculado de 5,2. A atividade dessa enzima apresentou altos valores em frutose e xilose, correlacionando aos valores de mRNA obtidos. Interessantemente, a adição de íons Co^{2+} não influenciou o comportamento da enzima (Harhangi *et al*., 2003). A descrição da XI de *Orpinomyces* apresentou todos os resíduos de catálise e ligação ao substrato bem conservados. Os resíduos His-102, Asp-105 e Asp-340 constituem a tríade diretamente envolvida na catálise. Lys-235 desempenha tanto um papel estrutural quanto funcional na isomerização, e os resíduos 187-196 e 231-239, característicos de xiloses isomerases descritas, também são conservados. A subunidade é possivelmente um homodímero e possui

massa molecular de aproximadamente 49,4 kDa, com atividade máxima em pH 7.5 e temperatura ótima de 37ºC.

Tabela 4. Atividade específica e máxima taxa de crescimento para XI clonadas em *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Parachin & Gorwa-Grauslund, 2011).

Fonte da XI	Atividade (U/mg proteína)	Taxa de crescimento em xilose em aerobiose (hora^{-1})
Piromyces sp.	0,3 a 1,1	0,22
Piromyces sp.[c]	0,5 a 0,8	0,02
Orpinomyces sp.	1,6	0,01
Xanthomonas campestris	0,016	0,02
Bacteroides thetaiotaomicron	0,14	n.m.
Clostridium phytofermentans[c]	0,0344	0,057
Clostridium thermosulfurogenes	n.m.	n.d.
Escherichia coli	n.m.	n.d.
Bacillus subtilis	n.m.	n.m.
Lactobacillus pentosus	n.d.	n.d.
Thermus thermophilus	0,0007 a 0,012	n.m.

n.m., não medido; n.d., não detectado. [c]Códon otimizado para *S. cerevisiae.*

Em 2003, após a descoberta da sequência de xilose isomerase no fungo anaeróbio *Piromyces* sp. (Kuyper *et al*., 2003), os autores do estudo obtiveram linhagens de *S. cerevisiae* capazes de crescer em xilose como única fonte de carbono. A expressão desse gene em *S. cerevisiae* resultou em valores de atividade superiores a 1,1 µmol (mg.proteína)$^{-1}$.min^{-1}. A utilização desses mutantes em procedimentos de engenharia metabólica e evolutiva permitiu a obtenção de linhagens de *S. cerevisiae* com alta atividade dessa enzima, obtendo-se maior rendimento na produção de etanol e menor produção e acúmulo de metabólitos intermediários (Kuyper, 2004, 2005a, 2005b). Madhavan (2009) expressaram funcionalmente a xilose isomerase de *Orpinomyces* sp. em *S. cerevisiae*, que divide 94% de identidade com a sequência de *Piromyces*, alcançando altos valores de atividade e eficiente rendimento de etanol.

Atualmente diversos estudos discutidos ao longo desse documento demonstram a viabilidade da utilização da xilose isomerase em *S. cerevisiae* para utilização na indústria de etanol celulósico (2G).

3.2. O organismo de origem: *Piromyces* sp.;

As descobertas sobre a capacidade de microrganismos que habitam o trato digestivo de animais herbívoros de degradar componentes da biomassa vegetal ocorreu a quase duas centenas de anos atrás, com destaque para os trabalhos de Sprengel (1832). Hoje sabe-se que diversos fungos e bactérias anaeróbicas são organismos simbiontes, contribuindo de forma substancial para a digestão e o aproveitamento de polímeros vegetais, que constituem a parte principal da dieta dos animais herbívoros (Trinci *et al*., 1994).

Foi somente em 1975 que fungos anaeróbicos foram identificados e reconhecidos como parte integral da microbiota do rumem (Orpin, 1975). Muitas características como ciclo de vida, estrutura reprodutiva e vegetativa mostraram que são mais relacionados ao filo *Chytridiomycota* do que qualquer outro grupo de fungos. Dados moleculares (18S rRNA) reforçaram essa teoria, embora estudos morfológicos identificaram características únicas nesse grupo, levando a formação da nova ordem *Neocallimastigales* (Ho *et al*., 2000). Foram então integrados na classe *Chytridiomycetes*, ordem *Neocallimastigales* e classificados na família *Neocallimasticaceae* baseada na estrutura dos zoósporos (Barr, 1988), sendo seis gêneros descritos com base no número de flagelos presentes no zoósporo, morfologia e desenvolvimento do talo e ultraestrutura dos zoósporos. São eles: *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces* (Ho *et al*, 2000; Nicholson *et al*., 2005). Acredita-se que são derivados de *Chytridiomycotas* que adquiriram a habilidade de sobreviver às condições anaeróbicas do trato digestivo de ruminantes. A ausência de mitocôndria e presença de hidrogenossomas são adaptações à anaerobiose, bem como a superfície dos zoósporos é provavelmente uma adaptação às severas condições encontradas no rumem (Ho *et al*, 2000).

Todas as espécies de fungos anaeróbios têm dois estágios em seus ciclos de vida, um estágio móvel zoospórico e um estágio não móvel vegetativo que produz um (monocêntrico) ou vários (policêntrico) zoósporos (Theodorou *et al*., 1992). A classificação como monocêntricos e policêntricos é baseada no número de núcleos presentes no organismo e na presença ou ausência de núcleos no rizomicélio. Fungos monocêntricos, como *Piromyces*,

não tem núcleo no rizomicélio, enquanto fungos policêntricos possuem vários. *Piromyces* possui ciclo de vida assexuado e varia de 24-32 horas de duração (Ho *et al*., 2000; Harhangi, 2002).

Piromyces possui ciclo de vida similar a outros fungos anaeróbios derivados do rumem (Ho *et al*., 2000). Os zoósporos desse microrganismo possuem flagelo, permitindo a locomoção por quimiotaxia (Orpin & Bountiff, 1978). Ao estabelecer contato com o material celulósico, os zoósporos perdem seu flagelo e um rizóide é formado, penetrando na parede celular e liberando enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (revisado por Harhangi, 2002). Os zoósporos de *Piromyces* assim como de *Caecomyces* são uniflagelados, mas diferenciam-se pelo sistema rizoidal (Ho *et al*., 2000).

Griffith e colaboradores (2009) revelaram que entre os seis gêneros de fungos anaeróbios, os policêntricos *Orpinomyces* e *Anaeromyces* são os mais abundantes, representando 60% das observações, enquanto os monocêntricos *Neocallimastix* e *Piromyces* correspondem a menos de 10% do total. Recentemente, Kittelmann (2012) descreveu uma diversidade de fungos anaeróbios maior do que a previamente reportada. O sequenciamento e análise de 53 amostras de rumem de diferentes organismos revelaram a presença dos gêneros previamente descritos e o agrupamento de quatro novos clados foram obtidos, sugerindo novos gêneros ou espécies não descritas.

Fungos anaeróbios estritos desempenham um papel essencial no rumem pela quebra enzimática dos polissacarídeos da parede celular vegetal, fornecendo nutrientes ao hospedeiro e garantindo a sua sobrevivência. Altas atividades específicas detectadas para celulases e hemicelulases presentes no rumem de herbívoros tem atraído grande atenção para a descoberta de novas potenciais enzimas de aplicação industrial (Qiu *et al*., 2000; Harhangi *et al*., 2003; Steenbakkers *et al*., 2008).

A xilose isomerase presente na RN1016 foi obtida a partir do fungo anaeróbio *Piromyces* sp. E2 (ATCC 76762). A escolha pelo estudo desse organismo se deu pela alta capacidade de degradar celulose e hemicelulose, sugerindo a presença de genes relacionados também ao metabolismo de xilose (Harhangi, 2002; Harhangi *et al*., 2003). Esse microrganismo é um simbionte de seu hospedeiro, não apresentando nenhuma característica de

patogenicidade em relação ao ruminante ou a outros organismos. O gene *XylA* isolado de *Piromyces* está relacionado apenas ao metabolismo de carboidratos, não tendo nenhuma relação a mecanismos de patogenicidade.

O microrganismo *Piromyces* sp. E2 (ATCC 76762) não apresenta histórico de efeitos indesejados à saúde humana, animal ou ao meio ambiente.

3.3. Outras modificações genéticas;

Além da introdução do gene exógeno *XylA*, descrita em detalhes a seguir (item 6), outras modificações genéticas foram produzidas de modo a aumentar a expressão de genes nativos de *S. cerevisiae*, bem como a deleção de um gene. Essas modificações compreenderam três principais estratégias: i- aumento da expressão do gene *XKS1*; ii- aumento da expressão de quatro genes da via das pentose fosfato; iii- deleção do gene *GRE3*. A Tabela 5 lista os genes da levedura que foram alvo das modificações genéticas.

Tabela 5. Lista das modificações genéticas empregadas na linhagem RN1016 sem introdução de sequências exógenas.

Gene	Promotor derivado	Modificação de interesse	Organismo de origem
XKS1 - Xiluloquinase	*ADH1*	Aumento da Expressão	*S. cerevisiae*
TKL1 - Transcetoaldolase	*TPI1*	Aumento da Expressão	*S. cerevisiae*
TAL1 - Transaldolase	*TPI1*	Aumento da Expressão	*S. cerevisiae*
RPE1 - D-ribulose-5-fosfato 3-epimerase	*TPI1*	Aumento da Expressão	*S. cerevisiae*
RKI1 - Ribose-5-fosfato ceto-isomerase	*TPI1*	Aumento da Expressão	*S. cerevisiae*
GRE3 - Aldose redutase		Deleção	*S. cerevisiae*

Os genes que tiveram o nível de expressão elevada participam do metabolismo de açúcares da célula. Dessa maneira, é esperado que o processo de conversão de açúcares em etanol desta linhagem ocorra de forma mais eficiente.

O gene *XKS1*, que codifica a enzima xilulokinase (EC 2.7.1.17), é responsável pela conversão de xilulose em xilulose 5-fosfato, que é então posteriormente metabolizada pela via das pentoses fosfato até a molécula gliceraldeído 3-fosfato (Figura 12).

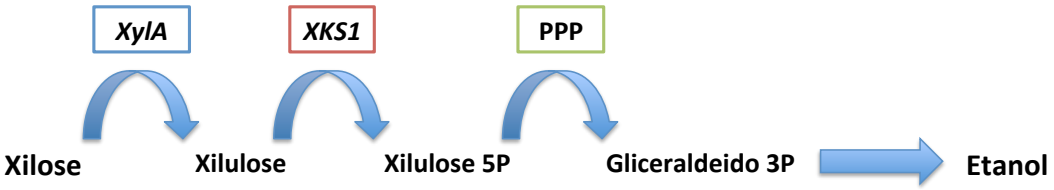

Figura 12. Via metabólica simplificada da conversão de xilose em etanol. *XylA*: xilose isomerase; *XKS1*: xiloquinase; PPP: via das pentose fosfato (*Pentose Phosphate Pathway*), representado pelos genes *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1*.

Para a construção do cassete de expressão, foram utilizados dois plasmídeos. O plasmídeo pRS415ADHXKScyc contém o gene *XKS1*, juntamente com o promotor de *ADH1* e o terminador de *CYC1*, e o gene *LEU2*, todos derivados de *S. cerevisiae* (Figura 13) (Kuyper *et al*., 2005).

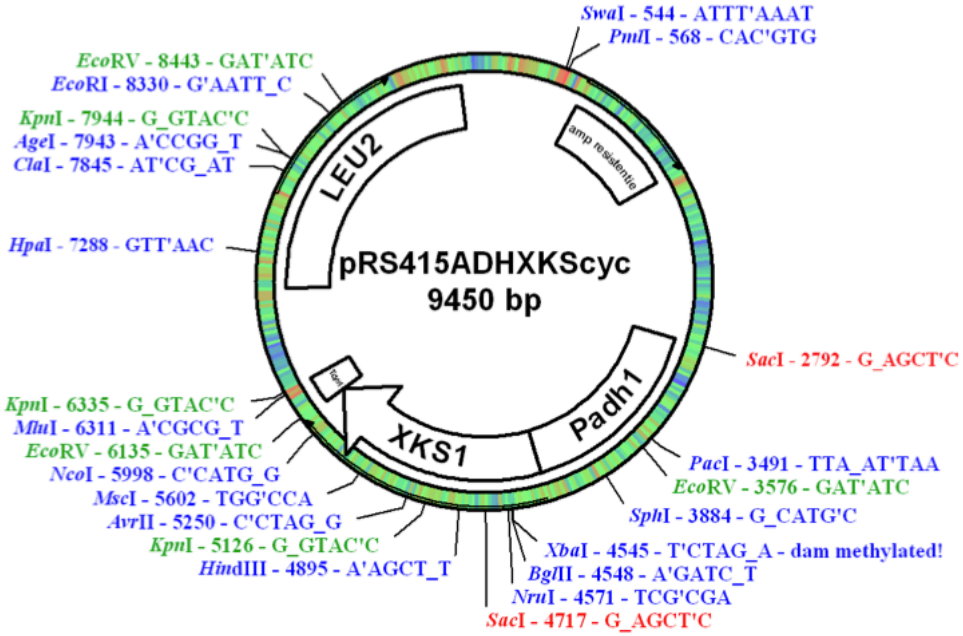

Figura 13. Mapa gênico do plasmídeo pRS415ADHXKScyc utilizado para o aumento da expressão de *XKS1*.

As sequências de Ty1, utilizadas como região de homologia para integração no genoma, foram obtidas a partir de um segundo plasmídeo, o pRN2delta. O uso destas sequências Delta de Ty1 como sítios de integração são frequentemente descritos na literatura.

As regiões de interesse do plasmídeo pRS415ADHXKScyc foram amplificadas por PCR utilizando iniciadores contendo sítios de clivagem para

determinadas enzimas de restrição (Tabela 6). Na Tabela 6 também são apresentados os iniciadores específicos de Ty1 para o plasmídeo pRN2delta.

Tabela 6. Iniciadores utilizados para construção do cassete de expressão do gene *XKS1*.

Iniciador	Sequência 5'- 3'	Enzima
TyL f	AAAAGCTTGGATCCTGAGAAATGGGTGAATGTTG	*Bam*HI
TyL r	TTGAATTCGTACGAATAAAAATCAACTATCATC	*Bsi*WI
TyR f	AAGAATTCGTCGACTGAGAAATGGGTGAATGTTGAG	*Sal*I
TyR r	TTTCTAGAGGATCCGAATAAAAATCAACTATCATC	*Bam*HI
XKS1 f	AACGTACGAATTCTCCCTAACATGTAGGTGG	*Bsi*WI
XKS1 r	GTCGACGATATCCGGAGCAAATTAAAGCCTTCGAG	*Bsp*EI
LEU2 f	AATCCGGACGTCTATCGACGGTCGAGGAG	*Bsp*EI
LEU2 r	AAGTCGACGGGCCCTATCGACTACGTCGTAAGG	*Sal*I
Os sítios de clivagem das enzimas de restrição são apresentados em vermelho.		

Após a amplificação por PCR, os fragmentos foram digeridos com enzimas de restrição específicas, de acordo com os sítios presentes em cada um dos iniciadores (Tabela 6). Dessa forma, extremidades coesivas de diferentes fragmentos puderam ser posteriormente ligadas em uma segunda etapa para construção definitiva do cassete (Figura 14).

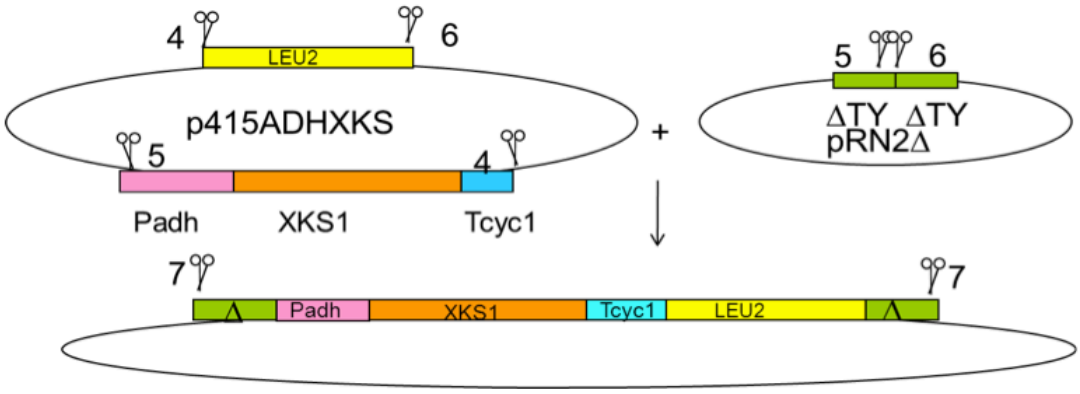

Figura 14. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção do plasmídeo p415ADHXKS1. Sítios de clivagem para enzimas de restrição: 4= *Bsp*EI; 5= *Bsi*WI; 6= *Sal*I; 7= *Bam*HI.

O plasmídeo pRN2delta, contendo as sequências de Ty1, foi diretamente digerido com as enzimas *Bsi*WI e *Sal*I e ligado ao fragmento contendo o promotor de *ADH1*, o gene *XKS1*, o terminador de *CYC1* e o gene *LEU2* (Figura 14). Após esta etapa, uma nova digestão enzimática com

*Bam*HI (sítio 7 da Figura 14) foi realizada para obtenção do cassete final de expressão.

Finalmente, este cassete foi transformado em células de *S. cerevisiae* da linhagem RWB243 (derivada da linhagem CEN.PK). O gene *LEU2*, presente na construção, foi usado tanto para restaurar a condição prototrófica da linhagem após a transformação, como também para servir como gene repórter para identificação das células transformantes. A integração no genoma desta construção, após recombinação homóloga, foi verificada através de PCR. Um isolado com a informação de interesse foi selecionado e denominado de RN995.

O aumento da expressão dos genes da via das pentoses-fosfato *TAL1* (EC 2.2.1.2, codificador de uma transaldolase), *TKL1* (EC 2.2.1.1, codificador de uma transcetolase), *RPE1* (EC 5.1.3.1, codificador de uma D-ribulose-5-fosfato epimerase) e *RKI1* (EC 5.3.1.6, codificador de uma ribose-5-fosfato ketol-isomerase) foi obtido pela substituição dos promotores originais por outro constitutivo de *Saccharomyces cerevisiae*, o promotor *TPI1* (Kuyper *et al*., 2005). Não houve alteração na sequência do gene, e nenhuma sequência codante (transcrita/traduzida) foi introduzida para estes genes.

Para esse fim, foi utilizado o sistema de transformação Cre/loxP, amplamente utilizado em transformação de leveduras (Gueldener et al., 2002). Foi construído um cassete contendo o gene HphMX4, que confere resistência ao antibiótico higromicina, flanqueado por sequências loxP, e ligado ao promotor de *TPI1*. Este cassete foi então amplificado por PCR, usando iniciadores contendo sequências homólogas à região de inserção no genoma desejada, e transformado nas leveduras.

O sistema de expressão ectópica da recombinase CRE, mediada pelo plasmídeo pSH47 (Güldener *et al*., 1996), foi utilizado nestas manipulações genéticas para a remoção do marcador de resistência ao antibiótico HphMX4 das construções. Ao final das manipulações, uma sequência de loxP permaneceu presente na região acima do promotor substituto. A correta remoção das marcas e localização precisa foi verificada por PCR utilizando-se iniciadores específicos. Na Figura 15, são apresentadas as sequências das respectivas regiões no genoma e um sistema simplificado que ilustra o processo de recombinação homóloga.

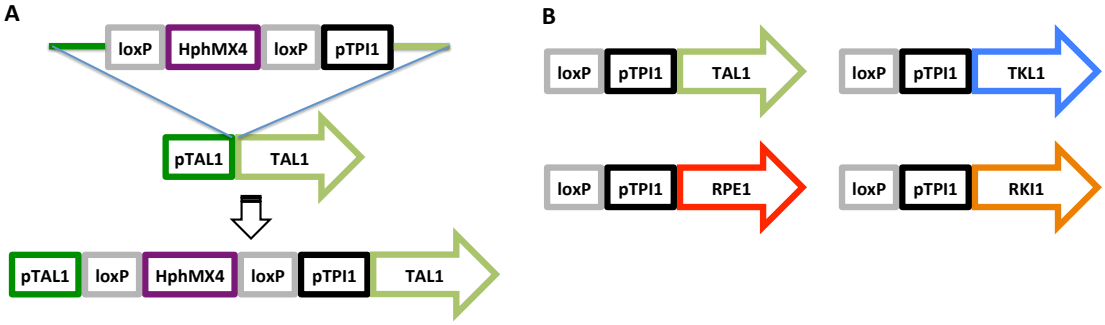

Figura 15. Estratégia de substituição dos promotores dos genes da via das pentose-fosfato. A: Representação esquemática do cassete usado para substituição do promotor *TAL1*. As sequências adjacentes ao cassete (linhas verdes) foram usadas como região de homologia para substituir o promotor original pelo promotor de *TPI1*. B. Representação do local do genoma da levedura após a substituição dos promotores. Após a ação da enzima recombinase CRE, o gene de resistência a antibiótico HphMX4 e uma cicatriz foram removidos. Esta estratégia foi utilizada de forma similar para substituição dos promotores de outros três genes: *RPE1*, *TKL1* e *RKI1*.

O gene *GRE3* (EC 1.1.21, que codifica uma aldose redutase) foi deletado através de três etapas de manipulação genética, visando a diminuição da produção de xilitol a partir de xilose.

Na primeira etapa, o gene foi removido do genoma através da inserção de um cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico higromicina (HphMX4) via recombinação homóloga. Após a confirmação por PCR do local de inserção do gene HphMX4, um novo cassete, agora contendo um gene de resistência ao antibiótico geneticina (KanMX4), foi usado para remoção da marca HphMX4. Este novo cassete foi construído usando sequências loxP em suas extremidades de maneira a possibilitar a remoção da marca após a expressão ectópica de uma recombinase CRE (Güldener *et al*., 1996). A sequência genômica derivada desta transformação após a ação da recombinase e os detalhes das etapas utilizadas são apresentadas na Figura 16.

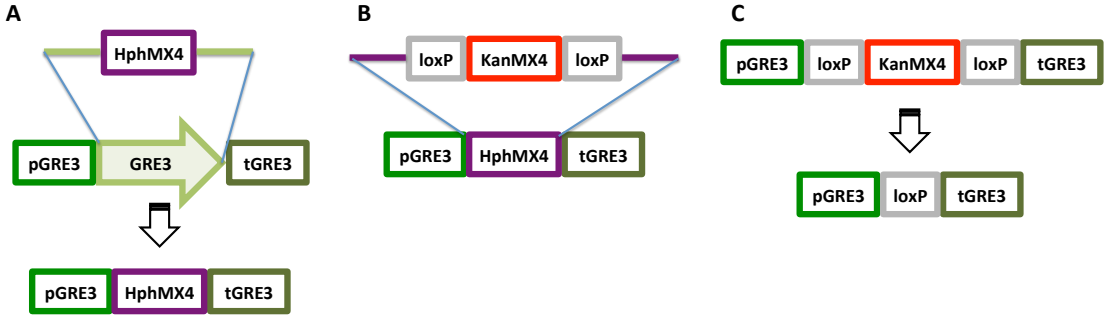

Figura 16. Representação das etapas do processo de deleção do gene *GRE3*. A: A deleção do gene *GRE3* foi realizada por substituição via recombinação homóloga da sequência codante pelo cassete HphMX4, que confere resistência ao antibiótico higromicina. B: Retirada do gene HphMX4 pelo cassete KanMX4 contendo o gene repórter de resistência ao antibiótico geneticina e os sítios de reconhecimento da enzima CRE (loxP). C: Sítio no genoma da levedura após remoção do gene KanMX4 mediada pela ação da enzima recombinase CRE.

Através das etapas detalhadas acima, os promotores de quatro genes foram substituídos (*TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RKI1*) e um gene nativo da linhagem teve sua região codante removida do genoma (*GRE3*), gerando a linhagem RN995. Apesar de todas estas modificações genéticas, apenas as sequências exógenas não codantes de loxP, contendo 34 pares de base cada permaneceram no genoma. Estes fragmentos de DNA não codantes são constituídos por duas sequências repetidas e invertidas de 13 pares de base cada e uma região central de 8 pares de base. A enzima recombinase CRE excisa todas as sequências presentes entre dois sítios loxP, deixando no genoma apenas uma cópia após este processo (Güldener *et al*., 1996).

4. O vetor utilizado;

Os plasmídeos utilizados no presente trabalho são detalhados nos demais itens desse documento, com destaque para o item 3 e 6.

É importante ressaltar que a transformação para obtenção da Linhagem RN1016 se deu através de integração genômica estável pela técnica de recombinação homóloga. Sendo assim, não existe plasmídeo exógeno na Linhagem RN1016. Confome melhor observado no item 6, o método de transformação por recombinação homóloga promove a inserção apenas da construção gênica de interesse, sem inserção de sequências plasmidiais.

5. O mapa genético utilizado no processo de transformação (transgene/vetor), indicando as regiões que especificam;

As informações referentes ao mapa genético utilizado no processo de transformação, bem como sequências nucleotídicas e elementos funcionais são mostrados em detalhes no ítem 9.3 deste relatório.

6. O resumo das construções para obtenção do OGM;

A principal característica da linhagem RN1016, objeto deste pleito, é a presença do gene *XylA* codificador da enzima xilose isomerase (EC 5.3.1.5) derivado de *Piromyces* sp. E2 (ATCC76762). Esta enzima garante à levedura a capacidade de fermentar açúcares de 5 carbonos, como xilose, desta forma capacitando-a de produzir etanol utilizando biomassa processada como fonte de carbono.

Para a construção do cassete de expressão, foram utilizados dois plasmídeos. O primeiro, pAKX002, contém o gene *XylA de Piromyces* sp., dirigido pelo promotor de *TPI1* e o terminador de *CYC1*, ambos derivados de *S. cerevisiae* (Kuyper *et al*., 2005). O gene *URA3* derivado de *S. cerevisiae* também está presente neste plasmídeo e foi utilizado na construção do cassete de expressão (Figura 17). Assim como descrito anteriormente, as sequências de Ty1, utilizadas como região de homologia para integração no genoma, foram obtidas a partir do plasmídeo pRN2delta.

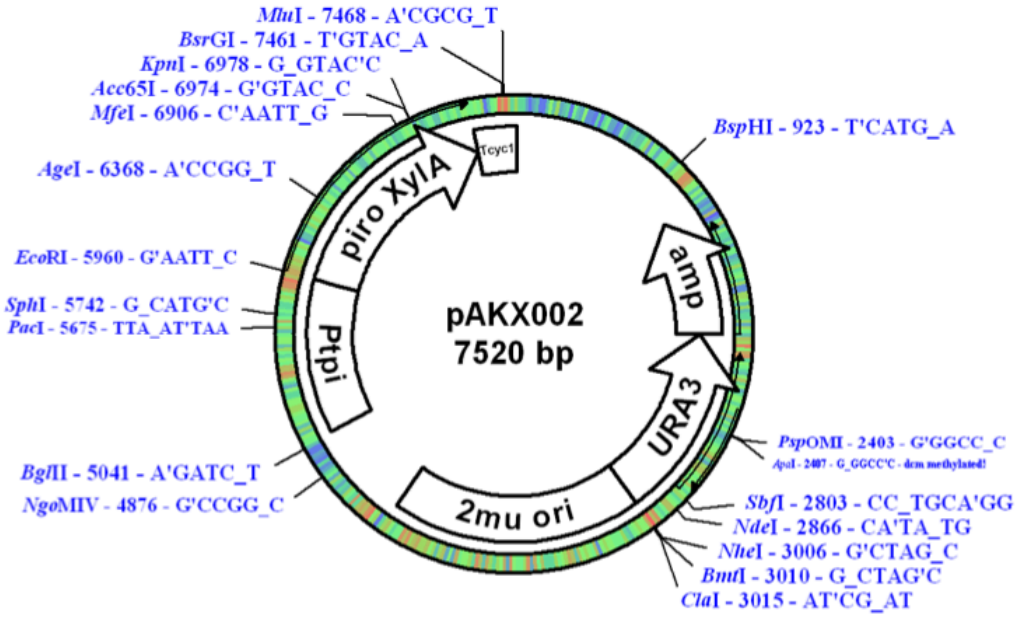

Figura 17. Mapa gênico do plasmídeo pAKX002 utilizado para construção do cassete de expressão do gene *XylA*.

As regiões de interesse do plasmídeo pAKX002 foram amplificadas por PCR utilizando iniciadores contendo sítios de clivagem para determinadas enzimas de restrição (Tabela 7). Na Tabela 7 também são apresentados os iniciadores específicos de Ty1 para o plasmídeo pRN2delta.

Tabela 7. Iniciadores utilizados para construção do cassete de expressão do gene *XylA*.

Iniciador	Sequência 5'- 3'	Enzima
TyL f	AAAAGCTTGGATCCTGAGAAATGGGTGAATGTTG	*Bam*HI
TyL r	TTGAATTCGTACGAATAAAAATCAACTATCATC	*Bsi*WI
TyR f	AAGAATTCGTCGACTGAGAAATGGGTGAATGTTGAG	*Sal*I
TyR r	TTTCTAGAGGATCCGAATAAAAATCAACTATCATC	*Bam*HI
XylA f	AAACCGGTTTCTTCTTCAGATTCCCTC	*Age*I
XylA r	AACTCGAGCCTAGGAAGCCTTCGAGCGTC	*Xho*I
URA3 f	AATCCGGACGTCCTGAGAGTGCACCACGC	*Bsp*EI
URA3 r	AAGTCGACGGTACCGCAGGGTAATAACTG	*Acc*65I
Os sítios de clivagem das enzimas de restrição são apresentados em vermelho.		

Após a amplificação por PCR, os fragmentos foram digeridos com enzimas de restrição específicas, de acordo com os sítios presentes em cada um dos iniciadores (Tabela 7). Dessa forma, extremidades coesivas de diferentes fragmentos puderam ser posteriormente ligadas em uma segunda etapa para construção definitiva do cassete (Figura 18).

O plasmídeo pRN2delta, contendo as sequências de Ty1, foi diretamente digerido com as enzimas *Bsi*WI e *Sal*I e ligado ao fragmento contendo o promotor de *TPI1*, o gene *XylA*, o terminador de *CYC1* e o gene *URA3* (Figura 18). Após esta etapa, uma nova digestão enzimática com *Bam*HI (sítio 7 da Figura 18) foi realizada para obtenção do cassete final de expressão.

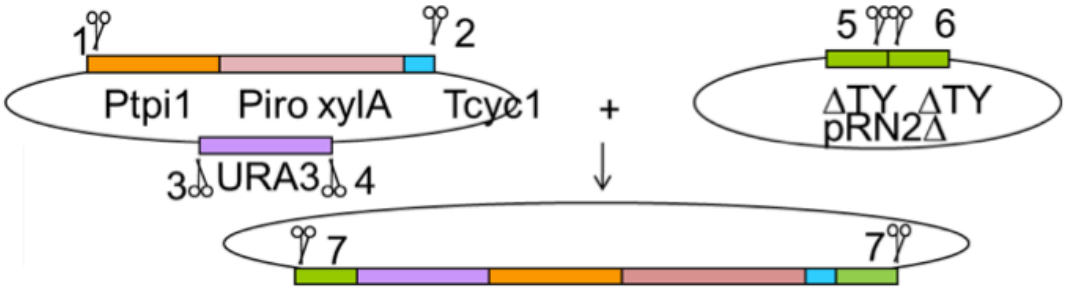

Figura 18. Representação esquemática da estratégia utilizada para construção de expressão do gene *XylA*. Sítios de clivagem para enzimas de restrição: 1= *Age*I; 2= *Xho*I; 3= *Acc*65I; 4= *Bsp*EI; 5= *Bsi*WI; 6= *Sal*I; 7= *Bam*HI.

Finalmente, este cassete foi transformado em células de *S. cerevisiae* da linhagem RN995. O gene *URA3*, presente na construção, foi usado tanto para restaurar a condição prototrófica da linhagem após a transformação como também para servir de gene repórter para identificação das células transformantes. A integração no genoma desta construção, após recombinação homóloga, foi verificada através de PCR. A transformação genética por recombinação homóloga garante a inserção do gene em local específico, não se tratando portanto de uma típica inserção aleatória. Um isolado com a informação de interesse foi selecionado e denominado de RN996.

A linhagem obtida após estas manipulações não possui nenhum marcador de resistência a antibiótico ou plasmídeos exógenos. **O único DNA codificador de sequência protéica não derivado de *S. cerevisiae* é o gene *XylA* de *Piromyces* sp.**

Após as etapas de manipulação genética, a linhagem RN996 foi submetida a um extenso programa de engenharia evolutiva (evolução adaptativa em um quimiostato) na presença de xilose. Este processo de evolução adaptativa visa o isolamento de células com melhor desempenho fermentativo através da simples seleção, que ocorre espontaneamente, não mais utilizando qualquer ferramenta de transformação ou engenharia genética. Através deste procedimento foi obtida a linhagem RN1001.

O ácido acético é naturalmente encontrado no hidrolisado de cana, sendo tóxico para a levedura em determinadas concentrações. Por esta razão, a linhagem RN1001 foi então submetida a uma segunda rodada de engenharia evolutiva para aumentar a tolerância ao ácido acético utilizando um quimiostato com meio contendo 3 g/L do composto. Após a condução das duas rodadas de engenharia adaptativa, foi obtida uma linhagem com um melhor desempenho fermentativo em um hidrolisado hemicelulósico contendo xilose e ácido acético. Esta linhagem haplóide (MATa) foi então denominada RN1014.

Para a etapa seguinte de construção da linhagem RN1016, células haploides de RN1014 MATa foram transformadas de modo transiente (temporário, não integrativo) com o plasmídeo pFL39kanMX-GAL1HO (Teunissen *et al.*, 2002). Este plasmídeo induz a troca do *mating type*

(a→alfa) através de degradação do *locus MAT* pela endonuclease HO (*Homothallic switching endonuclease*) (revisado por Harber, 2012). Dessa forma, células transformadas com este plasmídeo tiveram seu *mating* alterado de "a" para "alfa". Este plasmídeo introduzido de forma transiente foi eliminado naturalmente, sem que qualquer sequência permaneça na célula.

A partir do cruzamento de dois isolados de RN1014, um MATa original e outro MATalfa, obtido a partir da mudança de *mating*, foi desenvolvida uma linhagem diploide homozigota (MATa/MATalfa). Uma nova inserção do plasmídeo pFL39kanMX-GAL1HO na linhagem diploide MATa/MATalfa, induziu uma segunda troca de *mating* na linhagem diploide, formando diploides MATa/MATa e MATalfa/MATalfa. Finalmente, esta linhagem foi então transformada com o plasmídeo transiente pRN801, pertencente a coleção da empresa Royal Nedalco, que possui um marcador específico de resistência a higromicina e que é expresso exclusivamente em células MATa (Figura 19).

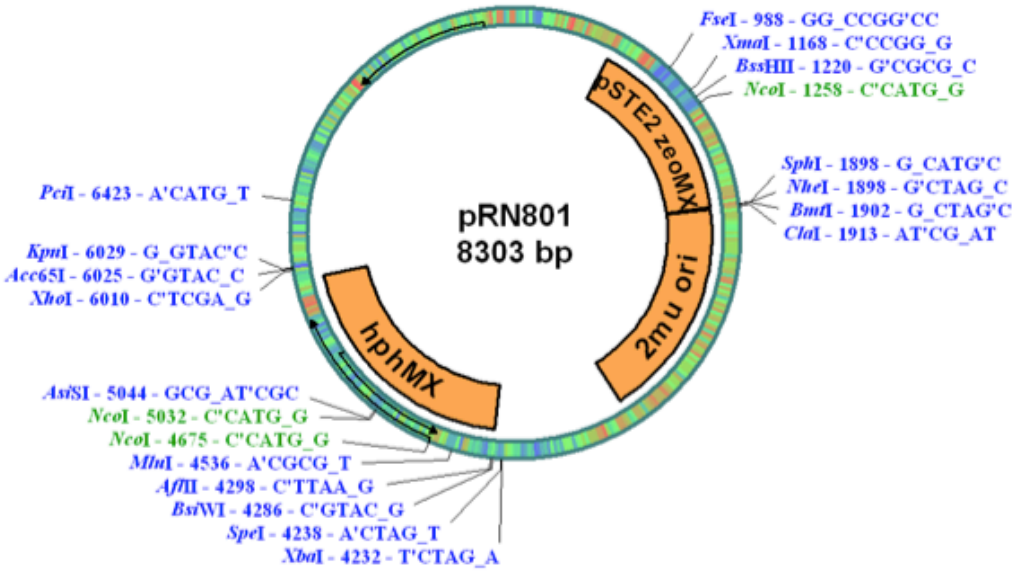

Figura 19. Mapa gênico do plasmídeo pRN801.

A utilização do plasmídeo pRN801A permitiu a seleção de um diploide com as características de interesse (MATa/MATa). Assim, uma das colônias isoladas neste experimento foi então denominada RN1016, com características de fermentação ligeiramente superiores a linhagem RN1014.

É importante destacar que estes plasmídeos utilizados na alteração de *mating type* são expressos de forma transiente. Nenhum fragmento gênico é integrado ou permanece na célula após a obtenção da característica desejada. Na Figura 20 é apresentado um resumo ilustrativo das linhagens intermediárias utilizadas para obtenção da linhagem RN1016.

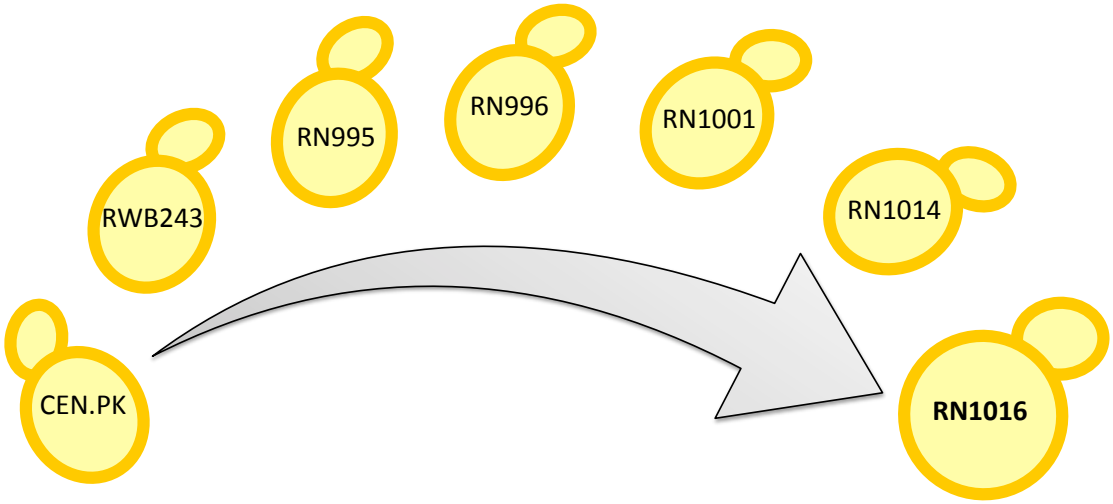

Figura 20. Principais linhagens intermediárias usadas na obtenção de RN1016. Principais características genéticas das linhagens: CEN.PK: MATa, *ura3, leu2;* RWB243: MATa, *ura3, leu2*; RN995: MATa, *ura3, XKS1* integrado, gene *GRE3* deletado e aumento da expressão de genes da via das pentose fosfato (*TKL1, TAL1, RPE1, RKI1*); RN996: genótipo de RN995 e *XylA* integrado; RN1001: genótipo de RN996 e evolutivamente adaptada para melhor desempenho de conversão de xilose em etanol; RN1004: genótipo de RN1001 e evolutivamente adaptada para tolerar melhor ácido acético; RN1016: MATa/MATa, genótipo de RN1014 e geneticamente adaptada para crescer em material lignocelulósico hidrolisado.

Ao final do processo de desenvolvimento da levedura RN1016, o seguinte genótipo foi obtido:

- *MATa/MATa;*
- *gre3::loxP/gre3::loxP;*
- *loxP-Ptpi::TAL1/loxP-Ptpi::TAL1;*
- *loxP-Ptpi::RKI1/loxP-Ptpi::RKI1;*
- *loxP-Ptpi::TKL1/loxP-Ptpi::TKL1;*
- *loxP-Ptpi::RPE1/loxP-Ptpi::RPE1;*
- *delta::Padh1XKS1Tcyc1-LEU2/delta::Padh1XKS1Tcyc1-LEU2;*
- *delta::URA3-Ptpi-xylA-Tcyc1/delta::URA3-Ptpi-xylA-Tcyc1*.

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 linhagem de levedura RN1016 pertence a **Classe de Risco 1:** Baixo risco individual e baixo risco para a coletividade.

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.

7.1. *Saccharomyces cerevisiae* – Organismo receptor;

Uma revisão bibliográfica sobre o organismo receptor *S. cerevisiae* pode ser encontrada no item **1.2** desse Relatório de Biossegurança.

Em resumo, *S. cerevisiae* é um dos principais modelos de pesquisa eucariotos, e o principal dentre os eucariotos unicelulares. Devido a sua ampla aplicação na indústria alimentar e farmacêutica por muitos anos este organismo é enquadrado na classificação GRAS (sigla em inglês para *Generally Recognized As Safe*) e sem restrição para o consumo humano pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA). Por ser um organismo ubíquo, amplamente utilizado e consumido, sem histórico de patogenicidade ou efeitos adversos a saúde humana, animal e ao meio ambiente, este organismo é enquadrado na **Classe de Risco I**.

8. Os métodos utilizados para a modificação genética;

As transformações das leveduras foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Gietz e Woods (2001), com pequenas modificações. Basicamente, as leveduras são crescidas em meio rico até atingirem uma densidade ótica adequada. Para o preparo das células competentes usadas nas transformações, as leveduras foram cultivadas em meio contendo íons de lítio. Após incubação das células tratadas com o DNA de interesse e PEG4000, a suspensão de células foi submetida a um choque térmico. Após a recuperação, as células transformantes foram plaqueadas em meio seletivo, seguido do isolamento de eventos de transformação.

Fragmentos de DNA podem ser introduzidos em leveduras como moléculas replicativas (plasmídeos) ou por integração no genoma. Diferentemente da maioria dos outros organismos, a recombinação integrativa do DNA transformante em leveduras ocorre via recombinação homóloga. Sequências clonadas de leveduras, acompanhadas de sequências exógenas em plasmídeos, podem dessa maneira serem direcionadas especificamente para uma determinado local do genoma. A estabilidade do plasmídeo varia de acordo com o tipo de plasmídeo. Plasmídeos replicativos são geralmente menos estáveis e são mais facilmente perdidos pela célula se a cultura é mantida em condições não seletivas. Desta forma pode-se isolar transformantes que sofreram integração por recombinação homóloga e que não mais possuem o plasmídeo. Uma revisão sobre este assunto pode ser obtida no trabalho de Zhang e colaboradores (1996).

Para a obtenção das linhagens, os fragmentos de DNA de interesse foram estavelmente integrados no genoma após a recombinação, causando a perda do vetor e das sequências dos marcadores seletivos de resistência a antibiótico. O DNA transformante foi integrado no genoma de maneira estável e sua estabilidade foi herdada da célula mãe para as células das progênies sucessivas, assim como qualquer outro gene nativo no genoma.

8.1. Os elementos Ty;

Elementos Ty são retrotransposons que contém repetições terminais longas (LTRs) (Friedl *et al*., 2010). Transposons foram descritos pela primeira vez em *S. cerevisiae* por Cameron *et al*. (1979) na caracterização de uma sequência Ty1 presente no locus *Sup4*. Dois distintos grupos de LTR-retrotransposons são encontrados entre eucariotos, denominados elementos Ty1-*copia* (*Pseudoviridae*) e Ty3-*gypsy* (*Metaviridae*), naturalmente presentes em muitas cópias no genoma de uma enorme variedade de organismos. *S. cerevisiae* possui cinco distintas famílias de retrotransposons, denominadas Ty1-Ty5. Existem quatro tipos de LTRs associados a elementos Ty: delta (Ty1 e Ty2), sigma (Ty3), tau (Ty4) e ômega (Ty5). Esses LTRs estão presentes nos retrotransposons flanqueando as extremidades e como elementos únicos também, gerados através de recombinação de dois LTRs e um elemento Ty (www.yeastgenome.org).

A maior parte dos elementos Ty descritos possuem aproximadamente 5,9 kb de comprimento flanqueados pelos LTRs que variam de 330 a 340 pares de bases. Estão presentes em cerca de 35-45 cópias por genoma haploide em *S. cerevisiae.* Contudo, esse elemento é heterogêneo e pode variar entre diferentes linhagens dessa levedura. Em adição, existem por volta de 200 LTRs individuais do Ty1 e Ty2, os delta elementos, que provavelmente surgiram por recombinação homóloga entre repetições diretas de LTRs e excisão de sequências intermediárias (Hauber *et al*., 1985; Friedl *et al*., 2010).

Ty1, Ty2, Ty4 e Ty5 são elementos pertencentes ao grupo Ty1-*copia*, enquanto Ty3 é o representante único do grupo Ty3-*gypsy*. Todos eles possuem a mesma estrutura básica, contendo dois genes que se sobrepõem, GAG e POL. GAG codifica componentes estruturais correspondentes a um capsídeo (VLPs) enquanto POL codifica uma poliproteína com domínios catalíticos de protease, integrase, transcriptase reversa e RNAseH (Friedl *et al*., 2010).

Os elementos Ty são sequências de DNA móveis e pertencem a classe I dos transposons, movendo-se via RNA e codificando uma transcriptase reversa para completar a translocação. O DNA desses

elementos é primeiramente transcrito em RNA e em seguida ocorre a transcrição reversa em cDNA, o qual é reinserido no genoma em uma posição diferente da original. O retrotransposon original permanece no mesmo local e a nova cópia pode levar consigo cópias das regiões adjacentes que possam ter sido duplicadas durante o processo, tornando a transposição uma das principais fontes de expansão gênica durante a evolução (Kim *et al*., 1998; www.yeastgenome.org).

Ao todo, sequências de retrotransposons que ocorrem naturalmente em *S. cerevisiae* constituem >377 kb ou 3,1% do genoma de 12,1 Mb. Sua distribuição é claramente não aleatória: 90% dos elementos Ty1, 82% dos Ty2, 95% dos Ty3 e 88% dos Ty4 foram encontrados dentro de 750 bases de sequências de tRNA ou outros genes transcritos pela RNA polimerase III (Devine & Boeke, 1996; Kim *et al*., 1998). A maioria dos transposons LTR gera uma duplicação de 5 pares de bases (pb) no sítio alvo durante a integração e um total de 118 Ty1-Ty4 LTRs (36% do total) são flanqueados por duplicações de 5 pb (Kim *et al*., 1998).

RN1016 é derivada da linhagem parental CEN.PK102-3A (MATa, ura3-52, leu2-112), também conhecida apenas como CEN.PK, como é referida neste relatório (Van Dijken *et al*., 2000). Esta linhagem apresenta aumento da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na conversão intercelular da xilose em intermediários da via glicolítica, como a xiluloquinase (EC 2.7.1.17), ribose 5-fosfato isomerase (EC 5.3.1.6), ribulose 5-fosfato epimerase (EC 5.3.1.1), transcetolase (EC 2.2.1.1) e transaldolase (EC 2.2.1.2), além da deleção do *GRE3*, visando à diminuição da produção de xilitol. Trabalhos iniciais de pesquisa utilizaram inicialmente o gene *XylA* de *Piromyces* clonado no plasmídeo pAKX002 (Kuyper *et al*., 2005), possibilitando um alto número de cópias e uma maior atividade da enzima.

Visto que plasmídeos são instáveis em *S. cerevisiae*, especialmente em condições estressantes como as encontradas em dornas de fermentação industriais, observou-se a necessidade da integração desse gene no genoma da linhagem de forma estável. No entanto, não é possível a obtenção de um alto valor de atividade dessa enzima a partir da integração de cópia única do gene que codifica a xilose isomerase, o que impossibilita o crescimento de *S. cerevisiae* em xilose. Assim sendo, na construção da RN1016 foram

utilizadas sequências do elemento Ty1delta flanqueando o cassete de integração, o qual carregava a sequência que codifica a xilose isomerase de *Piromyces* sp.

As sequências delta são abundantes no genoma de *S. cerevisiae*, que reflete a maior quantidade de elementos Ty1 e Ty2 em relação aos demais. Por tal motivo foi escolhido a sequência do LTR Ty1 para flanquear o cassete de integração carregando a xilose isomerase, permitindo uma maior probabilidade de integração do DNA exógeno em maior número de cópias. Os LTRs flanqueadores são idênticos em sequência e orientação e contém os sinais de início e término da transcrição (www.yeastgenome.org). A transformação foi realizada conforme descrito por Gietz & Woods (2001), utilizando acetato de lítio.

Em *S. cerevisiae*, o cromossomo III possui a maior proporção de retrotransposons (4,3%), e o cromossomo XII possui a mais baixa (0,63%) (Kim *et al*., 1998). Como o cassete de integração de *XylA* possui elementos delta em suas extremidades, sua integração no genoma da levedura por recombinação homóloga ocorreu em regiões LTR presentes no cromossomo III. O aumento do número de cópias desse gene foi observado após o processo de engenharia evolutiva, quando a levedura foi submetida a uma pressão seletiva direcionada, utilizando meio de cultivo com altas concentrações de xilose, visando obter linhagens que se adaptam melhor as condições impostas (Cai *et al*., 2012).

No processo de desenvolvimento da linhagem RN1016, acredita-se que a multiplicação do cassete de integração contendo o gene *XylA* ocorreu por duplicações geradas via recombinação homóloga desigual, durante o processo de engenharia evolutiva.

A utilização do sistema de recombinação utilizando os elementos Ty1 se mostrou ideal para atingir o objetivo central, representado pela integração estável do gene de interesse, em local específico do genoma (não aleatório).

9. A caracterização molecular do inserto no organismo receptor;

9.1. Introdução;

Obter os níveis desejados de expressão de uma proteína em um sistema heterólogo depende, normalmente, da região promotora que controla a expressão do gene de interesse e, em muitos casos, do número de cópias deste gene. Em *S. cerevisiae*, é possível introduzir um alto número de cópias de um determinado gene utilizando vetores de expressão (plasmídeos) apropriados, contendo genes para resistência à antibióticos ou marcadores auxotróficos como, por exemplo, os vetores derivados da série pRS (Sikorski & Hieter, 1989). A presença destes genes marcadores, em meio seletivo, garante que os genes de interesse contidos no plasmídeo permaneçam e sejam expressos no microrganismo. Sabe-se, no entanto, que a ausência do agente seletivo apropriado, após sucessivas gerações, deverá levar a eliminação do plasmídeo introduzido, e por consequência a perda do gene de interesse.

Na indústria, a manutenção de condições de cultivo seletivas (presença do agente seletivo no meio) é normalmente impraticável devido aos altos custos do agente seletivo (ex. antibiótico, nutriente, etc.), de forma que a utilização destes recursos fica geralmente restrita a escala laboratorial.

Guerra e colaboradores (2006) descreveram um método de transformação de *S. cerevisiae* que possibilitou a integração estável de cópias do gene codificador de uma glucoamilase. A estratégia constitui no uso de sequências homólogas à região repetitiva LTR (delta) do elemento de transposição Ty1 flanqueando o gene de interesse. Ty1 é o elemento de transposição melhor caracterizado em *S. cerevisiae*, representando atualmente um importante método de transformação genética estável de leveduras (Kim *et al*., 1998; Cheng & Menees, 2004; Perlman & Boeke, 2004; Lesage & Todeschini, 2005).

Alternativamente, diversos trabalhos demonstram que eventos de duplicação de um gene ocorrem naturalmente como um mecanismo de adaptação do genoma à mudanças no ambiente, como por exemplo: necessidade de transporte de nutrientes, tolerância a estresses provocados

por temperatura ou potencial osmótico, resistência a antibióticos, entre outros (Kondrashov, 2012). Neste sentido, uma área emergente da Genética, conhecida como Engenharia Evolutiva, explora, entre outros, tal mecanismo para adaptar microrganismos à diversas condições industriais de interesse como, por exemplo, o consumo de xilose por *S. cerevisiae* (Kondrashov, 2012; Kuyper *et al*., 2005). A engenharia evolutiva consiste em um processo convencional de melhoramento genético dirigido, onde o microrganismo é cultivado em condições seletivas. Em seguida seleciona-se a linhagem que melhor se adaptou ao meio, sem necessariamente implicar na inserção de genes por transformação genética.

Para obter uma linhagem capaz de produzir etanol com alto rendimento a partir de xilose foram utilizadas ambas as abordagens citadas, resultando na linhagem RN1016. Os detalhes deste desenvolvimento que envolvem as informações referentes ao gene *xilose isomerase* são discutidos a seguir.

Adicionalmente, o processo de obtenção e desenvolvimento das linhagem GM que deram origem à RN1016 encontra-se sob domínio público, detalhadamente descrito na literatura científica, podendo ser observado principalmente nos seguintes artigos:

Kuyper, M.; Harhangi, H. R.; Stave, A. K.; Winkler, A. A.; Jetten, M. S.; De Laat, W. T.; De Ridder, J. J.; Op Den Camp, H. J.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? **FEMS Yeast Research**, Delft, v.4, n.1, p.69–78, 2003.

Kuyper, M.; Winkler, A. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS Yeast Research**, Delft, v.4, n.6, p.655–664, 2004.

Kuyper, M.; Hartog, M. M.; Toirkens, M. J.; Almering, M. J.; Winkler, A. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Research**, Delft, v.5, n.4, p.399–409, 2005a.

Kuyper, M.; Toirkens, M. J.; Diderich, J. A.; Winkler, A. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, Delft, v.5, n.10, p.925–934, 2005b.

9.2. Materiais e métodos;

9.2.1. Quantificação do número de cópias do gene *xilose isomerase* na linhagem RN1016;

O número de cópias do gene que codifica a xilose isomerase presente na linhagem RN1016 foi determinado através da técnica de qPCR (*Real-Time quantitative PCR*) adaptada para quantificação de número de cópias de DNA (Lee *et al*., 2008). As linhagens BIE104P1A1 e CEN.PK foram utilizadas como controles. Resumidamente, iniciadores previamente sintetizados foram utilizados nas amplificações do gene condificador da *XylA* e do gene normalizador *UBC6* (*Ubiquitin-conjugating 6*), presente em uma única cópia do genoma de *S. cerevisiae* (Tabela 8). Para a amplificação, utilizou-se desnaturação inicial a 95ºC por 7 minutos; 45 ciclos de desnaturação por 10s a 95ºC seguido de anelamento a 55ºC por 30s e 10s de extensão a 72ºC.

Tabela 8. Iniciadores utilizados na técnica de qPCR para determinar o número de cópias de *XylA* no genoma da levedura RN1016.

Nome	Sequência (5'→ 3')	Tamanho (pb*)
XylA f	CAGACTTTGATGTTGTCGCCCG	22
XylA r	AAGTCCTTGTCTAAGTTGTGGGCC	24
UBC6 f	GATACTTGGAATCCTGGCTGGTCTGTCTC	29
UBC6 r	AAAGGGTCTTCTGTTTCATCACCTGTATTTGC	32

f: direto. r: reverso. *pb: pares de base.

9.2.2. Localização do gene *xilose isomerase* no genoma da linhagem RN1016;

A posição das cópias do gene *XylA* foi determinada a nível cromossomal através da técnica de *Southern-Blotting* associada a CHEF (*Contour-clamped homogeneous electric fields*) (Maringele & Lydall, 2006; Murakami *et al*., 2011).

Resumidamente, cromossomos foram individualizados em gel por eletroforese (CHEF), transferidos para membrana de nitrocelulose e hibridizados com sondas específicas. A posição do fragmento marcado foi

comparada com o cariótipo da levedura RN1016 para identificar a localização do gene de interesse.

9.3. Resultados e discussão;

9.3.1. Número de cópias e localização no genoma;

Esta análise teve o objetivo de determinar o número de cópias do gene codificador da xilose isomerase na linhagem RN1016, utilizando outras duas linhagens controles. Como controle negativo foi utilizada a linhagem CEN.PK, usada no processo de desenvolvimento da linhagem RN1016, que representa o parental convencional. Uma linhagem não relacionada à RN1016 mas que possui uma cópia do gene codificador da xilose isomerase foi utilizada como controle positivo (BIE104P1A1).

O número de cópias do gene *XylA*, codificador da xilose isomerase, é representado pelo valor obtido de sua curva de amplificação ao atingir o *threshold,* normalizado pelo valor da curva de amplificação do gene *UBC6* (normalizador), que se apresenta em apenas uma cópia. Quanto maior o número de cópias do gene, mais rápido a curva de amplificação atinge o *threshold* previamente definido, e assim possibilita a determinação do número de cópias no genoma.

É importante notar que em todas as linhagens estudadas a curva de amplificação do gene *UBC6* representa a quantificação de uma cópia, após normalização (Figura 21A), confirmando a ocorrência de apenas uma cópia deste gene no genoma de *S. cerevisiae*.

Conforme esperado, a curva referente à uma cópia do gene da xilose isomerase foi obtida para a linhagem BIE104P1A1, enquanto nenhuma amplificação deste gene foi detectada na linhagem CEN.PK (Figura 21B). Como descrito anteriormente, CEN.PK é a linhagem parental não GM que não possui o gene codificador da xilose isomerase.

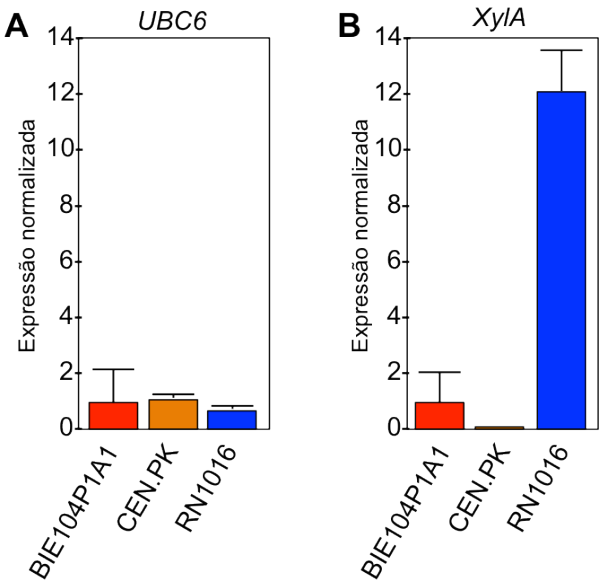

Figura 21. Quantificação do número de cópias do gene xilose isomerase na levedura RN1016. O valor da "expressão normalizada" indica diretamente o número de cópias do gene estudado. *UB6:* gene normalizador. Presente em apenas uma cópia no genoma de *S. cerevisiae*. *XylA*: *Xilose isomerase*. BIE104P1A1: linhagem contendo uma cópia do gene *XylA* utilizada como controle positivo. CEN.PK: linhagem selvagem.

O valor obtido com as análises das amostras de RN1016 indica que esta linhagem possui doze cópias do gene que codifica a xilose isomerase (Figura 21B). É importante notar que o processo de desenvolvimento deste OGM se deu pela obtenção do evento inicial de transformação genética por recombinação homóloga, no qual a linhagem receptora parental recebeu o cassete contendo o gene codificador da xilose isomerase, originando a linhagem RN996. Em seguida, esta linhagem foi submetida à engenharia evolutiva (semelhante a um melhoramento clássico) durante sucessivas gerações, direcionada para maximizar o consumo de xilose. As condições impostas favoreceram a seleção de células que adquiriram maior habilidade de consumir xilose por meio da duplicação do gene codificador da xilose isomerase.

Entre os diferentes mecanismos de duplicação passíveis de ocorrer em leveduras haploides (Schacherer *et al*., 2005, 2004; Zhang *et al*., 2013), o mecanismo mais provável responsável pelos eventos de duplicação do gene *Xilose isomerase* é a recombinação desigual (*unequal crossovers*), resultando em um agrupamento de seguidas cópias adjacentes que compartilham a mesma região repetitiva Δ (Delta) (Figura 22A).

A ocorrência deste mecanismo foi avaliada através da amplificação

das bordas do cassete contendo o gene *XylA* utilizando *primers* invertidos (Figura 22B). Através das três combinações possíveis entre estes (F/F, R/R e F/R) foi avaliada a orientação das múltiplas cópias (Figura 22C). Como observado, a amplificação positiva da combinação F/R comprovou que todas as cópias encontram-se orientadas no mesmo sentido. Além disso, a altura da banda amplificada corresponde ao esperado para cópias adjacentes compartilhando a mesma região repetitiva Δ (1032 pares de base) (Figura 22C).

Esta hipótese foi confirmada também após o sequenciamento do DNA amplificado. Juntos, estes resultados confirmam a acorrência de eventos de duplicação provocados por recombinações desiguais durante o melhoramento clássico (engenharia evolutiva), além disso, comprovam que todas as cópias do gene *XylA* encontram-se agrupadas e na mesma orientação.

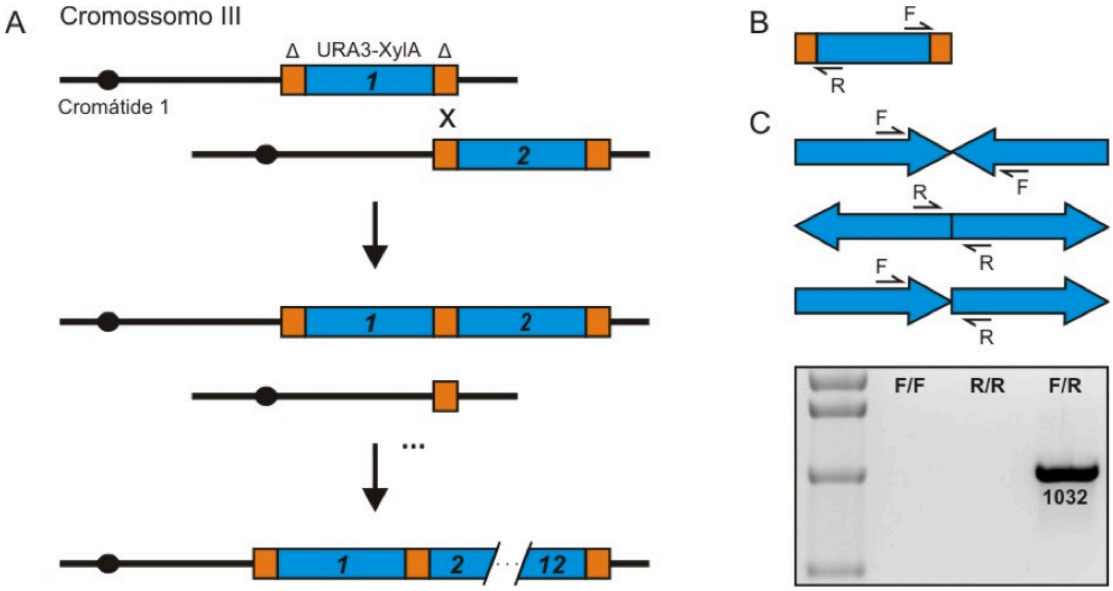

Figura 22. Mecanismo responsável pelo aumento do número de cópias do gene *XylA* induzido pela engenharia evolutiva. A) Representação esquemática da recombinação desigual entre cromátides do mesmo cromossomo durante a mitose de uma célula haploide. Notar que após a mitose uma célula herda uma cromátide contendo duas cópias do gene *XylA*. A outra célula perde o gene e é selecionada. Novos eventos de recombinação acumulam cópias seguidas do gene. B) *Primers* invertidos construídos para amplificar as bordas do cassete contendo o gene *XylA* utilizados para a confirmação do evento de duplicação desigual. C) Amplificação das boradas do cassete de expressão para confirmar a ocorrência de duplicação desigual. Notar que as cópias encontram-se no mesmo sentido e que o fragmento amplificado corresponde ao tamanho esperado para duas cópias compartilhando a mesa região repetitiva Δ (resultado confirmado através do sequenciamento do produto da PCR). Gel de agarose 1%. *XylA*: *Xilose isomerase*. *URA3*: marcador auxotrófico. Δ: sequencia repetitiva do elemento Ty1. F: *primer forward*. R: *primer reverse.*

Em paralelo, avaliou-se a localização das múltiplas cópias do gene *XylA* no genoma da linhagem RN1016. Esta análise incluiu a individualização de todos os cromossomos do OGM através da técnica de CHEF (Maringele & Lydall, 2006) seguida da marcação do gene *URA3* para ser utilizado como sonda específica no *Southern-Blotting* (Murakami *et al*., 2011). Como detalhado anteriormente, a construção do cassete para a expressão do gene *XylA* inclui o fato de este gene estar ligado ao gene *URA3*. Dessa forma, no ensaio de CHEF/*Southern-Blotting*, o gene *URA3* indica à posição do gene *xilose isomerase*.

Conforme apresentado na Figura 23, a marcação do gene *URA3* ocorre apenas na posição correspondente ao cromossomo III, demonstrando que as cópias do gene xilose isomerase encontram-se neste cromossomo da levedura RN1016. É importante notar que nenhuma marcação é observada nas posições correspondentes aos outros 15 cromossomos, especialmente no cromossomo V, posição na qual o gene *URA3* ocorre naturalmente em linhagens de *S. cerevisiae* selvagens (Goffeau *et al*., 1996). A ausência da marcação no cromossomo V confirma que a linhagem analisada é a RN1016, uma vez que este gene é ausente na linhagem parental e está ligado ao gene xilose isomerase nesta linhagem.

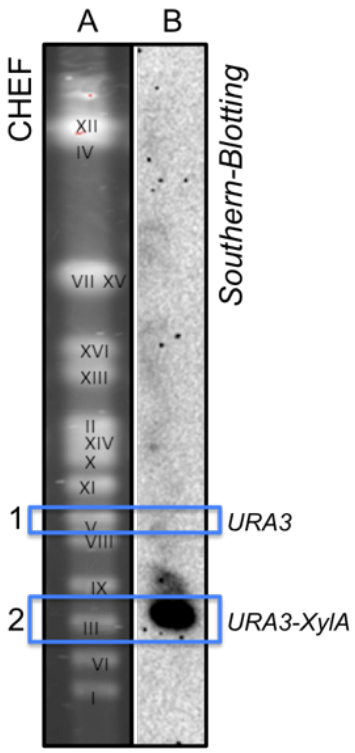

Figura 23. Detecção da posição das cópias do gene *xilose isomerase* no genoma da linhagem RN1016. A) Individualização dos cromossomos da RN1016 através da técnica CHEF. B) Autoradiografia indicando a marcação do gene *URA3* com sonda específica pela técnica de *Soutern-Blotting*. 1: cromossomo V: não é detectada marcação para o gene *URA3*. 2: cromossomo III: detecção do gene *URA3* indicando a posição das cópias do gene *XylA*. *URA3:* gene complementador de auxotorfia. *XylA*: gene codificador da xilose isomerase.

9.3.2. Sequências flanqueadoras do gene;

Como descrito detalhadamente no item 8 deste relatório, o gene xilose isomerase foi inserido pelo método de recombinação homóloga. Este método se baseia na inserção da sequência de DNA de interesse entre sequências específicas e previamente definidas. O método de recombinação homóloga é amplamente utilizado para transformação estável de leveduras e outros microrganismos e, ao contrário de outros tipos de transformação de eucariotos, não permite a inserção randômica ou aleatória da construção gênica de interesse. O item 9.3 (Figura 22.C) demonstra que a construção gênica de interesse é flanqueada pelas sequências Delta do elemento Ty, comprovando a inserção desse gene no local de interesse.

9.4. Sequência nucleotídica do transgene inserido no OGM e respectivos elementos reguladores;

CONFIDENCIAL

O cassete de recombinação e expressão de *XylA* inserido no genoma de *S. cerevisiae* para obtenção da linhagem RN1016 é mostrado de forma esquemática na **Figura 24 - Confidencial**. Neste esquema, pode-se observar a indicação de cada um dos elementos funcionais, bem como o mapa de restrição completo. Adicionalmente, a sequência completa de nucleotídeos do cassete de transformação é fornecida na **Figura 25 - Confidencial**, onde observa-se as regiões que representam função separadas por diferentes cores, conforme a legenda.

Este ítem está contido no **Apêndice Confidencial** que acompanha o Relatório de Biossegurança da linhagem RN1016.

As informações contidas neste ítem apresentam conteúdo de segredo industrial e propriedade intelectual.

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

Uma completa revisão bibliográfica sobre a xilose Isomerase é fornecida no item 3.1. Esta revisão contempla tanto as informações relativas ao gene quanto a proteína por ele codificada. Neste item um resumo da descrição da proteína é apresentado. Para maiores detalhes, referir-se ao ítem 3.1.

A Xilose isomerase catalisa a reação reversível de D-xilose a D-xilulose (Figura 26). Esta é uma das enzimas mais utilizadas industrialmente e aplicada em larga escala na produção de Xarope de Milho com Alto teor de Frutose (*High Fructose Corn Syrup* - HFCS) (van Maris *et al*., 2007).

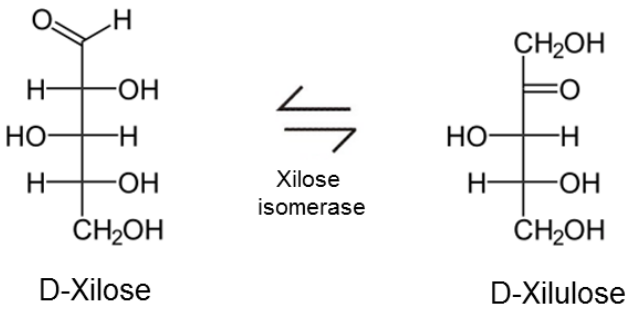

Figura 26. Isomerização reversível de D-xilose a D-xilulose, catalisada pela enzima xilose isomerase.

Apesar da afinidade dessa enzima ser 160 vezes maior para xilose do que para glicose, sua aplicação foi suficiente para ser comercialmente significante. O processo de isomerização foi realizado em escala industrial pela primeira vez em 1967 pela Clinton Corn Processing Co. nos EUA e sua forma imobilizada foi lançada comercialmente em 1974. Com uma demanda cada vez maior, e impulsionada pelo crescente mercado de HFCS, a produção dessa enzima comanda hoje uma enorme parcela na indústria de alimentos (Bhosale et al., 1996).

Devido a sua grande aplicação comercial, as propriedades enzimáticas de XI de diversos microrganismos têm sido extensivamente estudadas. Tais pesquisas forneceram a descrição de um grande número de estruturas de XI e o sequenciamento de genes que codificam essa enzima em diversos

organismos. Adicionalmente, seu mecanismo catalítico foi investigado, bem como novas descobertas envolvendo estruturas relacionadas a termoestabilidade foram obtidas (Vieille *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1999). Abaixo estão descritas importantes características dessa enzima, revisado por Bhosale (1996):

- **Afinidade por substratos**: a enzima é capaz de isomerizar substratos específicos, além de glicose e xilose, como também a D-ribose, L-arabinose, L-ramnose, D-alose e 2-deoxiglicose. A isomerização máxima é obtida em substratos que possuem grupos hidroxila nos carbonos 3 e 4, como glicose e xilose, sendo que os valores de K_m descritos, para esses respectivos açúcares, variam de 0,086 a 0,920 M e 0,005 a 0,093M.
- **Cofatores e inibidores**: XI requerem cátions divalentes 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 lixose.
- **Temperatura e pH**: a temperatura ótima da maior parte das XI varia entre 60 e 80ºC e aumenta na presença de Co^{2+}. O pH ótimo de ação dessa enzima, em sua maioria, varia entre 7 e 9.

Xilose isomerases, em geral, têm maior Km e menor Kcat para D-glicose do que para D-xilose (Chang et al., 1999). A linearização e isomerização de D-xilose a D-xilulose ou da D-glicose a D-frutose ocorre no sítio ativo da xilose isomerase e requer uma complexa transferência de hidrogênio entre os carbonos C1 e C2 do substrato. Evidências experimentais suportam um mecanismo de 2 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 Lys-182, His-53 e Asp-56 teriam um importante papel na abertura deste anel. O sítio ativo é formado pelos resíduos Asp-56, 216, 244, 254, 256 e 286, His-53 e 219, Glu-180 e dois cátions divalentes como cofatores (Meilleur et al., 2006). Sequências de xilose isomerases apresentam sítio catalítico e regiões de ligação a cátions bem conservados.

Grandes esforços têm sido dedicados em novos *screenings* e engenharia de proteínas para obter XI com atividades em temperaturas mais elevadas, visando aplicação na indústria de HFCS. Estratégias envolvendo adaptação e evolução dirigida de XI têm sido extensivamente empregadas, visando obter enzimas que apresentem maior atividade e termoestabilidade (Löon *et al*., 2002; Sriprapundh *et al*., 2003; Lee *et al*., 2012). Patel (2012) modificou o sítio catalítico da enzima, resultando na alteração da especificidade pelo substrato, aumentando a afinidade por D-lixose, L-arabinose e D-manose.

Outro foco de grande interesse, que diz respeito a esse documento, é a indústria de etanol, que visa a utilização da xilose isomerase como ferramenta na conversão de xilose em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O foco de estudo em engenharia metabólica de leveduras para utilização de xilose está concentrado em duas vias, que consistem na conversão de D-xilose a D-xilulose: a via Xilose Redutase – Xilitol Desidrogenase (XR-XDH) e a via Xilose Isomerase (XI). A via XR-XDH, presente em microrganismos eucariotos, consiste em duas reações de oxi-redução, mediada por NADPH/NADH e NAD+ respectivamente, levando a um desbalanço de cofatores e acúmulo de produtos secundários não desejados, tornando a via de xilose isomerase uma alternativa mais interessante.

A interconversão xilose a xilulose ocorre em um único passo da via xilose isomerase (XI), evitando o desbalanço redox e a formação de subprodutos que diminuem o rendimento de etanol. Por várias décadas, diversas tentativas de expressão heteróloga de XI bacterianas em *S. cerevisiae* não foram bem sucedidas. A tentativa de expressão do gene *XylA* 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 empacotamento da enzima, valor de pH intracelular sub-ótimo e a falta de cofatores específicos (Sarthy et al., 1987). Posteriormente, as tentativas de expressar as XI de *Clostridium thermosulfurogenes* (Moes et al.,1996), *Bacillus subtilis* e *Actinoplanes missouriensis* (Amore et al., 1989) também falharam em produzir uma enzima ativa em *S. cerevisiae* (van Maris et al., 2007). 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. A 85°C, a atividade dessa enzima foi superior a 1,0 µmol (mg proteína)$^{-1}$ min^{-1}, enquanto que a 30°C a atividade foi de apenas 0,04 µmol (mg proteína)$^{-1}$ min^{-1} (Walfridsson et al., 1996).

Sendo *S. cerevisiae* um microrganismo mesofílico, com pH citosólico levemente abaixo de 7 e temperatura ótima de crescimento em torno de 30ºC, a expressão heteróloga de genes que codificam XI nessa levedura tende a não alcançar atividade ótima, considerando as características dessa enzima descritas anteriormente (van Maris et al., 2007). Dessa maneira, as XI pertencentes aos fungos anaeróbicos *Piromyces* sp e *Orpinomyces* sp, por apresentarem atividade em temperaturas mais baixas, se mostram como duas alternativas promissoras para expressão em *S. cerevisiae* (Harhangi et al., 2003; Madhavan et al., 2009).

Estes fungos fazem parte da microflora ruminal de herbívoros e atuam na digestão de biomassa celulósica e hemicelulósica dentro do hospedeiro. Pertencem a família *Neocallimastigaceae*, com seis gêneros reconhecidos denominados *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces* (Nicholson et al., 2005). Altas atividades específicas para celulases e hemicelulases presentes no rumem de herbívoros tem atraído grande atenção para a descoberta de novas potenciais enzimas de aplicação industrial (Qiu et al., 2000; Harhangi et al., 2003; Steenbakkers et al., 2008).

O polipeptídeo deduzido a partir da sequência de XI de *Piromyces* possui massa molecular de 49,4 kDa e pI calculado de 5,2. A atividade dessa enzima apresentou altos valores em frutose e xilose, correlacionando aos valores de mRNA obtidos. Interessantemente, a adição de íons Co^{2+} não influenciou o comportamento da enzima (Harhangi et al., 2003). A descrição da XI de *Orpinomyces* apresentou todos os resíduos de catálise e ligação ao substrato bem conservados. Os resíduos His-102, Asp-105 e Asp-340 constituem a tríade diretamente envolvida na catálise. Lys-235 desempenha tanto um papel estrutural quanto funcional na isomerização, e os resíduos 187-196 e 231-239, característicos de xiloses isomerases descritas, também são conservados. A subunidade é possivelmente um homodímero e possui

massa molecular de aproximadamente 49.4 kDa, com atividade máxima em pH 7.5 e temperatura ótima de 37ºC.

Em 2003, após a descoberta da sequência de xilose isomerase no fungo anaeróbio *Piromyces* sp. (Kuyper *et al*., 2003) os autores obtiveram linhagens de *S. cerevisiae* capazes de crescer em xilose como única fonte de carbono. A expressão desse gene em *S. cerevisiae* resultou em valores de atividade superiores a 1,1 µmol (mg proteína)$^{-1}$ min^{-1}. A utilização desses mutantes em procedimentos de engenharia metabólica e evolutiva permitiu a obtenção de linhagens de *S. cerevisiae* com altas atividades dessa enzima, com maior rendimento na produção de etanol e menor produção e acúmulo de metabólitos intermediários (Kuyper, 2004, 2005a, 2005b). Madhavan (2009) expressaram funcionalmente a xilose isomerase de *Orpinomyces* sp. em *S. cerevisiae*, que divide 94% de identidade com a sequência de *Piromyces*, alcançando altos valores de atividade e eficiente rendimento de etanol.

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

Uma série de métodos podem ser empregados com sucesso para isolamento e/ou detecção da linhagem de levedura RN1016 em diferentes matrizes. Dentre eles destacam-se alguns, separados neste tópico em métodos moleculares, biológicos e bioquímicos.

11.1. Métodos moleculares;

Uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com oligos iniciadores próprios é suficiente para detectar especificamente a Linhagem RN1016 em meio a outros organismos. A título de sugestão encontra-se na Tabela 9 um modelo de reação de PCR, bem como sequências de iniciadores específicos para detecção do gene codificador da xilose isomerase na linhagem RN1016 (Tabela 10).

Tabela 9. Componentes de reação de PCR padrão (Sambrook & Russell, 2001).

Componente / Concentração	Volume
0,5µg de DNA	5µL
Tampão de Amplificação 10X	5µL
dNTPs 20mM (nucleotídeos)	5µL
Iniciador Senso 10µM	7µL
Iniciador Antisenso 10µM	7µL
1 a 2 unidades de DNA polimerase	1µL
Água ultrapura	20µL

Tabela 10. Sequência de iniciadores sugeridos para detecção do gene *XylA* na linhagem RN1016.

Iniciador	Sequência (5'- 3')
XylA FWD	AAGGATTGGTTACGTTTCGCCA
XylA REV	GCACCAAGTTCAATACCGGCG
Ciclo: 3 min 95°C, 45 ciclos: 20 sec 95°C, 30 sec 63°C	

Após a reação de PCR um gel de agarose deve ser utilizado para verificar a amplificação do fragmento correspondente ao gene *XylA*. Adicionalmente, técnicas modernas como a técnica de PCR em Tempo Real podem ser utilizadas inclusive para quantificação da quantidade do microrganismo RN1016 em amostras compostas, desde que se produza uma curva de calibração com amostras de concentrações conhecidas.

11.2. Métodos biológicos;

A linhagem de levedura RN1016 recebeu o gene *XylA*, que a tornou apta a utilizar xilose como fonte de carbono. Devido a esta característica introduzida é possível isolar esta linhagem de outras linhagens de levedura através do cultivo em meio de cultura mínimo contendo o açúcar xilose como única fonte de carbono assimilável. A levedura RN1016 terá a capacidade de se desenvolver neste meio, ao contrário das demais leveduras selvagens. Um exemplo da utilização eficiente deste método pode ser encontrado no ítem 16.1 deste documento que avaliou o desempenho de RN1016 em co-cultivo com outras linhagens.

11.3. Métodos bioquímicos;

A detecção da proteína xilose isomerase de *Piromyces* sp. pode ser utilizada como uma forma de identificar a presença da levedura RN1016, ou até mesmo de seus derivados, em matrizes compostas. O teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é um método robusto e bastante utilizado para detecção e/ou quantificação de proteínas. Para emprego deste teste é necessário, além do kit oferecido por Empresas dedicadas, o anticorpo específico anti-xilose isomerase de *Piromyces* sp. Este anticorpo pode ser produzido ou encomendado com Laboratórios e Empresas capacitadas.

12. O padrão de herança genética do gene inserido;

A Linhagem de levedura RN1016 não apresenta esporulação, por este motivo sua reprodução se dá exclusivamente pelo sistema vegetativo. Este sistema de reprodução é baseado na divisão celular mitótica, quando a célula se duplica dando origem a uma célula filha idêntica.

Tendo isso em vista, observamos que ao longo do processo de desenvolvimento da Linhagem RN1016, bem como durante toda experimentação da avaliação de biossegurança, pôde-se observar plena estabilidade fenotípica da Linhagem com relação à característica introduzida.

Esta observação, aliada ao fato de não ocorrer esporulação pela Linhagem RN1016, demonstra que o gene *XylA* inserido no genoma se comporta como um gene endógeno da levedura, sendo transferido naturalmente ao longo das gerações das células de levedura.

O item 14 explora o grau de estabilidade genotípica da característica introduzida. As observações deste item corroboram com a observação referente ao padrão de herança genética do gene *XylA*.

13. A descrição dos efeitos pleiotrópicos e epistáticos do gene inserido, quando observados;

13.1. Introdução;

A pleiotropia é definida como 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 de um gene pleiotrópico tem efeito sobre um ou todos estes fenótipos simultaneamente (Dudley *et al*., 2005; He & Zhang, 2006; Stearns, 2010).

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 (Zheng *et al*., 2010; Knight *et al*., 2006).

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 desenvolvimento (Granek *et al*., 2011). 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 (Snitkin & Segre, 2011; Segrè *et al*., 2005).

As manipulações genéticas empregadas no desenvolvimento da linhagem RN1016 incluíram a inserção de um gene exógeno, aumento da expressão de genes endógenos e deleção de um gene. No entanto, diferentes análises fenotípicas comparando este OGM com a linhagem parental CEN.PK demonstraram que não houveram efeitos adversos, pleiotrópicos ou epistáticos, em função de tais manipulações em diversos testes independentes.

Sabe-se que efeitos de interação são frequentemente observados em características fenotípicas. Muitos exemplos na literatura utilizam marcadores

fenotípicos para exemplificar efeitos de interação gênicas, como a cor da crista de aves, plumagem de periquitos, cor de olhos e outros. Leveduras da espécie *S. cerevisiae* possuem alguns marcadores utilizados para caracterização de linhagens, como o perfil da curva de crescimento, o consumo de açúcares e o desempenho fermentativo. Tendo isso em vista, alguns experimentos foram conduzidos de modo a comparar a linhagem RN1016 com seu correspondente não GM (CEN.PK) frente a estes marcadores, de maneira a avaliar eventuais efeitos de interação, pleiotrópicos ou epistáticos.

13.2. Materiais e métodos;

Cultivo das linhagens CEN.PK e RN1016

A partir de culturas permanentes foram preparados inóculos independentes das linhagens CEN.PK e RN1016 em 5 mL de meio YPD 2% (20 g/L de Peptona; 10 g/L extrato de levedura e; 20 g/L glicose). Após 14 horas de crescimento a 30ºC e agitação de 250 rpm, cada inóculo foi transferido para três *erlenmeyers* (réplicas) contendo 100 mL de YPD 2%. Novamente as culturas foram mantidas a 30ºC sob agitação de 250 rpm. Alíquotas de 1,5 mL (para cada *erlenmeyer*) foram coletadas após a primeira hora e posteriormente em intervalos de duas horas. Durante 11 horas de cultivo o crescimento das culturas foi quantificado através da densidade ótica a 600 nm (OD_{600}), medida em espectrofotômetro (Ultraspec 300 – Pharmacia Biotech) a cada ponto coletado. Em seguida, cada amostra coletada foi centrifugada, filtrada e estocada a -20ºC para posterior quantificação dos substratos e produtos da fermentação por HPLC.

Análise de substratos e produtos por HPLC

A quantificação da glicose e etanol de cada amostra coletada foi realizada por cromatografia liquida de alta eficiência utilizando o cromatógrafo Alliance HT (Waters) com detector de índice de refração acoplado, utilizando a coluna HPX-87H (300mm x 78mm – BioRad) previamente aquecida em um

forno a 35ºC. Uma solução H_2SO_4 2 mM foi utilizada como fase móvel com um fluxo de 0,6 mL/min.

Estimativa do desempenho fermentativo de CEN.PK e RN1016

Para comparação entre as linhagens foram utilizados 2 parâmetros de desempenho da fermentação: i) rendimento; definido como a massa de produto formado por unidade de massa de substrato consumido (g/g) e; ii) Produtividade Volumétrica; definida como a massa de produto formado por unidade de volume e unidade de tempo (g/L.h). Para estes experimentos, os parâmetros de performance foram calculados em função das concentrações da glicose e do etanol no início e no final da fermentação e a diferença entre as médias foi avaliada pelo teste estatístico *t-student*.

13.3. Resultados e discussão;

Nenhuma diferença significativa foi encontrada em diversos experimentos independentes comparando marcadores fenotípicos da linhagem RN1016 com sua linhagem parental CEN.PK, indicando que não existem evidências de efeitos de interação em função das modificações genéticas presentes neste OGM.

Adicionalmente, na comparação da curva de crescimento das linhagens RN1016 e CEN.PK em meio contendo glicose como fonte de carbono não observou-se diferença significativa no crescimento. Desta forma, podemos inferir a inexistência de efeitos pleiotrópicos ou epistáticos, gerados pelas manipulações genéticas, sobre genes que regulam o crescimento. Como demonstrado na Figura 27, nenhuma diferença significativa foi encontrada ao longo de 11 horas de fermentação.

As culturas de CEN.PK e RN1016 foram iniciadas com uma OD_{600}=0,4±0,007 e OD_{600}=0,4±0,011 respectivamente. É possível notar que após três horas iniciou-se a fase *log* (crescimento exponencial), neste ponto amostrado a linhagem CEN.PK apresentou OD_{600}=1,38±0,03 e a RN1016 apresentou OD_{600}=1,41±0,02. Nove horas após o início do cultivo ocorre o fim da fase *log* e início da fase estacionária, novamente não são observadas

diferenças significativas entre a linhagem CEN.PK (OD_{600}=8,37±0,12) e RN1016 (OD_{600}=8,24±0,22) (Figura 27).

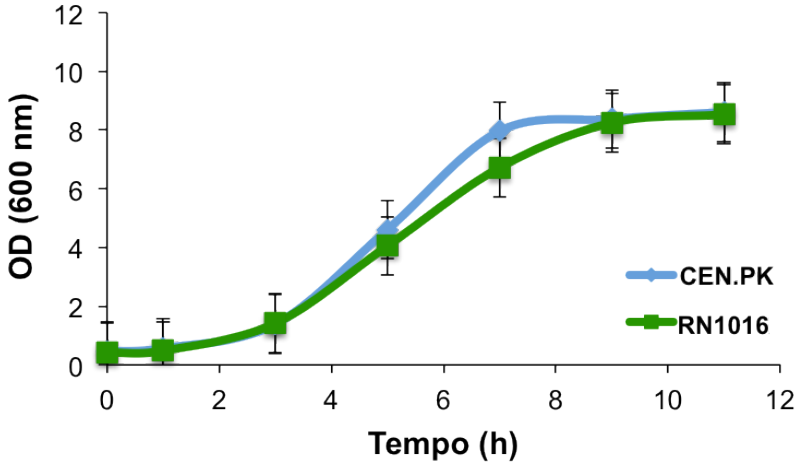

Figura 27. Curva de crescimento das linhagens CEN.PK e RN1016 em meio YDP 2% contendo glicose como única fonte de carbono. Não houve diferença significativa entre as duas linhagens.

Da mesma forma, nenhuma diferença significativa foi encontrada na avaliação dos marcadores fenotípicos consumo de glicose e produção de etanol. A quantificação destes marcadores é apresentada na Figura 28, indicando que não há interação pleiotrópica ou epistática entre os genes manipulados e os que participam das vias de consumo de glicose e síntese de etanol na levedura RN1016.

As culturas foram iniciadas com aproximadamente 18 g/L de glicose (CEN.PK=18,51±0,05 g/L; RN1016=18,31±0,24). Com três horas de cultivo, ou seja, no período que se inicia o crescimento exponencial de ambas as linhagens, é observado a aceleração no consumo de glicose e produção de etanol. Neste ponto, a quantidade de glicose disponível nas culturas de CEN.PK e RN1016 é igual a 16,16±0,05 g/L e 16,62±0,07 g/L respectivamente, enquanto a quantidade de etanol produzida é de 1,55±0,003 g/L e 1,54±0,023 para CEN.PK e RN1016, respectivamente. Nove horas após o início do cultivo, ponto que representa o início da fase estacionária, observou-se que praticamente toda glicose é consumida (CEN.PK=0,17±0,003 g/L; RN1016=0,18±0,005), enquanto a produção de

etanol alcança o maior valor (CEN.PK=8,37±0,11 g/L; RN1016=8,36±0,08 g/L).

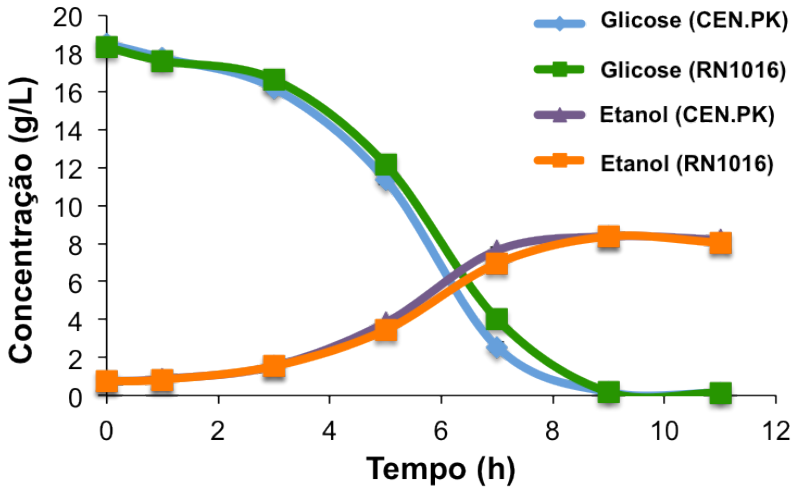

Figura 28: Quantificação do consumo de glicose e produção de etanol das linhagens CEN.PK e RN1016 em meio YEPD 2% contendo glicose como única fonte de carbono. Não houve diferença significativa entre as duas linhagens.

A partir dos dados obtidos pela quantificação do consumo de glicose e da produção de etanol foram estimados 2 parâmetros de desempenho fermentativo para ambas as linhagens; (i) rendimento e (ii) produtividade volumétrica. Nesta comparação não é observada diferença estatisticamente significativa entre as médias destes parâmetros. As linhagens CEN.PK e RN1016 tiveram um rendimento de etanol de 0,44±0,008 g/g e 0,44±0,005 g/g (t=0,7; $t_{(4;0,05)}$=2.78); com uma produtividade volumétrica de etanol de 0,74±0,013 g/Lh e 0,73±0,003 g/Lh (t=0,23; $t_{(4;0,05)}$=2.78), respectivamente (Figura 29).

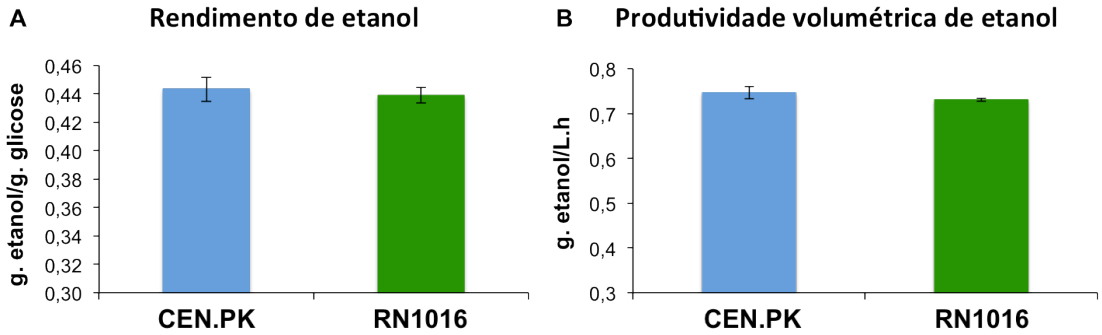

Figura 29: Parâmetros de desempenho fermentativo das linhagens CEN.PK e RN1016 cultivadas em YPD 2% contendo glicose como única fonte de carbono. A) Rendimento de etanol a partir da glicose. B) Produtividade volumétrica de etanol. Não é observada diferença estatisticamente significativa entre as médias do Rendimento (t=0,7; $t_{(4;0,05)}$=2.78) e da produtividade volumétrica (t=0,23; $t_{(4;0,05)}$=2.78) a 95% de confiança.

13.4. Conclusão;

A avaliação dos marcadores fenotípicos da levedura RN1016 em comparação com seu parental não GM (linhagem CEN.PK) mostraram equivalência consistente entre as duas linhagens. Os marcadores de curva de crescimento, consumo de glicose e rendimento fermentativo avaliam diretamente um número grande de genes que participam destes processos biológicos da célula.

Ao longo do processo de desenvolvimento e otimização da linhagem RN1016, descrito em detalhes na literatura científica (Kuyper *et al*., 2003; Kuyper *et al*., 2004; Kuyper *et al*., 2005a; Kuyper *et al*., 2005b; van Maris *et al*., 2007), pôde-se direta e indiretamente avaliar uma série de características da levedura, que refletem diretamente o funcionamento de muitos genes da espécie. Estas observações também puderam ser feitas nos diversos experimentos de avaliação da biossegurança desta linhagem apresentados neste relatório.

Em conjunto, os resultados apresentados neste item, somados às observações feitas nos demais experimentos deste relatório e nos artigos publicados, fornecem uma evidência consistente de que as modificações genéticas incluídas na levedura RN1016 não é causadora de efeitos de interação gênica evidentes ou de alguma forma associados a efeitos indesejados.

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

14.1. Estabilidade genotípica da Linhagem RN1016;

As leveduras em geral são organismos de alta estabilidade genotípica. Fenômenos de alteração da frequência alélica, mutações, rearranjos, inserções e deleções são fundamentais para o surgimento de variabilidade genética (Lynch *et al*., 2006; Nei, 2007; Rifkin *et al*., 2005). A permanência destas alterações genéticas na população depende do efeito adaptativo de cada uma, podendo atingir alta frequência em poucas gerações, como também desaparecer já no indivíduo de origem ou primeiras progênies, no caso de ser deletéria.

Estudos demonstram que, dentre as fases do desenvolvimento da levedura, a meiose é particularmente importante para geração de alterações genotípicas, devido principalmente aos eventos de duplicação cromossômica e, mais ainda, a recombinação (Magni & Borstel, 1962; Rattray *et al*., 2001). Um estudo conduzido por Nishant e colaboradores (2010) avaliaram a estabilidade genotípica de leveduras durante as fases vegetativa e sexual. O estudo se baseou na frequência de mutações no genoma completo de *S. cerevisiae* após diversos ciclos, sexuais ou vegetativos. Os autores observaram que as taxas de mutação são extremamente baixas no genoma de levedura para ambos os casos, e que no caso da levedura que não teve ciclo sexual (vegetativo), as taxas de mutação foram cerca de 55 vezes inferiores à das leveduras de ciclo sexual. Os dados demonstram que a estabilidade genotípica já observada na espécie *S. cerevisiae* é ainda maior em linhagens que possuem ciclo exclusivamente vegetativo de desenvolvimento (Nishant *et al*., 2012), como a RN1016.

Conforme discutido no item 1 do Anexo IV, a levedura RN1016 não apresenta esporulação devido a sua constituição genética tipo MATa/MATa. Por este motivo as células desta linhagem não sofrem meiose e, portanto, não estão sujeitas aos fenômenos inerentes à meiose, como os eventos de recombinação meióticos. Esta observação corrobora com a observação da alta estabilidade genotípica da Linhagem RN1016.

A introdução de genes exógenos em organismos geralmente está vinculada a incorporação de características específicas, que em determinada condição garantem maior adaptabilidade (*fitness*) ao organismo ou, no mínimo, não interferem negativamente em seu vigor adaptativo. A introdução do gene *XylA* permitiu à levedura RN1016 metabolizar açúcares de 5 carbonos. Essa característica permite que essa linhagem sobreviva em condições de abundância desse tipo de açúcar. Ao longo das etapas de pesquisa e desenvolvimento da Linhagem RN1016, foram feitas extensivas avaliações de performance comparativa, comportamento celular, curva de crescimento, metabolização de açúcares e extensiva avaliação de biossegurança. Em todos estes processos as células da Linhagem RN1016 se mostraram plenamente estáveis para a característica introduzida. O comportamento da linhagem foi acompanhado por centenas de gerações ao longo do processo de engenharia evolutiva pós transformação genética. Durante todo esse processo observou-se a estabilidade da Levedura RN1016 com relação à característica introduzida.

Como forma de demonstrar experimentalmente a estabilidade genotípica da Linhagem para a característica de interesse, utilizou se duas abordagens distintas: a molecular e a bioquímica. Ambos os experimentos são descritos a seguir.

14.1.1. Estabilidade genotípica de RN1016 – Avaliação Molecular;

A estabilidade do gene que codifica a xilose isomerase, integrada no genoma da linhagem RN1016, foi testada por métodos moleculares por mais de 50 gerações (96 horas de cultivo). A levedura foi cultivada em meio YPD (18% de glicose) a 30°C, sob agitação de 250 rpm e alíquotas foram retiradas de 12 em 12 horas. As células foram separadas do meio de cultura por centrifugação e a extração de DNA genômico foi realizada segundo protocolo de Ausubel (1998). O DNA obtido foi utilizado na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: 5'-ATGGCTAAGGAATATTTCC - 3' e 5'-TTATTGGTACATGGCAACA - 3' que amplificam a sequência completa do gene *XylA* (1314 pares de bases), a fim de determinar a estabilidade do mesmo no genoma da linhagem RN1016.

As reações de PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% para separação dos fragmentos amplificados. A presença do fragmento íntegro de DNA de 1314 pb em todos os tempos coletados, aliado à ausência de fragmentos de tamanhos distintos, confirma a estabilidade do gene que codifica a xilose isomerase no genoma da RN1016. O experimento foi realizado em triplicata. Este experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Genômica e Expressão – IB/UNICAMP.

As Figuras 30 a 32 mostram os resultados obtidos.

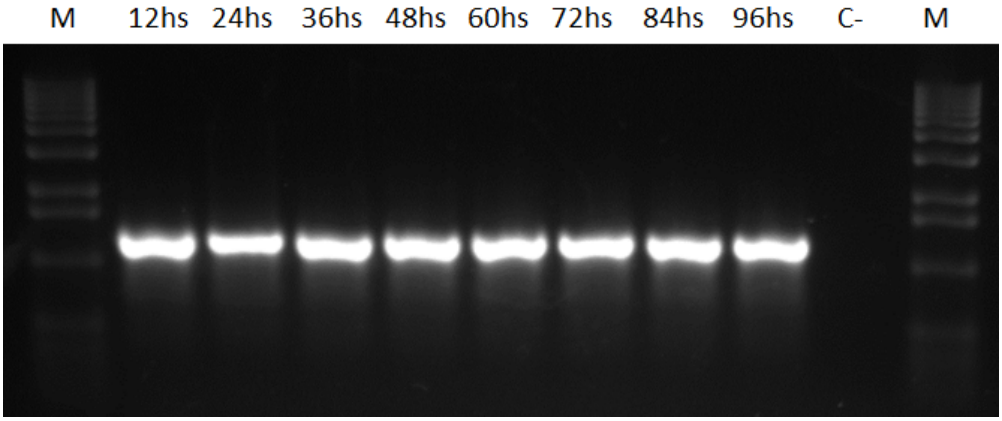

Figura 30. Estabilidade do gene *XylA* no genoma da linhagem RN1016**. Repetição 1**. Amplificação específica do tamanho esperado nos diferentes tempos de coleta que representam mais de 50 gerações. Não observa-se qualquer alteração do gene de interesse. (M) Marcador de tamanho molecular; (C-) branco - controle negativo (reação de PCR realizada sem DNA)

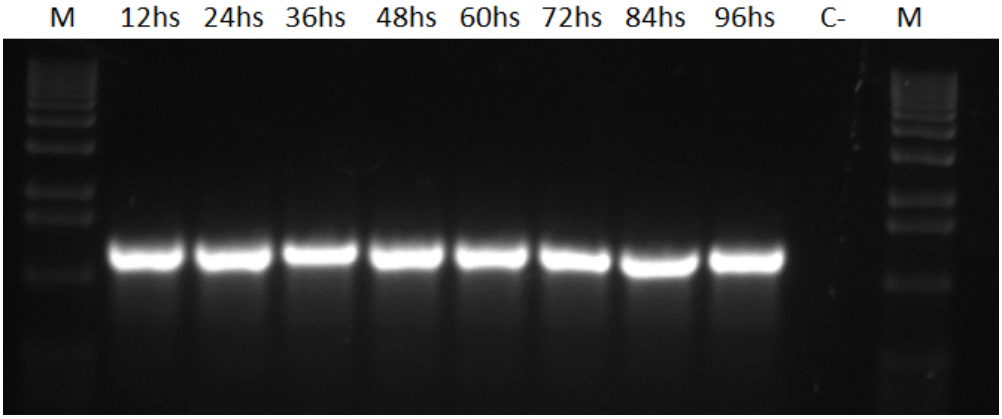

Figura 31. Estabilidade do gene *XylA* no genoma da linhagem RN1016. **Repetição 2**. Amplificação específica do tamanho esperado nos diferentes tempos de coleta que representam mais de 50 gerações. Não observa-se qualquer alteração do gene de interesse. (M) Marcador de tamanho molecular; (C-) branco - controle negativo (reação de PCR realizada sem DNA).

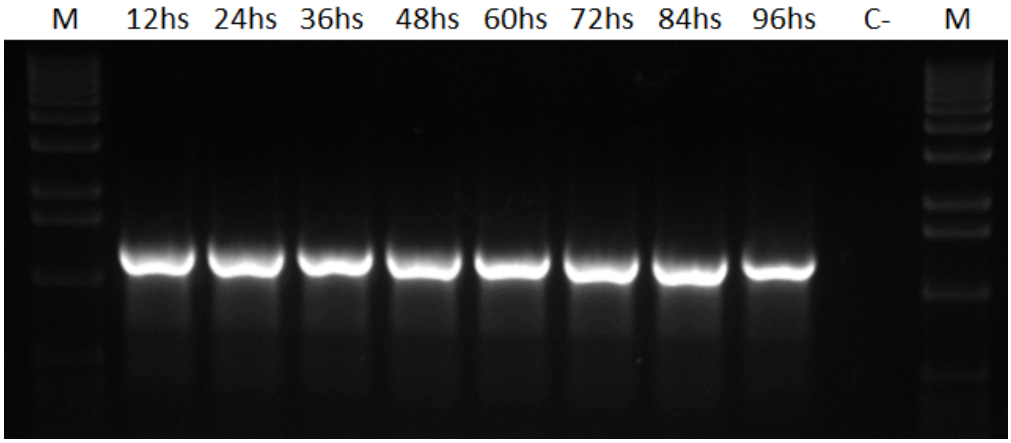

Figura 32. Estabilidade do gene *XylA* no genoma da linhagem RN1016. **Repetição 3**. Amplificação específica do tamanho esperado nos diferentes tempos de coleta que representam mais de 50 gerações. Não observa-se qualquer alteração do gene de interesse. (M) Marcador de tamanho molecular; (C-) branco - controle negativo (reação de PCR realizada sem DNA).

Os resultados apresentados mostram que o gene integrado no genoma da Linhagem RN1016 não sofreu alterações relativas a recombinações, deleções, e rearranjos. A construção se mostrou estável ao longo de aproximadamente 50 gerações avaliadas. Estes resultados moleculares corroboram a hipótese de estabilidade genotípica e as observações feitas durante todo o processo de desenvolvimento e avaliação biossegurança da linhagem RN1016.

14.1.2. Estabilidade genotípica de RN1016 – Avaliação Bioquímica.

Os testes bioquímicos de estabilidade genotípica de RN1016 para a característica introduzida foram conduzidos para avaliar a manutenção da característica ao longo de muitas gerações na ausência do metabólito relacionado. Este experimento foi conduzido pela Empresa DSM N.V. in Heerlen (Delft – Holanda).

Sabe-se que determinada característica expressa em um organismo, quando não necessária para sua sobrevivência ou adaptabilidade, pode ter sua frequência alélica reduzida ou até mesmo eliminada da população. Partindo da hipótese de que a construção gênica de *XylA* apresenta estabilidade genotípica, o cultivo por muitas gerações em um meio deficiente do açúcar xilose não poderia levar a alterações na estrutura ou expressão do gene. Com esse objetivo, um experimento foi conduzido conforme descrito abaixo.

Um inóculo fresco da levedura RN1016 foi utilizado para iniciar uma cultura celular em 100mL de meio YPD (2% de glicose) sem adição de xilose. Essa cultura foi mantida sob agitação constante a 30°C. Ao final do consumo de toda glicose disponível no meio essa cultura era reciclada, adicionando-se 100μL de cultura em 100mL de um novo meio YPD (2% glicose), assemelhando-se a um processo industrial de batelada. Esse processo foi repetido por 10 vezes, e cada ciclo de consumo de glicose correspondeu a aproximadamente 10 gerações das células de levedura, totalizando mais de 100 gerações ao final dos 10 ciclos de cultura em meio sem xilose.

Ao final do último ciclo, uma amostra da cultura foi utilizada como inóculo para um ensaio de fermentação em meio mineral suplementado com 2% de xilose, 2% de glicose e 5% de ácido acético. O ácido acético é componente natural do hidrolisado utilizado na usina de etanol 2G, e foi adicionado para aumentar a semelhança com o processo industrial. Esta fermentação foi feita em um biorreator de bancada utilizando-se um sistema AFM (*Alcohol Fermentation Monitor*). Durante 50 horas o processo fermentativo foi avaliado pelo AFM para acompanhamento da produção de etanol através da geração de CO_2.

Como controle da fermentação, utilizou-se um inóculo fresco da mesma origem do inóculo usado no experimento de reciclo celular.

A produção de etanol no ensaio de fermentação reflete o perfil de atividade do gene introduzido *XylA*, uma vez que a conversão de xilose presente no meio é mediada por este gene. Nas Figuras 33 e 34, respectivamente, pode-se observar o perfil em tempo real e acumulado de produção de etanol ao longo de 50 horas de fermentação.

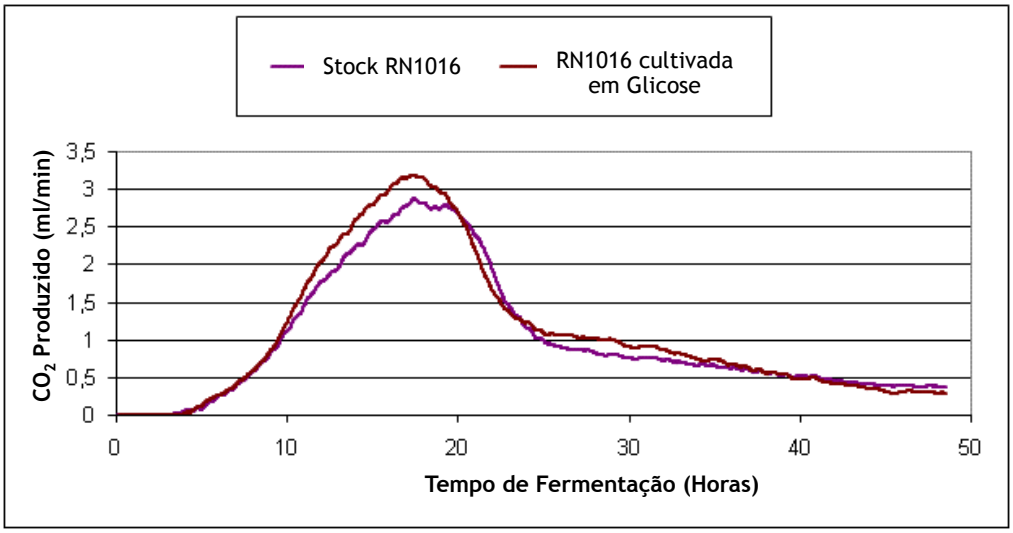

Figura 33. Avaliação em tempo real da produção de etanol em biorreator pela levedura RN1016. Linha roxa: inoculo fresco. Linha vermelha: células recicladas durante 10 ciclos de cultura em meio sem xilose (~100 gerações). Medição feita através da detecção de CO_2 por AFM. Observa-se padrão equivalente para ambos os inóculos.

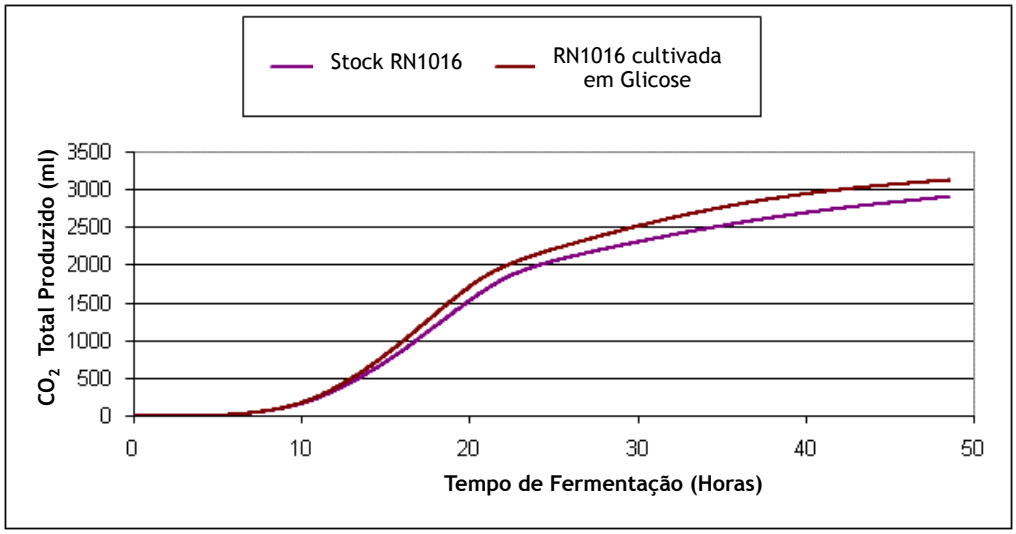

Figura 34. Avaliação da produção acumulada de etanol pela levedura RN1016. Linha roxa: inoculo fresco. Linha vermelha: células recicladas durante 10 ciclos de cultura em meio sem xilose (~100 gerações). Medição feita através da detecção de CO_2 por AFM. Observa-se padrão equivalente para ambos os inóculos.

Observa-se que a levedura RN1016, mesmo após mais de 100 gerações de cultivo em meio sem o açúcar xilose, permaneceu equivalente ao inóculo inicial para a produção de etanol em processo de fermentação. A ausência do substrato da enzima xilose isomerase por um tempo significativo não ocasionou alteração na frequência alélica ou mesmo na expressão do gene introduzido, que continuou a expressar a característica desejada após muitas gerações sem o substrato xilose.

Este resultado demonstra a estabilidade genotípica da característica introduzida na levedura RN1016.

14.2. Conclusões;

A estabilidade genotípica da característica introduzida na Linhagem RN1016 de *S. cerevisiae* foi demonstrada por avaliação molecular por cerca de 50 gerações e por avaliação bioquímica por aproximadamente 100 gerações. Durante todo o processo de desenvolvimento e avaliação da biossegurança da linhagem observou-se plena estabilidade para a característica introduzida. Estes resultados e observações corroboram as diversas informações encontradas na literatura que destacam a *S. cerevisiae* como um organismo de alta estabilidade genotípica (Nishant *et al*., 2010).

Conclui-se que a Linhagem RN1016 apresenta estabilidade genotípica para a característica introduzida.

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;

A Linhagem RN1016 recebeu apenas um gene exógeno, o gene codificador da xilose isomerase, do organismo não patogênico *Piromyces* sp. Desta forma, este ítem não se aplica ao presente pleito.

No entanto, cabe ressaltar que a enzima xilose isomerase é uma enzima bastante conhecida e descrita na literatura, que tem como substrato o açúcar xilose de 5 carbonos.

No caso de uma interação indesejada, muito provavelmente esta linhagem seria naturalmente eliminada da seleção, por performance inferior, ou teria um fenótipo observável durante as fases do desenvolvimento desse OGM ou dos experimentos da Avaliação de Biossegurança. O item 13 deste documento endereça especificamente a questão de interações gênicas no microrganismo. Conforme observamos nos resultados apresentados, a Linhagem RN1016 não apresenta qualquer alteração bioquímica ou fenotípica, mesmo em condições de estresse, que indicariam a ocorrência de interações gênicas.

Desta forma conclui-se que as modificações genéticas empregadas na Linhagem de levedura RN1016 não ocasionam interações com efeitos adversos, seja entre os genes manipulados, seja com os demais genes do genoma.

16. As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos;

A Linhagem de *S. cerevisiae* RN1016 foi modificada geneticamente para se tornar apta a utilizar a xilose (5 carbonos) como fonte de açúcar no processo de fermentação. Para tanto introduziu-se por recombinação homóloga o gene da xilose isomerase de *Piromyces* sp., genes nativos da levedura tiveram sua expressão aumentada e outro gene foi removido do genoma.

Todos os genes de alguma forma manipulados nesta linhagem de levedura são componentes da via do metabolismo de açúcares da célula. Mais precisamente são genes da via da xilose isomerase que integra a via das pentoses-fosfato. Estes genes têm atividades específicas muito bem descritas na literatura (ver ítem 3 deste relatório), e nenhum deles está relacionado de forma direta ou indireta às características de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos.

Os experimentos detalhados no ítem VI deste documento, referentes à Análise de Risco ao Meio Ambiente, demonstram que a linhagem RN1016 não possui qualquer característica diferente de seu equivalente convencional com relação a capacidade de reprodução, sobrevivência ou disseminação. Com relação a outras linhagens como Pedra-2 e CAT1, comerciais selvagens brasileiras, a linhagem RN1016 se mostrou inferior nos experimentos de competição em diferentes meios de cultivo e persistência no solo.

Com base nos resultados experimentais apresentados, e na vasta quantidade de informações disponíveis sobre estes genes na literatura, pode-se afirmar que as modificações genéticas incluídas na linhagem RN1016 não alteraram sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes para outros organismos.

Adicionalmente, para avaliar a possível vantagem adaptativa da levedura RN1016 frente a outras linhagens comerciais, bem como seu correspondente convencional, procedeu-se um completo ensaio de competição em diferentes meios de cultura.

16.1. Ensaios de Competição;

Observação: Nesta seção são apresentados experimentos de competição da levedura RN1016 com relação a seu correspondente não geneticamente modificado. Este ítem completo é repetido no Apêncide Confidencial incluindo testes adicionais de competição com linhagens comerciais brasileiras, e portanto representam informações de valor comercial e estratégico.

16.1.1. Introdução;

A taxa de divisão celular das leveduras varia de acordo tanto com sua constituição genética (fatores bióticos) quanto com as condições em que são cultivadas (fatores abióticos). Os principais fatores abióticos que influenciam a reprodução de *Saccharomyces cerevisiae* são: temperatura, pH do meio, agitação e quantidade de nutrientes (Dickinson & Schweizer, 2004).

Uma maneira de avaliar se uma determinada linhagem possui um crescimento mais vigoroso que outra é através de ensaios de co-cultivo, ou competição. Nestes ensaios, duas diferentes linhagens de leveduras são misturadas em uma proporção desejada (1:5; 1:2; 1:1) e então inoculadas em um meio de cultivo de interesse. Após vinte e quatro horas de cultivo, uma pequena alíquota da cultura (entre 0,5 a 2%) é transferida para um novo meio. Este período de cultivo até a transferência é determinado como um ciclo de cultivo.

Em um ensaio de competição são realizados de 6 a 20 ciclos, dependendo do desempenho de cada linhagem. A condução do ensaio com ciclos de cultivo possibilita que alterações na razão inicial do número de células de cada linhagem possam ser observadas mais facilmente durante o experimento, uma vez que o efeito é acumulativo ao longo dos ciclos.

Um fator importante deste protocolo é que pelo menos uma linhagem deve obrigatoriamente conter uma característica que diferencie-a da outra, como um gene repórter, um gene de resistência a antibiótico ou um marcador auxotrófico. Uma outra forma de diferenciar as linhagens é através de métodos moleculares de identificação, utilizando um padrão de PCR com

iniciadores específicos ou o perfil de cariotipagem cromossômica das colônias isoladas. Dessa forma, a diferenciação das linhagens pode ser obtida eficientemente por uma variedade de protocolos. Entretanto, os métodos microbiológicos de diferenciação são menos laboriosos, e portanto mais indicados para esta finalidade.

16.1.2. Materiais e Métodos;

Para avaliar o perfil de crescimento de RN1016 em co-cultivo, foram utilizadas três linhagens de *S. cerevisiae*: duas usadas comercialmente no Brasil para produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, Pedra 2 (PE-2) e CAT-1; e a linhagem parental não GM CEN.PK. O meio de cultivo completo YPD (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura) foi usado para avaliar a taxa de crescimento das linhagens utilizando condições padrão de laboratório (agitação, temperatura e nutrientes).

Adicionalmente, outras duas condições foram testadas para verificar o desempenho das linhagens frente aos fatores abióticos de dois distintos meios de cultivo: hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (similar ao que pretende-se usar na obtenção de etanol 2G em escala industrial) e xarope de cana-de-açúcar (usado atualmente para obtenção de etanol 1G pelas Usinas). A concentração de açúcares dos diferentes meios é apresentada na Tabela 11 e os parâmetros de temperatura e agitação foram mantidos constantes para todas as culturas.

Para diferenciação das linhagens foi utilizado um meio mínimo contendo xilose como fonte de carbono (2% xilose, 2% ágar, 0,67% *yeast nitrogen base* sem aminoácidos, 0,046% *drop-out* completo). Como a linhagem RN1016 é a única que possui um gene (XylA) capaz de metabolizar a xilose presente no meio, apenas as células provenientes desta linhagem na cultura irão crescer no meio mínimo de xilose, podendo assim ser diferenciada das demais linhagens.

Inicialmente, culturas de cada uma das quatro linhagens (RN1016, CEN.PK, PE-2 e CAT-1) foram cultivadas por 48 horas a 30°C em meio YPD sob agitação de 250 rpm para o preparo do pré-inóculo. Após este período, a

densidade ótica (DO) das culturas foi medida em espectrofotômetro para determinar a concentração de células presentes no meio (Tabela 11).

De modo a obter uma proporção inicial de células de 1:1 em cada ensaio de co-cultivo (RN1016 vs. CEN.PK; RN1016 vs. PE-2; RN1016 vs. CAT-1), as culturas de CEN.PK, PE-2 e CAT-1 foram individualmente misturadas com RN1016, de acordo com a DO do pré-inóculo de cada cultura (Tabela 11).

Tabela 11. Quantidade de cultura utilizada como inóculo nos ensaios de competição.

Experimento	Linhagem	DO ($_{600}$nm)	Volume usado (µL)
RN1016 vs. CEN.PK	RN1016	14,1	388
	CEN.PK	10,9	500
RN1016 vs. PE-2	RN1016	16,16	390
	PE-2	12,6	500
RN1016 vs. CAT-1	RN1016	18,72	500
	CAT-1	19,92	470

Os ensaios de competição foram conduzidos utilizando os seguintes meios de cultivo: YPD (20g/L), Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (80g de açúcares/L) e Xarope de cana-de-açúcar (160g de açúcares/L).
DO: média da densidade ótica do pré-inóculo. Para a estimativa do número inicial de células, foram usadas três réplicas biológicas.

Para verificar a razão inicial de células de cada linhagem, alíquotas de 25 µL de cada mistura (diluição 10^{-4}) foram plaqueadas em triplicata em ambos os meios sólidos (completo-YPD e seletivo-Xilose). Assim, uma razão de colônias de 1 (Seletivo) : 2 (Completo) significa o mesmo número de células das duas linhagens na mistura inicial de culturas.

Cada cultura, contendo RN1016 e a linhagem de interesse, foi utilizada como inóculo para o início dos ensaios de competição (co-cultivo). Para isto, as misturas de linhagens foram inoculadas em 5 mL de três diferentes meios (YPD, Hidrolisado e Xarope, conforme apresentado na Tabela 11), e mantidas a 30°C e 250 rpm. Para cada um dos três ensaios de competição, foram utilizadas quatro réplicas biológicas.

Após o período de 24 horas (dia inicial), uma alíquota de 50 µL de cada cultura (1%) foi transferida para novo meio de cultivo e um novo ciclo foi iniciado (Ciclo 1). Este processo foi repetido durante 9 dias consecutivos. Nos ciclos “3”, “6” e “9”, 25 µL de cultura (diluição 10^{-4}) foram novamente

plaqueados em ambos meios sólidos para verificar a razão de células referentes a RN1016 em relação ao número total de células. Na Figura 35 é apresentado uma representação esquemática de como os ensaios de competição foram conduzidos, com os pontos de amostragem para quantificação do número de células.

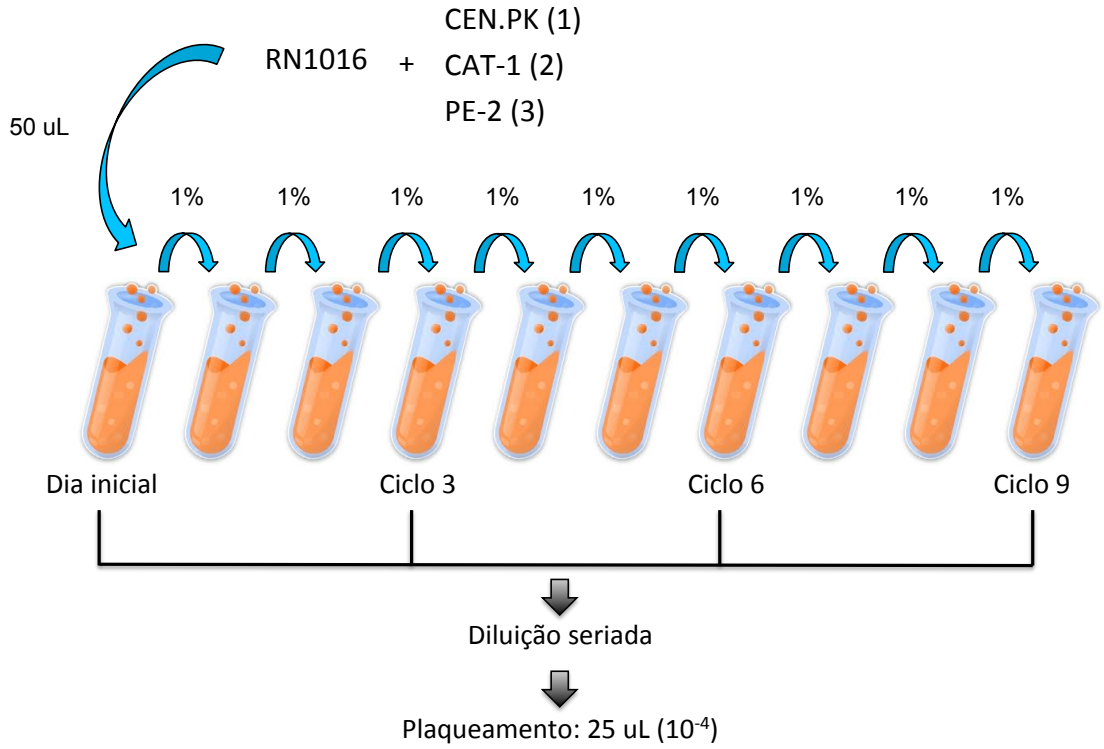

Figura 35. Representação esquemática dos ensaios de competição. O perfil de crescimento da linhagem RN1016 foi avaliado em três ensaios de competição utilizando as linhagens: CEN.PK (1); CAT-1 (2); e PE-2 (3). Para cada ensaio foram utilizados três diferentes meios de cultivo: YPD (20g/L), hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (80g/L) e xarope de cana-de-açúcar (160g/L) e quatro réplicas biológicas.

Dessa forma, desvios progressivos da razão inicial de células de aproximadamente 1:1 puderam ser observados ao longo do experimento quando uma linhagem apresentou um crescimento mais vigoroso que outra.

16.1.3. Resultados;

A estimativa da razão inicial de células de RN1016 para os três ensaios de competição ficou próxima do desejado com uma média de 1 : 0,9 (Tabela 12). Como descrito anteriormente, a razão de células presentes no

meio de cultivo foi obtida pelo número de colônias presentes na placa com meio seletivo pelo número de colônias na placa com meio completo (YPD). Assim, um valor de colônias de 1:2 (meio seletivo e YPD, respectivamente) significa que as duas linhagens estão presentes no meio de cultivo com o mesmo número de células, isto é, uma razão de 1:1.

Tabela 12. Contagem do número de colônias presentes na mistura inicial de linhagens utilizada como inóculo nos ensaios de competição.

Linhagem - Réplica	Meio seletivo	Meio completo	Razão de colônias	Razão de células
CEN.PK – 1	189	393	1 : 2,1	1 : 1,1
CEN.PK – 2	156	360	1 : 2,3	1 : 1,3
CEN.PK – 3	188	350	1 : 1,9	1 : 0,9
PE-2 – 1	147	276	1 : 1,9	1 : 0,9
PE-2 – 2	101	221	1 : 2,2	1 : 1,2
PE-2 – 3	111	239	1 : 2,2	1 : 1,2
CAT-1 – 1	308	462	1 : 1,5	1 : 0,5
CAT-1 – 2	283	477	1 : 1,7	1 : 0,7
CAT-1 – 3	327	512	1 : 1,6	1 : 0,6

Para avaliar o perfil de crescimento das diferentes cepas em co-cultivo foi utilizada como referência a linhagem RN1016. As colônias presentes no meio seletivo (xilose) e o valor "um" das razões são correspondentes a linhagem RN1016. Colônias presentes no meio completo (YPD) são derivadas de RN1016 e da linhagem usada no ensaio específico. A razão de células foi estimada a partir do número de colônias.

Ao final dos 9 ciclos de cultivo, apenas o ensaio de co-cultivo entre RN1016 e CEN.PK em meio de xarope de cana-de-açúcar apresentou um efeito neutro de crescimento entre as linhagens, ou seja, a razão original permaneceu razoavelmente constante até o final do experimento (Figura 36.B e E), sugerindo que as diferenças genéticas das linhagens são neutras nesta condição, e que a linhagem RN1016 é equivalente a seu correspondente convencional.

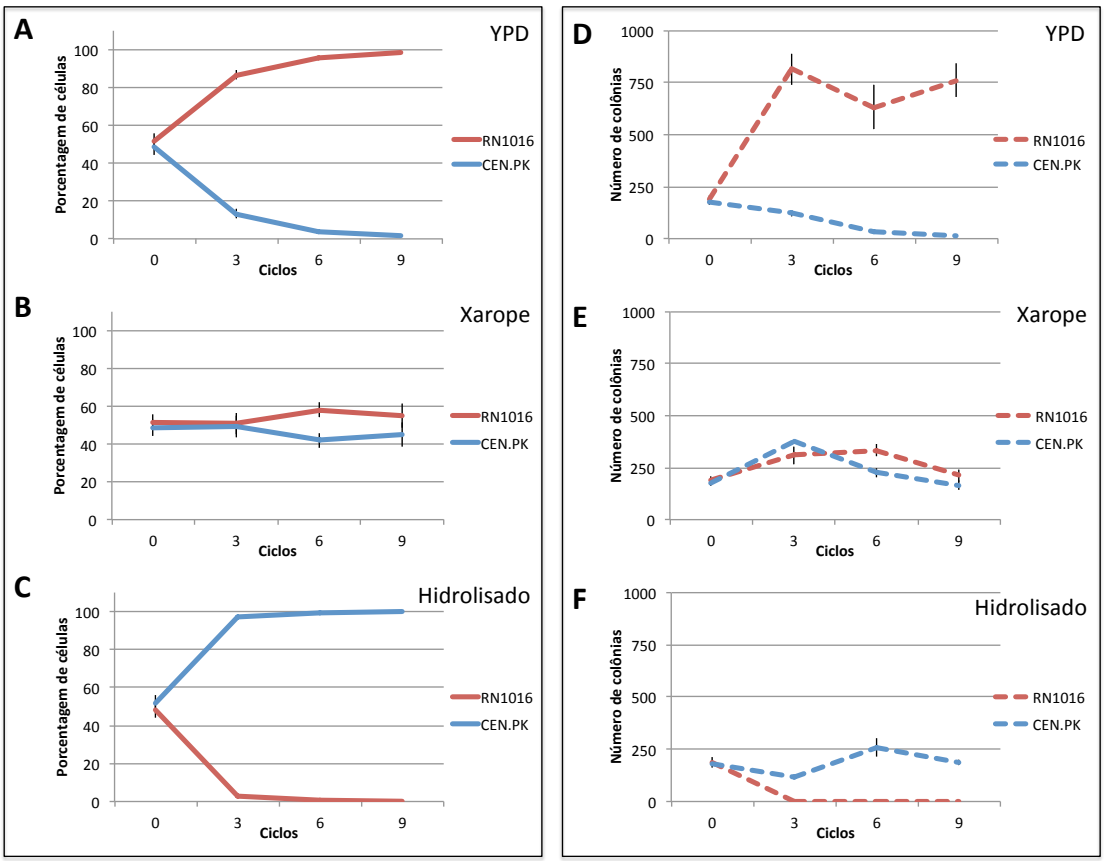

Figura 36. Desempenho das linhagens RN1016 e CEN.PK durante nove ciclos de co-cultivo. A-C: Porcentagem média de células. D-F: Número médio de colônias. Os desvios padrão apresentados nos gráficos são referentes a quatro réplicas biológicas. Os ensaios de competição foram conduzidos utilizando os meios de cultivo YPD (A e D), Xarope de cana-de-açúcar (B e E) e Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (C e F).

Entretanto, desvios nas proporções originais dos ensaios puderam ser progressivamente observados ao longo dos outros experimentos. A linhagem RN1016 apresentou um desempenho superior apenas quando co-cultivada no meio padrão de laboratório YPD com sua linhagem parental não modificada geneticamente (CEN.PK) (Figura 36A e D). Neste caso, a proporção de células de RN1016 foi aumentando gradativamente ao longo do experimento até atingir aproximadamente 98% do total de células da comunidade ao final do experimento. Neste caso, os fatores bióticos de RN1016 se sobressaíram sobre sua parental geneticamente não modificada, entre eles o fato de ser diploide e não possuir auxotrofia.

Na utilização do hidrolisado de palha a linhagem RN1016 se mostrou inferior ao seu correspondente convencional CEN.PK (Figura C e F). Em conjunto, as avaliações nos três diferentes meios indicam equivalência entre a linhagem RN1016 e a linhagem parentan não GM CEN.PK.

O mesmo experimento foi conduzido de modo a comparar a linhagem RN1016 com as linhagens comerciais Pedra-2 e CAT-1. Estes resultados são considerados de interesse estratégico e de potencial valor comercial para a Empresa, uma vez que indica performance de RN1016 comparativa à de linhagens comerciais. Desta maneira, estes resultados encontram-se disponíveis no Apêndice Confidencial que acompanha este Relatório de Biossegurança.

16.1.4. Conclusão;

Através dos dados obtidos nos ensaios de competição, pode-se concluir que a linhagem de *S. cerevisiae* geneticamente modificada RN1016 não possui vantagem adaptativa quando co-cultivada com outras linhagens selvagens (CEN.PK, PE-2 e CAT-1). Em geral esta linhagem apresentanda desempenho inferior e se torna ausente do meio de cultivo, dando lugar à linhagem competidora.

As modificações genéticas incluídas na levedura RN1016 não implicaram em características que favoreçam esta linhagem em comparação ao seu controle convencional e linhagens comerciais brasileiras.

RELATÓRIO DE BIOSSEGURANÇA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* LINHAGEM RN1016

AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL

Ref. ANEXO III, Resolução Normativa N°05

São Paulo, 15 de Março de 2013

Rod. Anhanguera, km 104,5. Cond. Unic, bloco A. Techno Park. CEP: 13016-330 – Campinas – SP
_Tel 55 (11) 2739 0500 _Fax 55 (11) 2739 0510

X – Avaliação de Risco a saúde humana e animal

A Resolução Normativa N°5 de 12 de março de 2008, define as normas para solicitação de liberação comercial de OGMs. O Anexo III desta Resolução determina as exigências técnicas referentes à Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal. Neste anexo define-se especificamente as normas para (A) Organismos consumidos como alimentos, e (B) Microrganismos utilizados como vacinas.

A levedura RN1016, objeto do presente pleito, não se enquadra nas exigências deste Anexo da Resolução Normativa N°5, uma vez que não será utilizada com alimento para seres humanos ou animais e não trata-se de microrganismo utilizado como vacina. A levedura RN1016 será utilizada para o único propósito de produção de etanol, sendo que nenhum resíduo de sua utilização será destinado a alimentação humana ou animal.

Apesar do disposto acima, optou-se por realizar uma avaliação do potencial alergênico da proteína xilose isomerase expressa na linhagem RN1016, bem como do organismo doador. Estas avaliações foram conduzidas conforme metodologia estabelecida por agências internacionais, e são apresentadas a seguir.

1. Avaliação do potencial alergênico da linhagem de levedura RN1016;

Tratando-se da avaliação dos riscos à saúde humana e animal, a RN-5 determina em seu anexo III (A) que seja informada "*a similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos..*". É importante ressaltar que esta exigência reserva-se ao processo de aprovação comercial de OGMs desenvolvidos com o propósito de serem consumidos como alimento, de forma que tais análises não se aplicam ao pedido de aprovação comercial da levedura RN1016, uma vez que esta linhagem e nenhum resíduo gerado no processo de produção de etanol será destinado à alimentação humana ou animal.

Apesar da demanda da RN-5 Anexo III (A) referente ao item 10 não se aplicar ao OGM em questão, avaliou-se o histórico das espécies do gênero *Piromyces* sp. bem como potencial alergênico da proteína codificada pelo gene exógeno *XylA*, com o objetivo de eliminar os potenciais riscos de ocorrer reações alérgicas provocadas pela exposição acidental de funcionários que operarão o processo. Neste contexto, a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a WHO (*World Health Organization*) definiram uma série de critérios para determinar o potencial alergênico de uma proteína introduzida em alimentos geneticamente modificados. Tais critérios são organizados em uma árvore de decisão na qual a homologia entre as sequências da proteína avaliada e alérgenos conhecidos é um passo chave para o processo de decisão, implicando na atribuição da provável alergenicidade para o OGM em questão (WHO 2001; WHO 2003) (Figura 39).

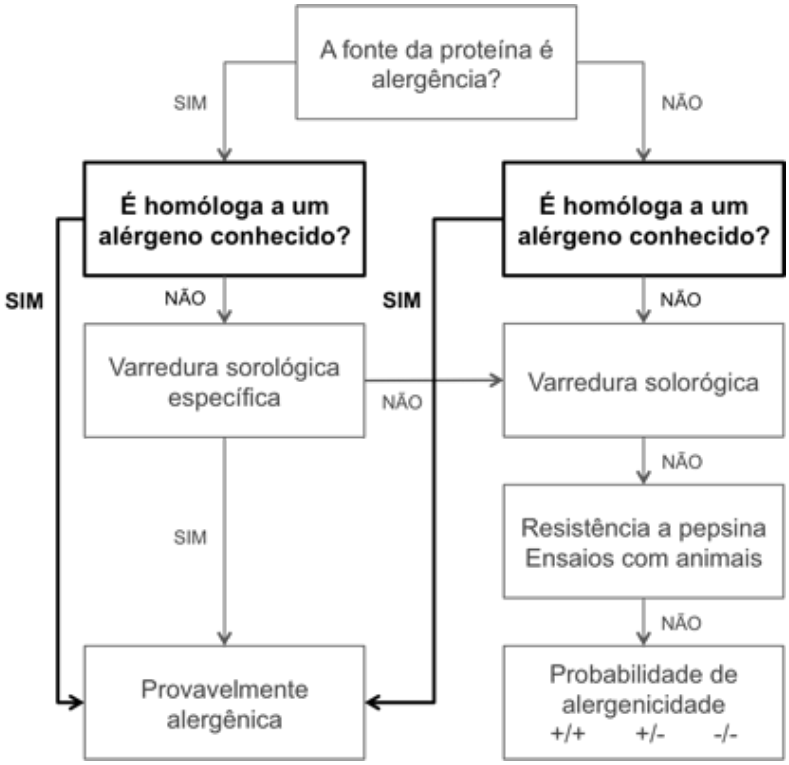

Figura 39. Árvore de decisão da FAO/WHO para avaliação da alergenicidade de alimentos geneticamente modificados (WHO 2001). Notar que a homologia a alérgenos é um passo chave para o processo de decisão. Adaptado de Ladics e Selgrade (2009).

O emprego da bioinformática, mais especificamente o uso de algoritmos para análise de homologia, proporciona um importante mecanismo para identificar proteínas potencialmente alergênicas. Neste contexto, a FAO/WHO recomendam o uso de banco de dados internacionalmente conhecidos como: SWISS-PROT/TrEMBL (Boeckmann, 2003) e PIR (Srinivasarao *et al*., 1999). Além disso, estabelecem que a possibilidade de reação cruzada entre a proteína estudada e um alérgeno conhecido deve ser considerada positiva quando i) há mais que 35% de similaridade entre as sequências dentro de uma extensão (janela) de 80 aminoácidos ou; ii) quando estas apresentarem identidade de 6-8 aminoácidos contínuos (WHO 2001; WHO 2003; WHO 2007).

Obedecendo os critérios mencionados foram realizadas buscas independentes por palavras-chave e análises de similaridade entre a proteína xilose isomerase e todas as proteínas alergênicas conhecidas. Para isto, utilizou-se o SDAP (*Structural Database of Allergenic Proteins*) (Ivanciuc *et al*., 2003; Ivanciuc *et al*., 2009), o qual integra os maiores bancos de dados

de sequências e de estrutura de proteínas, SWISS-PROT/TrEMBL, PIR, NCBI (Wheeler *et al*., 2007) e PDB (Berman *et al*., 2000), às ferramentas computacionais FASTA (Pearson & Lipmant, 1988) e BLAST (Altschul *et al*., 1997), possibilitando, dessa forma, a realização de diversos estudos relacionados à alérgenos.

1.1. Materiais e métodos;

Avaliou-se o potencial alergênico da linhagem RN1016 através das ferramentas de bioinformática do servidor *web* SDAP (http://fermi.utmb.edu/SDAP/) (última atualização em 20/08/2012). Este trabalho foi feito com auxílio do grupo de Bioinformática e Biologia Computacional do Laboratório de Genômica e Expressão do Instituto de Biologia / UNICAMP.

Organismo doador

O histórico de alergenicidade da *Piromyces* sp. foi avaliado através da ferramenta "SDAP – All Allergens" (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_src.html). Esta análise consistiu em verificar se os alérgenos conhecidos possuem alguma descrição relacionada à quaisquer espécies do gênero *Piromyces sp.* Para isto, foram utilizados os termos "Piromyces" e "xylose isomerase" como palavras-chave em buscas independentes. Os parâmetros de busca "*Select a Search Field: All fields*" e "*Serach all Allergens*" foram selecionados para uma busca mais abrangente.

Proteína exógena

A similaridade entre a sequência da proteína Xilose isomerase e alérgenos conhecidos foi avaliada de acordo com os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (WHO 2001; WHO 2003; WHO 2007). Para isto, foi utilizada a ferramenta "FAO/WHO Allergenicity Test" na interface *web* do SDAP (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_who.html). A sequência de aminoácidos da xilose isomerase foi submetida a dois testes independentes: i) "*FASTA alignments for an 80 amino acids sliding window; cutoff = 35*"; para identificar regiões com 35% de similaridade a cada janela de 80 aminoácidos; ii) "*Exact*

match for contiguous amino acids; number of contiguous amino acids = 8"; para identificar sequências de 8 aminoácidos idênticas. Em ambos os alinhamentos foi utilizado o algoritmo FASTA.

1.2. Resultados e discussão;

A inserção do gene exógeno codificador da xilose isomerase não torna a linhagem RN1016 potencialmente alergênica.

De acordo com a WHO, o passo inicial para acessar a possível alergenicidade de qualquer proteína é investigar: i) se o organismo do qual a proteína é proveniente apresenta histórico alergênico; ii) se há qualquer similaridade significativa entre a sequência da proteína e algum alérgeno e; iii) determinar as propriedades estruturais e físico-químicas, incluindo sua sensibilidade a degradação enzimática e possibilidade de reações cruzadas com IgEs. Além disso, prevê a realização de ensaios sorológicos e com animais modelo (WHO 2001; WHO 2003; WHO 2007).

Nenhum alérgeno foi encontrado nas buscas utilizando as palavras-chave "Piromyces", "xylose isomerase" ou "XylA" utilizando a ferramenta "SDAP – All alergens". No SDAP, cada alérgeno (um total de 1.526) possui inúmeras informações que são acessadas durante a busca por palavras-chave, entre as informações disponíveis destacam-se: i) o nome oficial do alérgeno, de acordo com a lista do IUIS[1] (*Union of Immunological Societies*); ii) o nome científico e comum da espécie; iii) o tipo e a descrição do alérgeno e; iv) o número para acesso da sequência através do SWISS-PROT, PIR ou NCBI (Ivanciuc *et al.,* 2009), de forma que o resultado obtido demonstrou a inexistência de histórico de alergenicidade para espécies do gênero *Piromyces* sp. e, da mesma forma, a inexistência de qualquer alérgeno descrito com xilose isomerase.

Além disso, é importante destacar que nessas buscas foram empregados parâmetros abrangentes da ferramenta "SDAP – All Allergens", sendo eles: i) "*Select a Search Field: All fields*" e ii) "*Serach all Allergens*". O primeiro parâmetro inclui todos os outros mais específicos ("*Allergen –*

[1] IUIS: subcomitê responsável por manter e desenvolver uma nomenclatura única, sistemática e inequívoca para proteínas alergênicas revisado por (Chapman, 2008). http://allergen.org/

scientific name"; "*Souce – cientific name*"; "*Source common name*"; "*Allergen description*" e "*Allergen type*") e implica que a palavra-chave utilizada foi buscada em todos as informações disponíveis para cada alérgeno. O segundo parâmetro significa que a busca compreende todas as proteínas que constituem a lista de alérgenos do WHO/IUIS, suplementada com informações da literatura e dos maiores bandos de dados de sequência e estrutura de proteínas SWISS-PROT, PIR, NCBI e PDB.

De acordo com a FAO/WHO (2007), o propósito das análises de similaridade baseada na sequência de aminoácidos é avaliar se a estrutura da proteína estudada é similar a alérgenos conhecidos, de forma que tal informação pode sugerir se a proteína em questão possui um potencial alergênico. Nas análises de homologia nenhuma similaridade significativa foi encontrada entre a proteína xilose isomerase e todos os 1.526 alérgenos depositados no SDAP. Na busca por similaridade acima de 35% (para janelas de 80 aminoácidos de extensão) foram gerados 358 alinhamentos a partir dos 437 aminoácidos da xilose isomerase. A porcentagem de homologia encontrada variou entre 10 e 31,25%, sendo que nenhum alinhamento resultou em uma similaridade igual ou acima de 35% (Figura 40), descartando a possibilidade de reação cruzada entre a xilose isomerase e alérgenos conhecidos (WHO 2007).

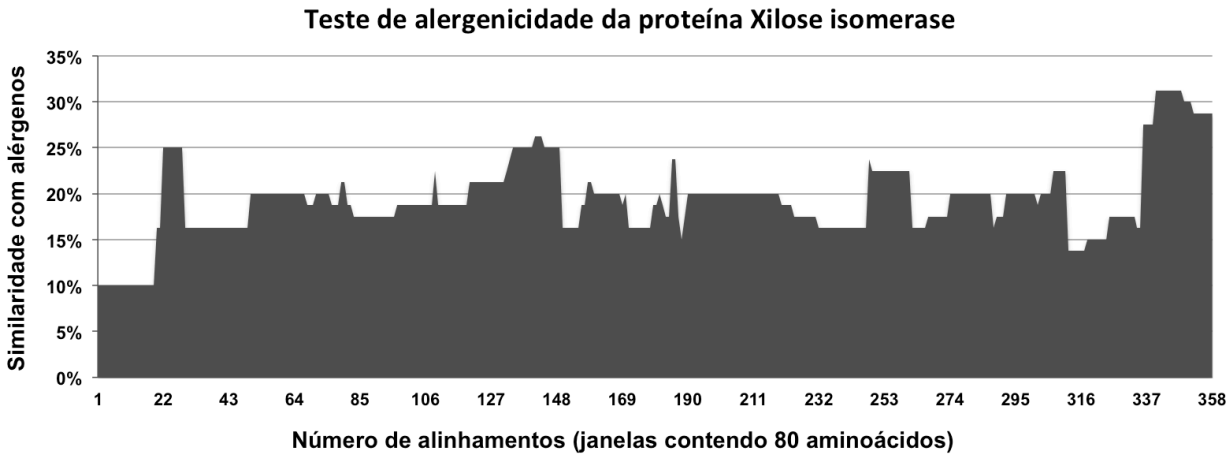

Figura 40: Teste de alergenicidade baseado na homologia da sequência de xilose isomerase de acordo com as regras da FAO/WHO (WHO, 2001). 358 comparações foram realizados a partir 437 aminoácidos da Xilose isomerase de *Piromyces* sp. Alinhamentos realizados com algoritmo FASTA para janelas deslizantes de 80 aminoácidos (http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_who.html).

Por fim, a sequência de aminoácidos da xilose isomerase foi submetida também ao teste de alergenicidade baseado na homologia entre sequência curtas de aminoácidos e alérgenos conhecidos. No total, 430 alinhamentos foram gerados utilizando sequências de 8 aminoácidos. No entanto, nenhuma similaridade significativa com alérgenos conhecidos foi encontrada.

A avaliação do potencial alergênico da linhagem RN1016 dedicou-se à investigação do histórico de alergenicidade de *Piromyces sp.* e à comparação da sequência de aminoácidos da xilose isomerase com todos os alérgenos conhecidos. A objetividade desta avaliação é justificada pela soma de dois fatores: i) de acordo com a WHO (2007) a ausência de homologia indica que a proteína estudada não é um alérgeno conhecido e que é improvável que esta apresente reação cruzada com um alérgeno já descrito. Embora a ausência de similaridade significativa deva ser considerada em conjunto com dados obtidos por outras estratégias, é importante notar que ii) as diretrizes citadas foram elaboradas para avaliação da biossegurança de alimentos derivados da biotecnologia e que, como citado anteriormente, nem RN1016 e nem os resíduos gerados no processo no qual esta será empregada, serão destinados à alimentação humana ou animal.

1.3. Conclusão;

O potencial alergênico da levedura RN1016 foi avaliado através da análise do histórico de alergenicidade das espécies do gênero *Piromyces* sp. e da comparação da proteína xilose isomerase com os alérgenos conhecidos, empregando metodologia validada de amplo uso internacional. Considerando tais análises, os resultados demostraram que a linhagem RN1016 não apresenta potencial alergênico e que, portanto, é equivalente a seu correspondente convencional para este característica.

RELATÓRIO DE BIOSSEGURANÇA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* LINHAGEM RN1016

AVALIAÇÃO DE RISCO AO MEIO AMBIENTE

Ref. ANEXO IV, Resolução Normativa N° 05

São Paulo, 15 de Março de 2013

Rod. Anhanguera, km 104,5. Cond. Unic, bloco A. Techno Park. CEP: 13016-330 – Campinas – SP
_Tel 55 (11) 2739 0500 _Fax 55 (11) 2739 0510

1. Sobre a possibilidade de o OGM produzir esporos e ser resistente ao dessecamento;

1.1. Introdução;

Em *Saccharomyces cerevisiae,* a produção de esporos, ou esporulação, é induzida quando as células diploides encontram-se em uma condição de deficiência de glicose e nitrogênio combinada com a presença de uma fonte de carbono não fermentescível. A formação de esporos envolve uma divisão celular completamente diferente do brotamento observado durante a mitose (Figura 41.A). 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 haploides organizadas em uma estrutura conhecida como tétrade (revisado por Neiman, 2011) (Figura 41.B-C).

O mecanismo molecular da esporulação é bem compreendido e as sucessivas fases envolvidas neste processo são promovidas por uma cascata de regulação transcricional que orquestra tanto a meiose quanto a formação de esporos (Smith & Mitchell, 1989; Mitchell, 1994; Chu & Herskowitz, 1998; Kassir *et al*., 2003). 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 diploides incluindo o fator de transcrição *NDT80* (*Non-DiTyrosine 80*) (Kassir *et al*., 1988; Hepworth *et al*., 1998; Guttmann *et al.,* 2002; Pierce *et al*., 2003; Kassir *et al*., 2003). 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* (Kassir *et al*., 1988; Smith *et al*., 1990; Su & Mitchell, 1993; De Silva-Udawatta & Cannon, 2001).

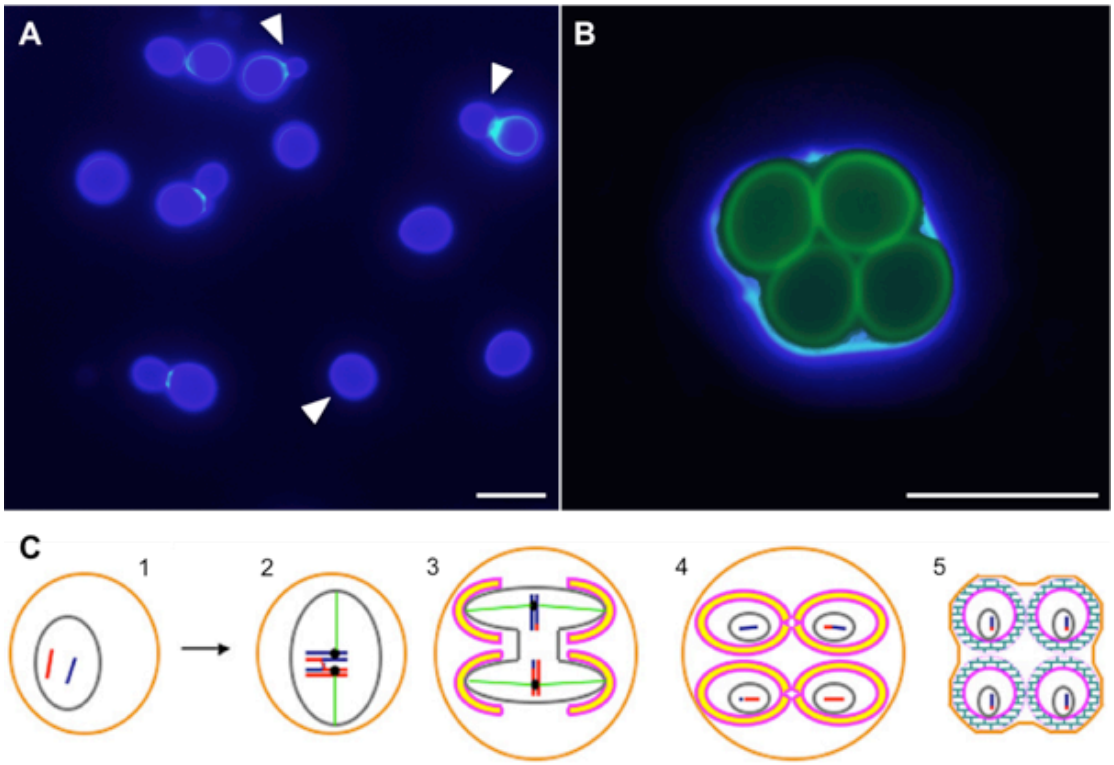

Figura 41. Diferentes fases da divisão celular na espécie *S. cerevisiae*. A) Células da linhagem diploide PE-2[2] dividindo por brotamento (mitose). Notar os diferentes estágios da divisão indicado pelo tamanho dos brotos (setas). B) Tétrade resultante da meiose de uma célula diploide da linhagem PE-2. Notar a presença dos quatro esporos (verde) organizados dentro de um asco (azul)[3]. Escala: 10 µm. Fonte: BioCelere. 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 Neiman (2011).

Em *S. cerevisiae* o termo *mating type* refere-se ao *locus MAT*. Este é constituído por dois alelos, a e α, que controlam o comportamento sexual de células haploides e diploides. Células haploides possuem um dos dois *mating types* (*MATa* ou *MATα*), se dividem vegetativamente por mitose mas são capazes de realizar meiose. Por outro lado, podem cruzar (por conjugação) com células de *mating type* oposto, gerando células diploides *MATa*/*MATα*.

[2]PE-2: levedura diploide amplamente utilizada na produção de etanol no Brasil.
[3]Células marcadas com Calcofluor White (azul) e FDA (verde) (Sigma-Aldrich 18909; F7378). Imagens capturadas em microscópio de epifluorescência Olympus-BX51 com câmara digital DP72 acoplada.

Células diploides (*MATa*/*MATα*), por sua vez, são incapazes de realizar cruzamentos. Porém, além de se dividirem vegetativamente por mitose realizam meiose, produzindo quatro esporos haploides, 2 *MATa* e 2 *MATα* (Fig. 1B-C) (revisado por Haber, 2012).

A ligação entre o *mating type* e o processo de esporulação está relacionada à repressão do gene RME1 (*Repressor of meiosis 1*) pelo complexo a1-α2, proteínas codificadas pelos alelos *MATa* e *MATα,* respectivamente. Em células haploides *RME1* reprime ativamente a expressão do gene *IME1* impedindo, dessa forma, que a meiose ocorra (Vershon & Pierce, 2000; Haber, 2012).

Em resumo, a cascata transcricional que dispara e controla o processo de esporulação é iniciada por múltiplos fatores que regulam ativamente a expressão do regulador global da meiose, *IME1.* A atividade de Ime1p responde à presença ou ausência de nitrogênio; a glicose, por sua vez, inibi a atividade quinase da proteína Snf1p (*Sucrose NonFermenting 1*) que é requerida para a transcrição do *IME1*; enquanto isso, o complexo a1-α2 reprime o repressor da meiose *RME1*. Uma vez expresso, Ime1p ativa a transcrição de *NDT80* que, por sua vez, induz múltiplas etapas do processo de esporulação incluindo: recombinação e divisão meiótica; formação da membrana e montagem da parede celular dos esporos (Figura 42).

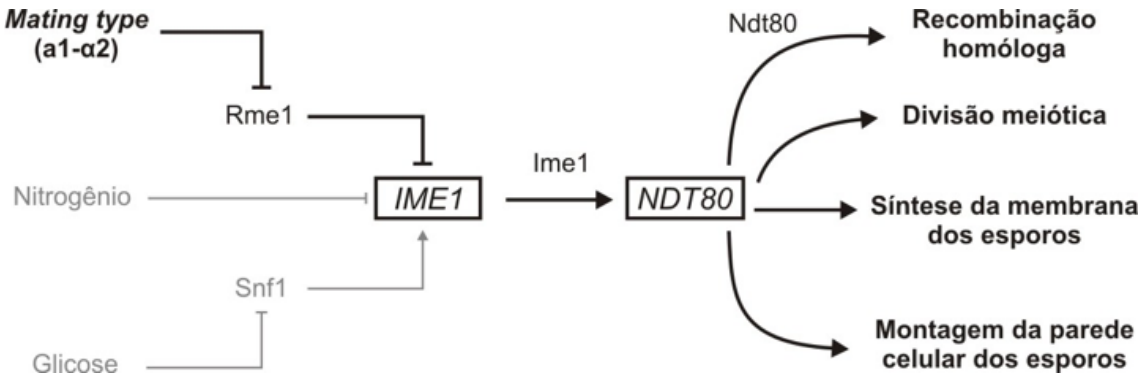

Figura 42. Principais fatores envolvidos no processo de esporulação. A ausência de glicose e de nitrogênio e a presença do complexo a1-α2 regulam positivamente a esporulação, ativando direta ou indiretamente a transcrição do regulador global da esporulação *IME1*. Ime1 por sua vez, ativa a expressão do gene *NDT80* que desencadeia os processos envolvidos na meiose e esporulação. Notar a que a esporulação é dependente da ploidia e dos dois alelos do *locus MAT* (*MATa*/*MATα*). → Ativação. --| Repressão. RME1 (*Repressor of meiosis 1*); Snf1 (*Sucrose NonFermenting 1*); *IME1* e Ime1 (*Inducer of Meiosis 1*); *NDT80* e Ndt80 (*Non-DiTyrosine 80*).

Como descrito anteriormente, a esporulação é uma resposta à ausência de nutrientes. Apesar dos esporos apresentarem resistência a uma pequena variedade de estresses aplicados em laboratório como, por exemplo, a exposição à vapor ou curtos períodos a temperaturas elevadas (55ºC) (Briza *et al*., 1990), não há comprovações claras sobre seu papel como uma estrutura de resistência em condições ambientais.

Além disso, esporos com *mating type* opostos podem cruzar e gerar linhagens diploides. Estes diploides podem ser obtidos tanto por cruzamentos de esporos de uma mesma linhagem quanto de linhagens distintas. Dessa maneira, a capacidade de esporulação de *S. cerevisiae* está diretamente relacionada com a variabilidade genética desta espécie.

Para a construção da linhagem RN1016, células haploides de RN1014 *MATa* foram transformadas de modo transiente com o plasmídeo pFL39kanMX-GAL1HO (Teunissen *et al*., 2002) para indução da troca do *mating type* (a→α) através de degradação do *locus MAT* pela endonuclease Ho (*Homothallic switching endonuclease*) (revisado por Harber, 2012). Linhagens *MAT*α foram selecionadas e, em seguida, submetidas ao cruzamento com as linhagens *MATa* originais, obtendo-se o diploide *MATa/MAT*α. Uma nova troca de *mating type* foi induzida a partir do diploide *MATa/MAT*α. Células contendo apenas o alelo *MATa* foram selecionadas através do sistema de seleção presente no plasmídeo pRN801 previamente inserido no diploide *MATa/MAT*α (coleção particular da DSM-Royal Nedalco). Diploides *MATa/MATa* foram selecionados e nomeados como RN1016. Dessa forma, a linhagem RN1016 não possui a capacidade de esporular, mesmo quando induzida em meio específico. Os resultados a seguir demonstram esta característica.

1.2. Materiais e Métodos;

A habilidade de esporulação da linhagem RN1016 foi avaliada através da metodologia de indução da meiose e esporulação de leveduras diploides descrito por Ausubel e colaboradores (2000). A linhagem selvagem brasileira PE-2, comercialmente usada na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, foi usada como controle positivo, apenas a título de comparação e

ilustração.

Resumidamente, as linhagens diploides RN1016 (*MATa/MATa*) e PE-2 (*MATa/MAT*α) foram previamente crescidas em meio YPD 2% (20 g/L de Peptona; 10 g/L extrato de levedura e; 20 g/L glicose; 20 g/L ágar) por aproximadamente 16 horas a 30ºC. Em seguida, colônias de aproximadamente 3mm de cada linhagem foram transferidas para placas independentes contendo meio de para indução da esporulação (10 g/L de acetato de potássio; 1 g/L de extrato de levedura; 0,5 g/L de glicose; 20 g/L ágar). As placas foram mantidas a 25ºC e o progresso de cada cultura foi observado diariamente por cinco dias.

Os resultados foram documentados utilizando microscópio de epifluorescência (Olympus-BX51) com câmara digital acoplada (Olympus-DP72). Quando necessário, as células foram marcadas com Calcofluor White e/ou FDA (Sigma-Aldrich 18909; F7378) e observadas por fluorescência utilizando filtros específicos.

1.3. Resultados;

Apesar da linhagem RN1016 ser uma linhagem diploide, seu *mating type* MATa/MATa impossibilita a formação do complexo a1-α2. Consequentemente, a transcrição do gene *IME1* é bloqueada constantemente pelo repressor Rme1p (Figura 42) e dessa forma a meiose não ocorre.

Evidências experimentais para essa inabilidade de esporular foram obtidas através do cultivo de RN1016 em meio que induz a esporulação, ou seja, concentrações limitantes de fonte de carbono (glicose) e de nitrogênio (extrato de levedura). Durante cinco dias de cultivo nenhuma tétrade, ou esporos, foram observados na cultura da linhagem RN1016 (Figura 43 B e D). Por outro lado, a linhagem diploide PE-2 (*MATa/MAT*α) demonstrou no mesmo período uma altíssima taxa de esporulação. Após cinco dias de cultivo, praticamente todas as células de PE-2 realizaram meiose e esporularam (Figura 43 A e C).

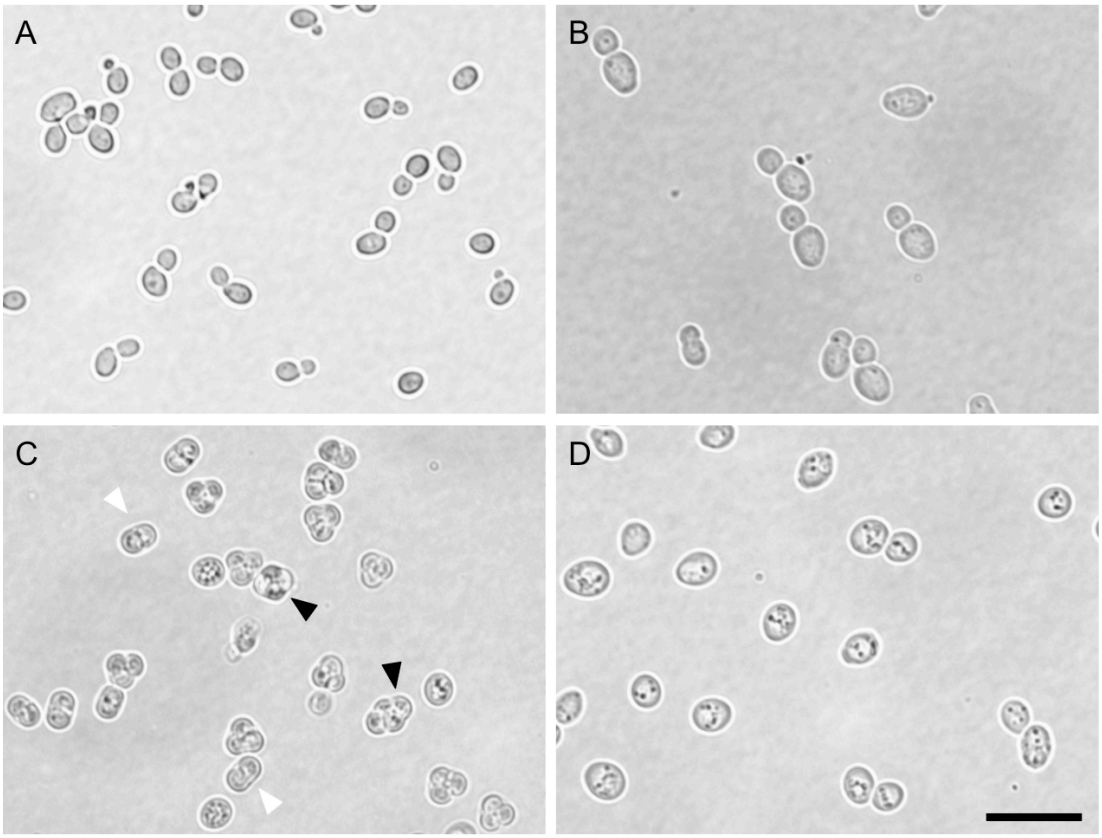

Figura 43. Ensaio de esporulação das leveduras RN1016 e PE-2. Leveduras cultivadas durante cinco dias em meio sólido apropriado para esporulação. Após 24 horas de cultivo (A-B) não são observados esporos das linhagens PE-2 (A) e RN1016 (B). Entretanto, após cinco dias de cultivo (C e D) a cultura de PE-2 (C) encontra-se altamente esporulada. Notar a presença de tétrades (setas pretas) e de células na primeira divisão da meiose (setas brancas). Por outro lado, as células da linhagem RN1016 permanecem sem formar esporos (D).

O genótipo de RN1016 (*MATa/MATa*) impede a esporulação da linhagem e, consequentemente, reduz drasticamente as possibilidades de transferência do material genético para outras linhagens de leveduras. Sendo inabilitada de esporular, a linhagem RN1016 também tem menor potencial de sobrevivência e dispersão no meio ambiente, se mostrando menos tolerante a limitação de recursos naturais, como água e nutrientes. Estes resultados são corroborados pelas observações referentes a sobrevivência de RN1016 no solo e água descritas no item 4 (Anexo IV) deste relatório.

1.4. Conclusão;

A obtenção de leveduras que não apresentam esporulação foi realizada por uma simples alteração de *mating type*, sem a necessidade de alterar especificamente genes relacionados à esporulação.

De acordo com os dados obtidos, foi possível concluir que a linhagem de *S. cerevisiae* RN1016 não produz esporos e portanto possui uma menor tolerância aos estresses ambientais e mínima probabilidade de cruzar com outras linhagens de leveduras.

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

2.1. Introdução;

A possibilidade de desinfestação/esterilização de superfícies ou soluções é fundamental para a manipulação apropriada de microrganismos. Seja para eliminar contaminações, ou mesmo para inativar o organismo de interesse, os agentes químicos sanitizantes são amplamente utilizados na indústria em geral. As Usinas que utilizam microrganismos 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 de suas dornas e tubulações, evitando contaminações e prejuízos.

Os agentes químicos empregados em soluções sanitizantes possuem alta capacidade esterilizante sobre microrganismos da flora ambiental. Os principais agentes químicos são constituídos por compostos iodados, cloro, quaternários de amônio, ácidos, álcoois, agentes gasosos e antibióticos (Evangelista, 2003).

As modificações incluídas na Linhagem RN1016 não promovem qualquer característica adicional que indique potencial resistência desta levedura a agentes sanitizantes e antimicrobianos.

Um experimento foi elaborado de modo a testar o efeito de diferentes agentes esterilizantes e antimicrobianos sob culturas de células da levedura RN1016, bem como dos respectivos controles parental não GM (CEN.PK) e comercial (Pedra-2).

2.2. Material e Métodos;

Culturas celulares frescas das leveduras RN1016, CEN.PK (controle parental não-GM) e Pedra-2 (controle comercial não GM) foram plaqueadas em meio YPD semissólido. Estas culturas foram utilizadas no experimento que avaliou a eficiência de agentes antimicrobianos.

Em placas de 96 poços adicionou-se 100uL de solução salina (por poço) contendo as diluições seriadas dos agentes empregados no teste. Foram utilizadas 7 diferentes concentrações de diluição, seguindo um fator de diluição de 2 vezes, além do controle negativo sem sanitizante. O experimento foi feito em triplicata. Os agentes empregados no ensaio e respectivas concentrações são descritos abaixo.

Agente 1:

Antibiótico Higromicina.

Concentrações testadas: 400 mg/L, 200 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 12,5 mg/L e 6,25 mg/L.

Agente 2:

Antibiótico Geneticina.

Concentrações testadas: 400 mg/L, 200 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 12,5 mg/L e 6,25 mg/L.

Agente 3:

Etanol (álcool).

Concentrações testadas: 80%, 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5% e 1,25%.

Agente 4:

Hipoclorito de sódio.

Concentrações testadas: 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,16%, 0,08% e 0,04%.

Alíquotas de 10 μL das culturas de levedura contendo aproximadamente $1x10^4$ células (leitura em espectrofotômetro – DO600nm) foram adicionadas às diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos, nas três repetições. As placas foram então incubadas a 30°C por 24 horas. Em seguida procedeu-se a avaliação do crescimento celular nos diferentes tratamentos utilizando espectrofotômetro leitor de placas modelo Infinite

M200 PRO (Tecan Group Ltd.) em modo absorbância, com o Software Magellan 7.1, e emissão com comprimento de onda de 600nm.

Com este procedimento foi possível observar o efeito das diferentes concentrações dos agentes sanitizantes no crescimento celular das leveduras testadas. A inibição do crescimento pelos agentes representa a inativação dos microrganismos.

Este experimento foi conduzido de acordo com protocolo estabelecido pelas "Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana", cujas normas são aprovadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI/NCCLS, 2005).

2.3. Resultados;

Os agentes empregados no teste se mostraram eficientes na inibição do crescimento de todas as leveduras testadas. Foi possível estabelecer a concentração mínima aproximada suficiente para inibir completamente o crescimento dos microrganismos.

Os gráficos das Figuras 44 a 47 representam o efeito dos agentes testados no crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2 frente às diferentes concentrações empregadas.

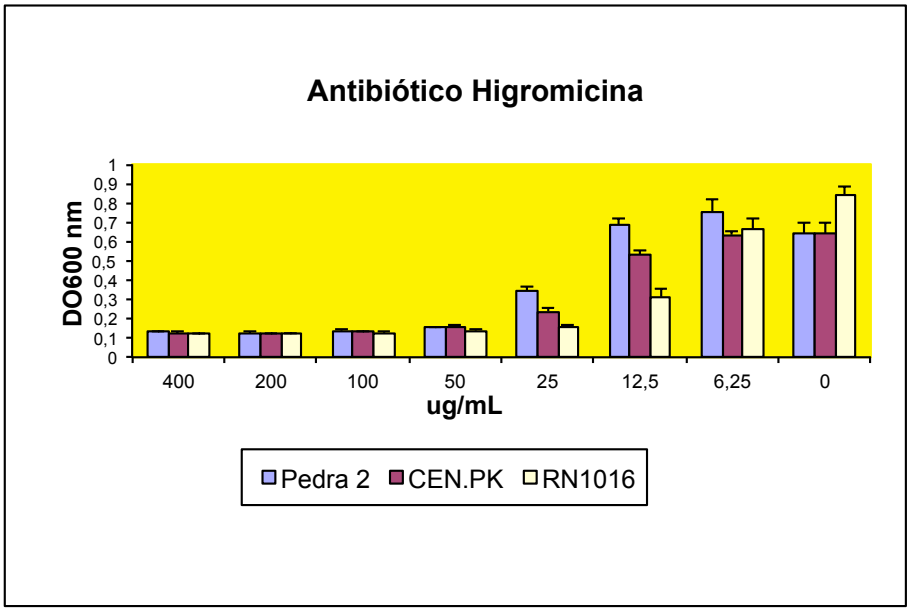

Figura 44. Efeito do antibiótico higromicina sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2. O crescimento das leveduras foi avaliado em espectrofotômetro leitor de placas modelo Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd.), após 24 horas de incubação.

A higromicina é um antibiótico inibidor da síntese proteica originalmente produzido pelo microrganismo *Streptomyces hygroscopicus* (McGuire, 1953). Este antibiótico é utilizado para tratamento de quadros clínicos e também em laboratórios de pesquisa, como marcador seletivo.

A Figura 44 mostra a sensibilidade semelhante das linhagens avaliadas à ação do antibiótico, no entanto pequenas diferenças são observadas. A linhagem RN1016 se mostrou mais sensível que os controles comercial e parental selvagem, tendo seu crescimento quase completamente inibido na concentração de 25 mg/L (ou μg/mL).

A concentração de 50 mg/L foi suficiente para inibir completamente o crescimento das três linhagens avaliadas, obtendo como leitura a densidade ótica inicial da cultura (~0,1). Observa-se que a levedura RN1016 é tão sensível quanto seu equivalente convencional ao tratamento com o agente esterilizante higromicina.

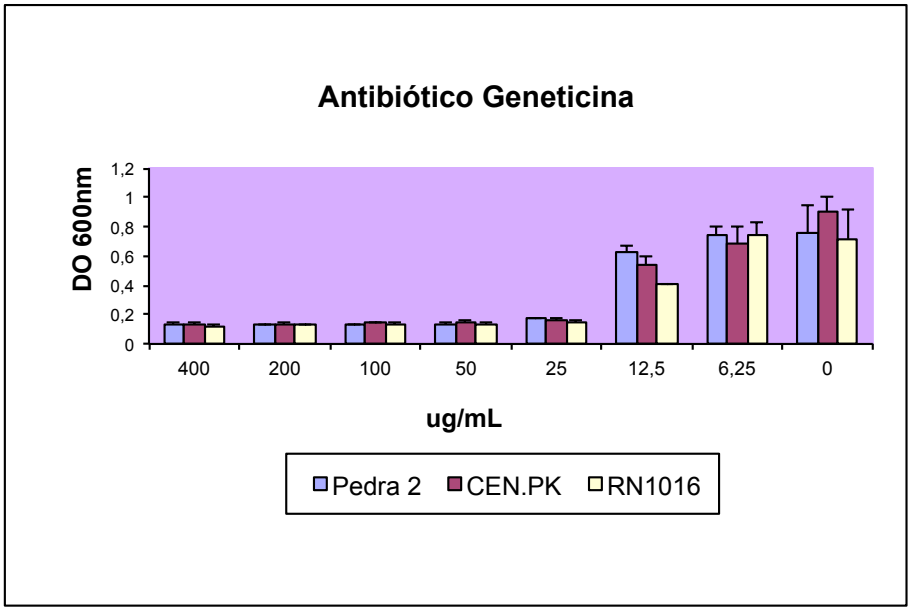

Figura 45. Efeito do antibiótico geneticina sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2. O crescimento das leveduras foi avaliado em espectrofotômetro leitor de placas modelo Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd.), após 24 horas de incubação.

A geneticina foi inicialmente isolada do actinomiceto *Micromonospora rhodorangea*. Trata-se de um inibidor da síntese proteica agindo no passo de elongação polipeptíca com amplo espectro de ação, tanto em procariotos quanto em eucariotos. Por este motivo, é comumente utilizado na indústria

farmacêutica e médica para tratamento de doenças causadas por microrganismos. Assim como a higromicina, a geneticina também é bastante utilizada em trabalhos científicos com leveduras como marcador de seleção, justamente por ser eficiente contra este microrganismo.

Pode-se observar que o efeito da geneticina na inibição do crescimento das leveduras testadas é ainda mais efetivo que do antibiótico higromicina. Na concentração de 25 mg/L o antibiótico é capaz de promover quase a completa inibição do crescimento das leveduras. Nas concentrações seguintes, a partir de 50 mg/L, não houve crescimento das células, conforme mostra a DO_{600} equivalente a inicial.

A linhagem RN1016 se mostrou sensível à ação do agente antimicrobiano geneticina de modo equivalente aos controles parental e comercial não GM.

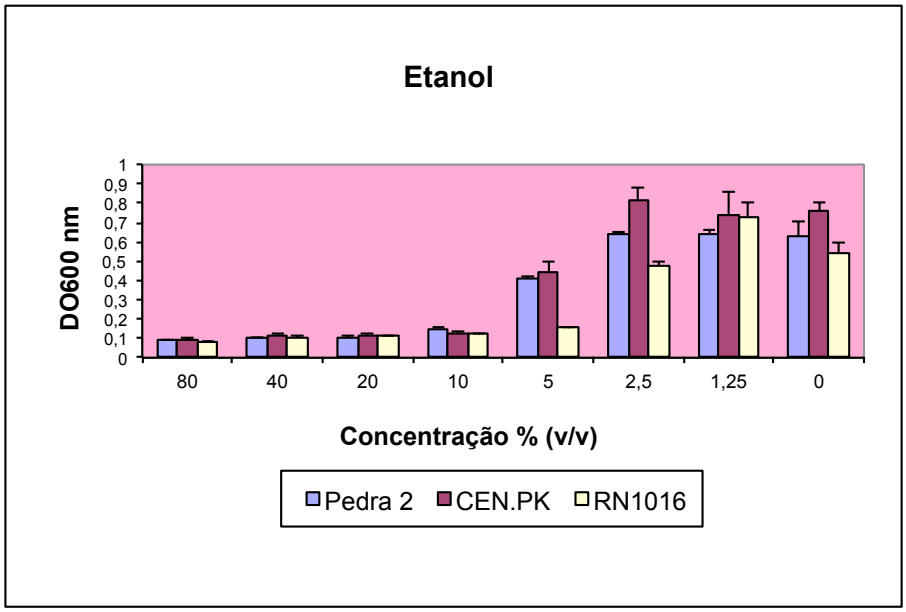

Figura 46. Efeito do etanol sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2. O crescimento das leveduras foi avaliado em espectrofotômetro leitor de placas modelo Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd.), após 24 horas de incubação.

O etanol é uma substância orgânica obtida principalmente através da fermentação de açúcares. É majoritariamente empregado como combustível, na indústria de alimentos e bebidas, e na perfumaria. Adicionalmente o etanol é um importante agente desinfetante utilizado em hospitais, residências, laboratórios e na indústria. O etanol atua através da desnaturação de

proteínas e solubilização de gorduras, e depende de água para penetrar membranas lipídicas das células dos microrganismos.

No presente experimento pode-se observar que concentrações baixas de etanol de cerca de 10% já são suficientes para inibir quase completamente o desenvolvimento das leveduras avaliadas. Concentrações acima de 20% são eficientes na inibição do crescimento celular das leveduras.

Observa-se que a linhagem RN1016 não apresenta qualquer indício de resistência a este agente antimicrobiano, assim como a linhagem parental CEN.PK não geneticamente modificada.

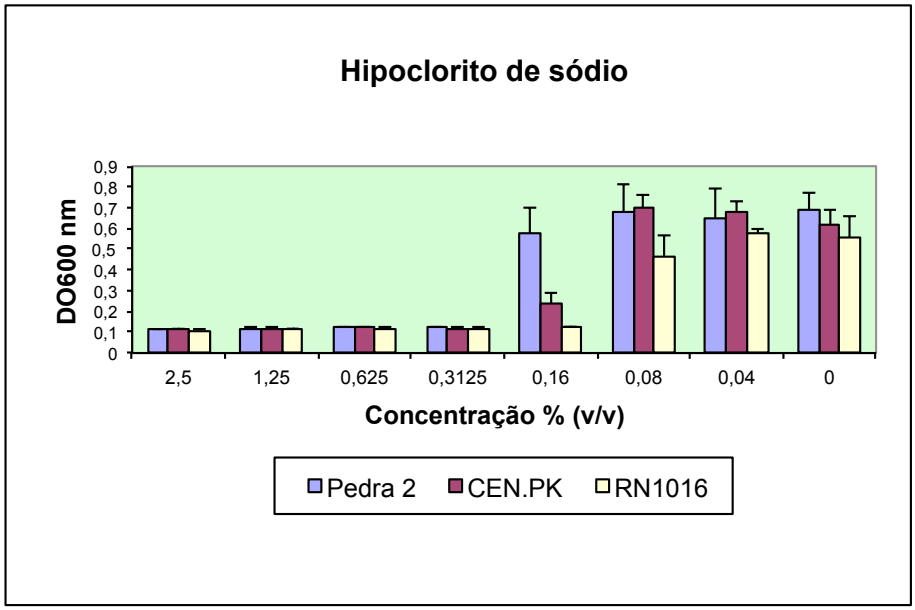

Figura 47. Efeito do hipoclorito de sódio sob o crescimento das linhagens de levedura RN1016, CEN.PK e Pedra-2. O crescimento das leveduras foi avaliado em espectrofotômetro leitor de placas modelo Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd.), após 24 horas de incubação.

O hipoclorito de sódio é um dos principais compostos químicos utilizados como desinfetante hospitalar, residencial e industrial. Em concentrações consideravelmente baixas este químico é suficiente para inativar uma ampla gama de microrganismos da flora natural. Uma vez em solução aquosa o hipoclorito de sódio se hidrolisa, dando origem ao ácido hipocloroso. Este ácido tem a capacidade de penetrar as células dos microrganismos e, devido a seu alto poder oxidante, promove um intenso desbalanço redox no interior celular, que culmina com a morte celular.

A maior concentração empregada no presente experimento foi de 2,5% (v/v), que conforme o esperado inibiu completamente o crescimento celular das linhagens de levedura. A menor concentração suficiente para promover a completa inibição do crescimento das leveduras foi de 0,3125%. Nesta concentração as três linhagens de levedura avaliadas mostraram o mesmo grau de inibição.

Assim como nos tratamentos com os demais agentes esterilizantes, a levedura RN1016 se mostrou naturalmente sensível à substância utilizada no estudo. A maior absorbância observada referente ao crescimento de linhagens controle em concentrações inferiores se deve principalmente ao maior vigor destas linhagens em comparação com a linhagem RN1016, que foi observado em outros experimentos relatados neste relatório (ex. experimento de competição, item 16.1).

O experimento mostrou de forma clara que a levedura RN1016, bem como as linhagens utilizadas como controle, são sensíveis aos agentes esterilizantes empregados, conforme a hipótese inicial.

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

3.1. Ecotoxicologia terrestre;

Diversos estudos de ecotoxicologia vem sendo desenvolvidos e otimizados para a avaliação do impacto de substâncias potencialmente contaminantes em diversas matrizes ambientais, com destaque para solo e água. Em geral, produtos químicos são alvo destes testes, que geralmente utilizam organismos indicadores para avaliar o impacto de determinada substância no desenvolvimento, sobrevivência e até mesmo no comportamento de organismos indicadores (ISO 2005).

Agências nacionais e internacionais têm se dedicado ao desenvolvimento e otimização de testes visando a avaliação da ecotoxicidade de compostos a organismos indicadores. Dentre os testes de ecotoxicidade terrestre utilizando minhocas como indicadores podemos citar o protocolo 207 da OECD (*Organisation for Economic Co-operation Development*, 1984), os protocolos 17512-1 (2007) e 11268-1 (2012) da ISO (*International Organization for Standardization*), a norma L6.401 da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 1990), e normas descritas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

O principal organismo de solo utilizado em estudos de ecotoxicologia terrestre são as minhocas. Estes organismos são excelentes indicadores da qualidade do solo, bem como do efeito de substâncias diversas devido ao seu habito alimentar e morfologia. As minhocas são conhecidas pela importante atividade de decomposição de matéria orgânica, se alimentando de todo tipo de composto orgânico que encontra-se incorporado ao solo, e também pela formação de galerias que promovem a aeração. Além da ingestão de partículas de solo durante a alimentação, as minhocas têm a capacidade de detectar uma ampla gama de compostos devido a presença de quimiorreceptores nos segmentos anteriores e receptores sensoriais localizados na superfície do corpo (Reinecke *et al*., 2002).

As minhocas merecem destaque nos estudos de ecotoxicologia

terrestre devido ao nicho ecológico que ocupam. Por meio de sua movimentação elas revolvem o solo misturando os horizontes e promovendo a aeração, contribuindo com o processo de ciclagem de nutrientes.

As características do solo como a disponibilidade de nutrientes, a temperatura, umidade e a presença de substâncias químicas influenciam a população de minhocas do solo. As mais diversas substâncias que entram no ambiente edáfico, além de se associarem às partículas que servem de alimento para as minhocas, podem ser incorporados à fração solúvel do solo e, desta forma, serem absorvidos diretamente através da cutícula do animal.

A espécie *Eudrilus eugeniaie*, popularmente conhecida como gigante africana, é uma espécie adaptada ao clima tropical, com temperatura ideal em torno de 20 a 25°C. É uma espécie de ampla ocorrência no país, sendo bastante explorada comercialmente como isca e como decompositora para produção de húmus. Por representar o clima do País, e ser facilmente adquirida com criadores especializados, a espécie *Eudrilus eugeniae* foi escolhida para os testes de ecotoxicologia do solo.

Conforme detalhado neste Relatório de Biossegurança, a utilização da Linhagem de levedura RN1016 será restrita ao interior dos fermentadores da Usina de produção de etanol. Em hipótese alguma a levedura será descartada ou intencionalmente disposta no solo em sua forma viável. Sendo assim, o único modo pelo qual as formas viáveis desta linhagem de levedura podem ter contato com o ambiente seria através de uma liberação acidental.

Com objetivo de avaliar o potencial efeito adverso da Linhagem RN1016 a organismos indicadores de solo, experimentos de ecotoxicidade aguda e de comportamento de fuga foram conduzidos nas dependências do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CQB 069/98). Estes testes avaliaram o efeito da linhagem RN1016 em comparação a seu correspondente não geneticamente modificado, bem como a linhagens comerciais de levedura amplamente utilizadas no país para produção de etanol.

3.1.1. Ecotoxicidade aguda: Avaliação da ecotoxicidade aguda da linhagem RN1016 de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) ao organismo indicador de solo *Eudrilus eugeniae*;

Testes de ecotoxicidade aguda são experimentos que permitem uma rápida avaliação e estimativa de efeitos tóxicos de determinados compostos a organismos indicadores. Estes testes são regularmente utilizados para avaliação de substâncias químicas, como defensivos agrícolas ou combustíveis, e também matrizes compostas, como lodo de esgoto e resíduos de mineração. Estes experimentos permitem a identificação de concentrações letais de substâncias quimicamente definidas, com a obtenção da dose responsável por 50% de letalidade (DL50).

A utilização destes testes em experimentos de Avaliação de Biossegurança de OGMs é uma prática bastante recente, umas vez que materiais biológicos como plantas e microrganismos estão naturalmente presentes no meio ambiente e não são causadores de efeitos tóxicos. A introdução de um ou mais genes, que leva a expressão de novas proteínas, pode justificar a condução de testes de ecotoxicidade. No entanto, não existem precedentes ou protocolos específicos para realização destes testes utilizando microrganismos como substância avaliada. Portanto, o presente experimento de ecotoxicidade aguda foi conduzido com base no **Protocolo nº 207** estabelecido pela **OECD**, com pequenas modificações que atendam às diferenças inerentes à substância testada.

3.1.1.1. Material e Métodos;

Organismos indicadores

Os organismos indicadores utilizados foram indivíduos adultos de minhocas da espécie *Eudrilus eugeniae*, adquiridas com criador especializado localizado no Distrito de Souzas, Cidade de Campinas. As minhocas foram mantidas em Laboratório, em mistura 1:1 de substrato PlantMax HT (DDL Agroindustrial) e Terra Vegetal.

Matriz

Para padronizar o experimento, e garantir o bom desenvolvimento das minhocas, a matriz de solo empregada no experimento foi a mesma utilizada para manutenção do organismo no Laboratório.

Foi preparada mistura composta de 1:1 de substrato horticultural Lupa (Lupa Fertilizantes) e Terra Vegetal SoilFert. Adicionou-se 100mL de água destilada por quilograma de solo para promover a umidificação da matriz. O solo foi acondicionado em recipientes plásticos circulares com as dimensões de 14cm de diâmetro (boca), 12cm de diâmetro (fundo) e 10cm de profundidade. Os recipientes permaneceram tampados durante o experimento para garantir a permanência das minhocas, e as tampas foram perfuradas para permitir a troca de gases (Figura 48). Em cada recipiente adicionou-se 600g da matriz composta (solo).

A abundância de matéria orgânica presente no substrato eliminou a necessidade de fornecer alimentação às minhocas no decorrer do experimento. Com isso não houve interferência externa dos tratamentos, com exceção apenas das avaliações efetuadas aos 7 e 14 dias previstas no protocolo experimental.

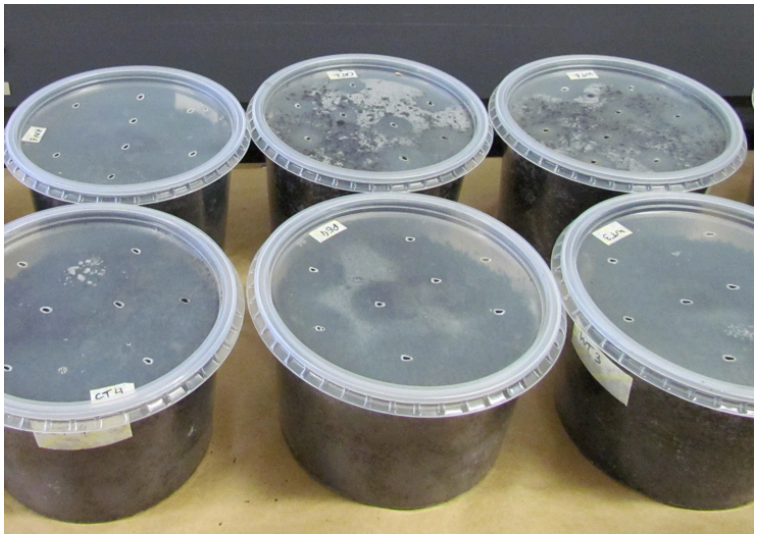

Figura 48. Recipientes utilizados nos experimentos de ecotoxicidade aguda. Detalhe para as tampas perfuradas permitindo troca gasosa.

Tratamentos

O experimento foi constituído de 4 tratamentos, com 4 repetições cada. Os tratamentos são representados pela linhagem avaliada RN1016 e os 3 controles: Linhagem convencional (CEN.PK), Linhagem comercial selvagem (Pedra 2), e controle negativo (sem adição de leveduras). A aplicação das suspensões celulares se deu de forma randomizada, e a dispersão foi feita com o auxílio de uma espátula, seguida de agitação do recipiente. As culturas de células passaram por leve centrifugação e o meio de cultura sobrenadante foi retirado. As células foram ressuspendidas em água destilada para evitar qualquer influência do meio de cultura no experimento.

Procedimentos

As misturas prontas da matriz foram introduzidas nos recipientes plásticos, em seguida aplicou-se as suspensões celulares utilizando-se pipeta automática. Com auxílio de espátulas metálicas os tratamentos foram homogeneizados, seguidos por agitação manual do recipiente.

Foram introduzidas 10 minhocas por recipiente. Os grupos de 10 minhocas tiveram o peso conjunto determinado antes de serem dispostas no interior dos recipientes (Figura 49). Os recipientes foram acondicionados em sala com temperatura variando de 20 a 25°C e fotoperíodo controlado pelo ciclo diurno, uma vez que a sala dispunha de janelas para entrada de luminosidade.

Foram feitas avaliações aos 7 e 14 dias após o estabelecimento do experimento, conforme Protocolo OECD. As avaliações consistiam da observação do número de indivíduos vivos e mortos, pesagem dos conjuntos e observação do comportamento geral.

Figura 49. Pesagem dos conjuntos de 10 minhocas, efetuada antes da disposição nos recipientes com devidos tratamentos.

3.1.1.2. Resultados e Conclusão;

Os microrganismos convivem intimamente com todos os organismos do meio ambiente, e espécies de levedura são comumente encontradas nas mais diversas matrizes ambientais em concentrações variadas. Não existem relatos na literatura de espécies de levedura causadoras de efeitos adversos a organismos do solo. Por este motivo torna-se difícil definir uma quantidade apropriada de células a serem utilizadas nos testes de toxicidade. Optou-se, portanto, a utilizar uma concentração bastante elevada de células, proporcionalmente superior a qualquer possibilidade de acidente passível de ser ocorrido.

A quantidade de leveduras empregada no teste foi de 250 mg de células puras (*pellet*) por recipiente com 600g de solo, atingindo-se uma concentração de 400mg/Kg. Ao final do experimento não observou-se mortalidade, impacto no ganho de peso ou alteração no comportamento dos indivíduos de nenhum dos 3 tratamentos com leveduras quando comparados

entre si, ou mesmo quando comparados ao tratamento sem leveduras (controle negativo).

A Tabela 13 mostra os dados referentes às avaliações de ganho de peso dos organismos nos diferentes tratamentos, bem como as respectivas médias e desvios padrão. O gráfico apresentado na Figura 50 representa a evolução do peso médio das minhocas ao longo dos 14 dias.

Tabela 13. Peso médio das minhocas, média total e desvio padrão. A Tabela mostra o peso médio dos indivíduos em cada uma das 4 repetições nos tratamentos: RN1016 (avaliada), Pedra 2 (controle comercial), CEN.PK (controle convencional) e CTL- (controle negativo).

Tratamento	Dia 0	Dia 7	Dia 14
	Peso Médio /Indivíduo	Peso Médio /Indivíduo	Peso Médio /Indivíduo
RN1016.1	1,13	1,42	1,62
RN1016.2	1,34	1,82	1,89
RN1016.3	1,42	1,73	1,72
RN1016.4	1,40	1,73	1,84
Média	1,32	1,67	1,77
DP	0,11	0,15	0,11
PEDRA 2.1	1,43	1,65	1,71
PEDRA 2.2	1,13	1,69	1,54
PEDRA 2.3	1,31	1,69	1,78
PEDRA 2.4	1,15	1,39	1,52
Média	1,26	1,60	1,64
DP	0,12	0,12	0,11
CEN.PK.1	1,48	1,67	1,63
CEN.PK.2	1,35	1,95	1,88
CEN.PK.3	1,21	1,35	1,45
CEN.PK.4	1,49	1,71	1,67
Média	1,38	1,67	1,66
DP	0,11	0,21	0,15
CTL-.1	1,45	1,60	1,84
CTL-.2	1,07	1,29	1,49
CTL-.3	1,25	1,37	1,53
CTL-.4	1,59	1,47	1,90
Média	1,34	1,43	1,69
DP	0,20	0,12	0,18

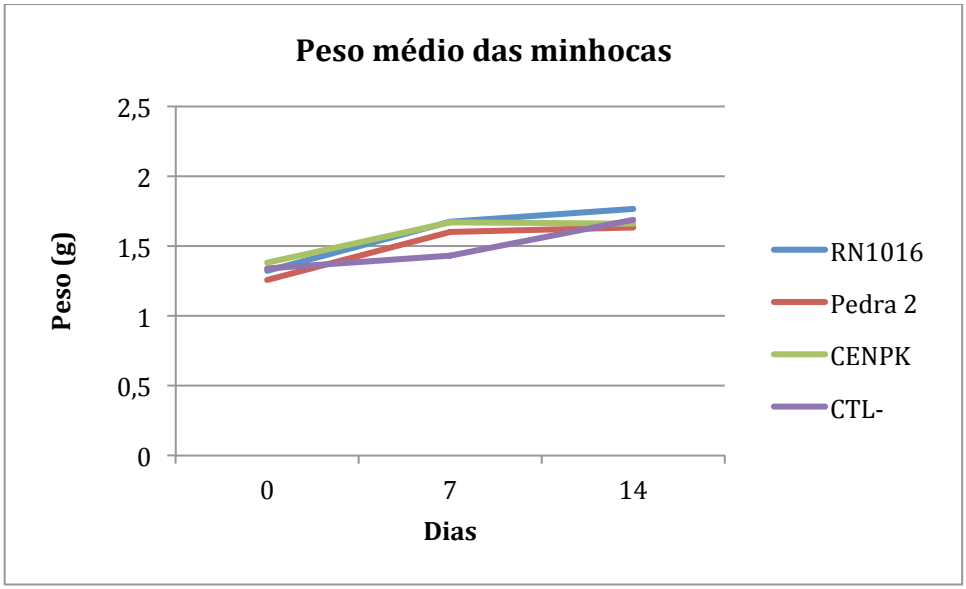

Figura 50. Evolução do peso das minhocas ao longo do tempo.

Adicionalmente, uma análise estatística foi conduzida para observar se existem diferenças significativas entre os pesos médios das minhocas no início do experimento e durante as avaliações de 7 e 14 dias. Análises de variância (ANOVA) foram empregadas para avaliação dos pesos médios das minhocas. Utilizou-se o software StatPlus (AnalystSoft Inc.) para realização das análises. As Tabelas 14 a 16 mostram os resultados destas análises.

Tabela 14. Resumo dos dados e Análise de Variância (ANOVA) do peso das minhocas no Tempo 0. Utilizou-se o nível de significância de 5% (0,05).

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
RN1016	4	5,291	1,32275	0,01714
Pedra 2	4	5,024	1,256	0,02025
CENPK	4	5,519	1,37975	0,01736
CTL(-)	4	5,356	1,339	0,05259

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*F Crit.*
Entre grupos	0,03183	3	0,01061	0,3954	0,75868	3,49029
Dentro de grupos	0,32202	12	0,02684			
Total	0,35386	15				

A Análise de Variância (ANOVA) mostrada na Tabela 14 indica a equivalência entre indivíduos no início do experimento. O peso das minhocas se mostrou equivalente, ou não diferente, tanto dentro das repetições dos

tratamentos quanto entre tratamentos. Esta observação é relevante uma vez que os pesos médios das minhocas foi avaliado ao longo de 14 dias, e diferenças significativas neste ponto inicial poderiam influenciar a comparação final.

O valor de F calculado foi bastante inferior ao F tabelado, mostrando que a hipótese de nulidade é aceita neste caso. Os pesos médios das minhocas não diferem entre si estatisticamente. Adicionalmente o *p-value* foi calculado, uma vez que a hipótese Ho (médias iguais) é verdadeira. O p-value de 0,75868 é bastante superior ao valor de alfa utilizado (0,05 – 5%), e portanto garante a segurança experimental necessária. Este corrobora a veracidade da hipótese inicial mesmo se neste caso fosse utilizado um nível de significância de 10% (0,1).

Tabela 15. Resumo dos dados e Análise de Variância (ANOVA) do peso das minhocas no Tempo 7 dias. Utilizou-se o nível de significância de 5% (0,05).

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
RN1016	4	6,692	1,673	0,03011
Pedra 2	4	6,411	1,60275	0,02079
CENPK	4	6,677	1,66925	0,06068
CTL(-)	4	5,725	1,43125	0,01833

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*F Crit.*
Entre grupos	0,15387	3	0,05129	1,57919	0,24579	3,49029
Dentro de grupos	0,38975	12	0,03248			
Total	0,54362	15				

A Tabela 15 mostra a análise de variância entre os pesos médios das minhocas dos diferentes tratamentos: RN1016 (substância teste), Pedra 2 (controle comercial), CEN.PK (controle parental não-GM) e CTL- (sem aplicação de leveduras), após 7 dias de cultivo em solo contendo os respectivos tratamentos.

Novamente, o valor de F calculado (~1,57) foi consideravelmente inferior ao F tabelado (~3,49), mostrando que a hipótese de nulidade é aceita neste caso. Conclui-se que os pesos médios das minhocas não diferem entre si estatisticamente após 7 dias de cultivo em solo contendo 400 mg/kg de

células viáveis de leveduras. Adicionalmente o *p-value* foi calculado, uma vez que a hipótese Ho (médias iguais) é verdadeira. O *p-value* de 0,24579 é bastante superior ao valor de alfa utilizado (0,05 – 5%), e portanto garante a validade da hipótese inicial. Da mesma forma, esta observação corrobora com a validade da hipótese inicial mesmo se neste caso fosse utilizado um nível de significância de 10% (0,1).

Tabela 16. Resumo dos dados e Análise de Variância (ANOVA) do peso das minhocas no Tempo 14 dias. Utilizou-se o nível de significância de 5% (0,05).

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
RN1016	4	7,067	1,76675	0,0152
Pedra 2	4	6,542	1,6355	0,01606
CENPK	4	6,636	1,659	0,03155
CTL(-)	4	6,761	1,69025	0,04402

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*F Crit.*
Entre grupos	0,03922	3	0,01307	0,48948	0,69606	3,49029
Dentro de grupos	0,32047	12	0,02671			
Total	0,35968	15				

A Tabela 16 mostra a análise de variância entre os pesos médios das minhocas dos diferentes tratamentos: Linhagens RN1016 (substância teste), Pedra 2 (controle comercial), CEN.PK (controle parental não-GM) e CTL- (sem aplicação de leveduras), após 14 dias de cultivo em solo contendo os respectivos tratamentos.

Finalmente, o valor de F calculado (~0,48) foi bastante inferior ao F tabelado (~3,49), mostrando que a hipótese de nulidade também é aceita neste caso. Conclui-se que os pesos médios das minhocas não diferem entre si estatisticamente após 14 dias de cultivo em solo contendo 400 mg/kg de células viáveis de leveduras. Adicionalmente o *p-value* foi calculado, uma vez que a hipótese Ho (médias iguais) é verdadeira. O *p-value* de 0,69606 é bastante superior ao valor de alfa utilizado (0,05 – 5%). Esta observação corrobora com a validade da hipótese inicial mesmo se fosse utilizado um nível de significância de 10% (0,1).

Não existem evidências para acreditar que Linhagens de levedura possam apresentar qualquer efeito indesejado a organismos indicadores do solo. As modificações genéticas incluídas na Linhagem RN1016 não trazem alterações que indique qualquer risco adicional. Observando os dados de crescimento e desenvolvimento das minhocas ao longo do tempo, conclui-se que os organismos estudados apresentaram desenvolvimento dentro da normalidade quando cultivados em solo contendo 400 mg/Kg de células da Linhagem de Levedura RN1016 e, mais do que isso, não apresentaram mortalidade ou qualquer alteração de ganho de peso quando comparados tanto ao equivalente convencional, quanto à cultivar comercial Pedra 2 ou mesmo ao controle negativo, sem a aplicação de leveduras.

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que a Levedura RN1016 não é potencialmente causadora de efeitos adversos a organismos do solo, mesmo em concentrações bastante elevadas como aquela empregada no presente estudo de ecotoxicidade aguda.

3.1.2. Avaliação do comportamento de fuga do organismo indicador *Eudrilus eugeniae* em solo contendo linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*;

A tendência observada em determinados organismos de se deslocar em fuga quando expostos a substâncias potencialmente nocivas levou ao desenvolvimento de estudos padronizados de ecotoxicologia. Estes experimentos são conhecidos por Teste de Comportamento de Fuga (*Avoidance Behaviour Test*).

Os testes de comportamento de fuga encontram-se padronizados e publicados por Instituições dedicadas (ISO, 2007), no entanto, assim como os testes de toxicidade aguda, eles são desenvolvidos e empregados para a avaliação de substâncias químicas. No presente experimento, utilizou-se linhagens de levedura como substância teste, além do controle padrão Ácido Bórico (Amorim *et al*., 2012). O estudo foi conduzido conforme protocolo *Soil quality - Avoidance test for testing the quality of soils and effcts of chemical on behavior. Part1: Test with earthworms* (ISO, 2007), com pequenas adaptações que atendem as diferenças inerentes à substância testada.

3.1.2.1. Material e Métodos;

Organismos indicadores

Os organismos indicadores utilizados foram indivíduos adultos de minhocas da espécie *Eudrilus eugeniae*, adquiridas com criador especializado localizado no Distrito de Souzas, Cidade de Campinas. As minhocas foram mantidas em Laboratório, em mistura 1:1 de substrato horticultural Lupa (Lupa Fertilizantes) e Terra Vegetal SoilFert.

Matriz

Para padronizar o experimento, e garantir o bom desenvolvimento das minhocas, a matriz de solo empregada no experimento foi a mesma utilizada para manutenção do organismo no Laboratório, com a qual os organismos já

estavam aclimatados. Foi preparada mistura composta de 1:1 de substrato horticultural Lupa (Lupa Fertilizantes) e Terra Vegetal SoilFert. Adicionou-se 100mL de água destilada por quilograma de solo para promover a umidificação da matriz. A abundância de matéria orgânica presente no substrato eliminou a necessidade de fornecer alimentação às minhocas no decorrer do experimento (48 horas). Com isso não houve interferência externa no decorrer do estudo.

Tratamentos

O experimento foi constituído de 4 tratamentos, com 3 repetições cada. Os tratamentos são representados pela linhagem avaliada RN1016 e os 3 controles: Linhagem convencional (CEN.PK), Linhagem comercial (Pedra 2), e controle positivo de referência (Ácido Bórico). A aplicação das suspensões celulares se deu de forma randomizada, e a dispersão foi feita com o auxílio de uma espátula estéril.

As leveduras foram cultivadas por 48 horas em meio YPD. As culturas de células passaram por leve centrifugação e o meio de cultura foi retirado. As células foram ressuspendidas em água destilada para evitar qualquer influência do meio de cultura no experimento. Os tratamentos receberam 10mL de uma solução de 40g/L de células puras. Desta maneira a concentração final de células foi de 400mg/Kg. Utilizou-se o ácido bórico como controle positivo experimental na concentração de 500mg/kg, uma vez que a faixa de sensibilidade das minhocas a esse químico é de 200 a 800 mg/kg (ISO, 2007; Amorim *et al*., 2005).

Procedimentos

O solo foi acondicionado em recipientes plásticos retangulares. O recipiente foi repartido com auxilio de um separador de isopor de 1cm de espessura, dividindo o recipiente em duas partes iguais. Cada parte do recipiente foi preenchida com 1Kg da matriz de solo, sendo que uma delas posteriormente recebeu o tratamento e a outra não. O esquema da Figura 51 ilustra a montagem do experimento.

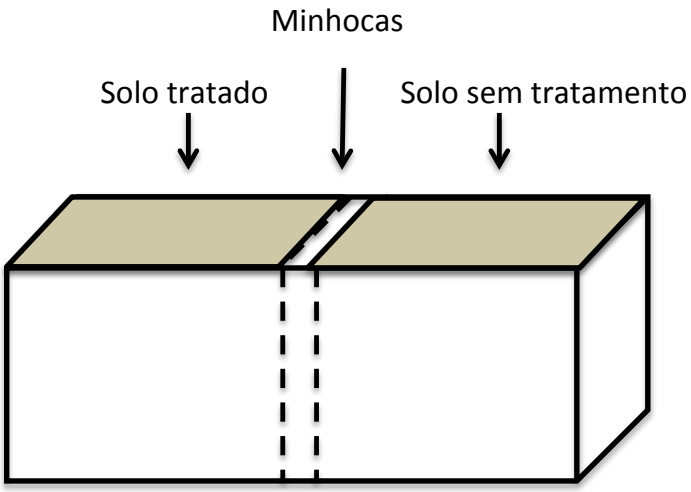

Figura 51. Representação esquemática do experimento de avaliação do comportamento de fuga (ISO, 2007).

As misturas prontas da matriz foram introduzidas nos recipientes, e em seguida aplicou-se as suspensões celulares utilizando-se pipeta automática. Com auxílio de espátulas estéreis os tratamentos foram homogeneizados. O espaço entre os solos tratado e não tratado promovido pelo separador foi mantido durante todo o experimento para evitar contaminação entre as respectivas matrizes.

Foram introduzidas 10 minhocas por recipiente, colocadas especificamente no espaço entre as duas partes do solo formadas após a retirada do espaçador (Figura 52). Os recipientes foram acondicionados em sala com temperatura variando de 20 a 25°C e fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro. A superfície dos recipientes foi fechada com auxílio de um tecido tipo filó (véu) para possibilitar a troca gasosa impedindo o eventual escape das minhocas.

Figura 52. Fotos da montagem e condução do experimento de comportamento de fuga. (1) Figuras na parte superior: Introdução das minhocas no espaço entre solo tratado e não tratado. (2) Figuras da parte inferior: Experimento em andamento.

A avaliação foi feita 48 horas após a introdução das minhocas. Para tanto, cada recipiente teve suas partes separadas em bandejas onde se procedeu a contagem de indivíduos.

3.1.2.2. Resultados e Conclusão;

As minhocas têm o solo como seu habitat natural, e por isso dependem da boa qualidade deste ambiente para seu crescimento e reprodução. Por este motivo estes organismos desenvolveram sensibilidade para percepção de elementos químicos ou biológicos desfavoráveis a seu desenvolvimento. A capacidade sensitiva das minhocas faz desse organismo a escolha ideal para testes de toxicidade e, mais do que isso, permitem a condução de estudos de comportamento de fuga ou *avoidance*.

As leveduras estão presentes no solo em contato constante com todos os demais organismos, servindo inclusive de alimento para várias espécies. Não existe motivo para acreditar que células de leveduras exerçam qualquer atividade predatória ou antagonista em organismos de solo como as

minhocas. A Levedura RN1016 expressa a proteína xilose isomerase, que por sua vez não apresenta histórico de efeito indesejado.

A Tabela 17 mostra os números de minhocas presentes em cada porção de solo (tratado / não tratado) para cada repetição dos diferentes tratamentos: Controle positivo de referência (Ácido Bórico), Linhagem convencional (CEN.PK), Linhagem comercial (Pedra 2), e Linhagem RN1016 (avaliada). Na tabela também pode-se observar a média das repetições nos diferentes tratamentos, bem como o valor calculado de fuga (*Evitação*).

O cálculo da resposta em % de fuga é feito pela seguinte fórmula (Amorim *et al*., 2012):

RL = ((C-T)/10)X 100

Em que:
C = soma de minhocas observadas no solo não tratado
T = soma de minhocas observadas no solo tratado
10 = número total de minhocas por repetição
RL = resposta líquida (% de *Evitação*).

Tabela 17. Avaliações do comportamento de fuga das minhocas aos tratamentos utilizados. Observa-se o número de indíviduo em cada tratamento por repetição, bem como a média total e *% de evitação* (*avoidance*).

Substância: Controle (+) Ácido Bórico			
	Número de Indivíduos		
Repetição:	Tratado	Não tratado	% de *Evitação*
1	0	10	100
2	0	10	100
3	0	10	100
Média:	**0**	**10**	**100**
Substância: **Linhagem CEN.PK – Parental não GM**			
	Número de Indivíduos		
Repetição	Tratado	Não tratado	% de *Evitação*
1	3	7	40
2	8	2	-60
3	3	6	33,3
Média:	**4,7**	**5**	**3,1**
Substância: **Linhagem Pedra2– Controle Comercial**			
	Número de Indivíduos		
Repetição	Tratado	Não tratado	% de Evitação
1	5	5	0,0
2	5	5	0,0
3	4	5	11,1
Média:	**4,7**	**5**	**3,1**
Substância: **Linhagem RN1016 – OGM Avaliado**			
	Número de Indivíduos		
Repetição	Tratado	Não tratado	% de Evitação
1	4	6	20
2	7	3	-40
3	7	3	-40
Média:	**6**	**4**	**-20**

Valores negativos e iguais ou próximos de zero indicam que não existe comportamento de fuga. Valores positivos que não são próximos de zero indicam comportamento de fuga em relação ao tratamento utilizado (Amorim *et al*., 2012).

O comportamento das minhocas no controle positivo, contendo ácido bórico foi exatamente como esperado. Todas as minhocas introduzidas se locomoveram e estavam concentradas no lado sem tratamento, resultando

em um fator RL de 100, que caracteriza 100% de fuga. Este resultado valida o presente experimento de comportamento de fuga.

Os controles não GM (Linhagem CEN.PK) e comercial (Linhagem Pedra 2) coincidentemente apresentaram um valor médio de fuga igual de 3,1. Este e um valor muito próximo de zero, e as ocorrências individuais nas diferentes repetições não mostram qualquer padrão de distribuição das minhocas para o lado tratado ou não tratado. A substância avaliada neste estudo, a Linhagem RN1016, também obteve o resultado esperado, representado por um valor médio negativo de -20, que caracteriza ausência de comportamento de fuga. Assim como os controles comercial e não GM, os números observados nas repetições do tratamento RN1016 não permite a definição de nenhum padrão, seja de fuga ou atração pelas minhocas.

Estes resultados confirmam a hipótese inicial de que a Linhagem RN1016 não é potencial causadora de efeito adverso a organismos de solo, uma vez que, mesmo submetidos a concentração extremamente elevada, organismos da espécie *Eudrilus eugeniae* não mostraram comportamento de fuga se deslocando para a matriz sem tratamento. No presente experimento também não se observou mortalidade em nenhum dos tratamentos, corroborando a hipótese de que a Linhagem RN1016 não é causadora de efeito adverso a organismos de solo.

3.2. Ecotoxicologia Aquática;

A ecotoxicologia pode ser entendida como a ciência que estuda o impacto potencialmente deletério de substâncias ou compostos químicos sobre os organismos vivos. A ecotoxicologia compreende a integração da ecologia e da toxicologia, e tem como principal objetivo prever e entender os efeitos de substâncias diversas sobre comunidades naturais sob condições reais ou próximas da realidade (Chapman, 2002).

Neste contexto, a ecotoxicologia aquática surge como um ramo da ciência dedicado a avaliação do efeito de substâncias químicas ou biológicas em ambientes aquáticos. O objetivo primário consiste na avaliação do grau de impacto, reversibilidade e determinação qualitativa e quantitativa do risco à exposição (Boudou & Ribeyre, 1997).

Dentre os organismos utilizados como indicadores aquáticos para testes de ecotoxicidade, destacam-se o microcrustáceo *Daphnia*, das espécies *D. similis* e *D. magna*, e o peixe da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha, ou *zebrafish* (Krull & Barros, 2012). Assim como no caso dos experimentos de ecotoxicidade aguda, estes testes são bastante padronizados e empregados para avaliação do impacto de substâncias químicas e poluentes ambientais. No presente caso, o Laboratório Tecam – Tecnologia Ambiental empregou metodologia estabelecida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT para realização de ensaios com Peixes (Norma NBR15088) e *Daphnia* (NBR 12713).

3.2.1. Avaliação da ecotoxicidade aguda da Linhagem RN1016 de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) ao organismo indicador aquático *Daphnia similis*.

Dapnhia é um microcrustáceo da ordem cladocera, popularmente conhecida por “pulga d’água”. É um organismo aquático que tem hábito alimentar bastante característico. A *Daphnia* é conhecida como um organismo que “filtra” a água, utilizando suas cerdas para capturar microrganismos e outras partículas que lhe servem de alimento. Esta característica faz este organismo especialmente interessante para avaliação

da biossegurança da Levedura RN1016, uma vez que as leveduras são um importante alimento das *Daphnias*.

As *Daphnias* servem de alimentos para peixes, e são comumente criadas em cativeiro e comercializadas para utilização em aquários. Esta característica da cadeia trófica do microcrustáceo reafirma sua importância como organismo indicador aquático. Os criadores de Daphnia frequentemente utilizam leveduras para alimentação das criações, portanto sua utilização como organismo teste na avaliação da biossegurança da Linhagem RN1016 não poderia ser mais conveniente.

Além do importante fator alimentar, as *Daphnias* são bastante sensíveis a alterações no ambiente aquático, e por isso representam um dos principais organismos utilizado para testes de ecotoxicidade aquática (Krull & Barros, 2012).

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda para *Daphnia similis* de amostras de levedura *S. cerevisiae* da Linhagem avaliada (RN1016) e das Linhagens controle parental não GM (CEN.PK) e comercial Pedra 2.

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, conhecida por $CE(I)_{50}$; 48h. A descrição detalhada das condições de manutenção e dos dados biológicos da cultura encontram-se arquivados no *TECAM- TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL*.

3.2.1.1. Material e Métodos;

Tratamentos

Linhagem RN1016 – Susbtância avaliada

Linhagem CEN.PK – Substância controle parental não GM

Linhagem Pedra 2 – Controle comercial não GM

Organismo indicador

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

Idade: Jovens com 6 a 24 horas.

Condições de ensaio

Temperatura média da água: 19,2 ± 0,3°C.

Fotoperíodo: sem iluminação.

Renovação do meio: estático.

Água de diluição e controle: meio sintético MS.

Duração: 48 horas.

Laboratório de ensaio acreditado pela Cgcre de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número CRL 0395.

Cultivo e controle de sensibilidade

O cultivo dos animais é realizado com 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 2,66 g NaCl/L, com limites de controle (média ± 2.desvio-padrão) entre 1,33 a 3,99 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 3,30 g NaCl/L, com intervalo de confiança entre 3,01 a 3,62 g NaCl/L. Este valor está dentro da faixa definida para avaliação do sistema-teste.

Procedimentos

Foram realizados ensaios com as seguintes concentrações das substâncias teste: 25,00 mg/L; 50,00 mg/L; 100,0 mg/L e 200,0 mg/L. Organismos jovens com 6 a 24 horas de idade foram selecionados da cultura isolada 24 horas antes do início do ensaio. Foram adicionados cinco organismos em cada béquer com 25 mL de solução teste e um controle, com quatro réplicas em 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 das quatro concentrações testadas. Além dessas análises, foi também determinada a dureza total da água de diluição.

3.2.1.2. Resultados e conclusão;

Os resultados dos ensaios com as amostras de levedura são apresentados nas Tabelas de 18 a 20. Nas Tabelas 21 a 23 estão os resultados das análises físicas e químicas efetuadas no início e no final do ensaio. O ensaio foi considerado válido, conforme estabelecido pela norma ABNT (2009).

Não foi observada imobilidade ou mortalidade nem mesmo na maior concentração preparada (200,0 mg/L). Desta forma, a $CE(I)_{50;48}$ concentração efetiva inicial mediana da amostra foi considerada superior a 200,0 mg/L. As concentrações empregadas representam uma cultura de volume considerável levada a saturação, inoculada em uma quantidade reduzida de meio aquoso.

É altamente improvável semelhante situação ocorrer em escala real no meio ambiente, uma vez que as culturas empregadas nos fermentadores industriais, além de não serem levadas à saturação, tem volume irrisório quando comparado aos volumes de lagos ou cursos d'água de tamanho mediano ou até mesmo reduzido. É importante ressaltar que a utilização da Levedura RN1016 para produção de etanol se dará em sistema fechado, e em momento algum células viáveis são descartadas no meio ambiente ou em qualquer outro lugar. O presente ensaio considera uma situação altamente improvável de um acidente com vazamento massivo de culturas celulares viáveis.

Tabela 18. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem R1016 de levedura.

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
25,00 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
50,00 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
100,0 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
200,0 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0

Conforme observa-se na Tabela 18, não houve imobilidade, característica de mortalidade, para nenhuma das quatro concentrações de RN1016 testadas. Conclui-se que a concentração efetiva inicial $CE(I)_{50}$; 48h é superior a 200mg/L de células puras de levedura da Linhagem RN1016.

Tabela 19. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle parental não GM (CEN.PK).

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
25,00 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
50,00 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
100,0 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
200,0 mg/L	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	5

A Tabela 19 mostra a ocorrência de imobilidade nos tratamentos com diferentes concentrações de células puras da linhagem controle não GM CEN.PK. Observou-se apenas a imobilidade de 1 animal na repetição n° 2 da concentração de 200mg/L de levedura. Esta observação não é estatisticamente significativa, sendo um efeito de ocorrência aleatória sem relação com o tratamento empregado. Assim como no tratamento com a Levedura RN1016, conclui-se que a concentração efetiva inicial $CE(I)_{50}$; 48h é superior a 200mg/L de células puras de levedura da Linhagem parental CEN.PK.

Tabela 20. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle comercial Pedra 2.

Concentração Nominal	Número de animais por réplica (imóveis/total)					Imobilidade (%)
	Rép. 1	Rép. 2	Rép. 3	Rép. 4	Total	
Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
25,00 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
50,00 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
100,0 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0
200,0 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0

Observa-se na Tabela 20 o mesmo padrão observado nos tratamentos anteriores. Não houve imobilidade para nenhuma das quatro concentrações da levedura comercial Pedra 2 testadas. Conclui-se que a concentração efetiva inicial $CE(I)_{50}$; 48h é superior a 200mg/L de células puras de levedura da Linhagem Pedra 2.

Tabela 21. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem RN1016.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O_2/L)		Dureza total (mg $CaCO_3$/L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,41	7,29	7,03	7,58	46,0
25,00 mg/L	7,02	7,47	5,90	7,39	-
50,00 mg/L	6,98	7,41	5,65	7,34	-
100,0 mg/L	6,96	7,41	5,63	7,21	-
200,0 mg/L	6,90	7,43	5,48	7,00	-

Tabela 22. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem controle CEN.PK.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O_2/L)		Dureza total (mg $CaCO_3$/L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,41	7,29	7,03	7,58	46,0
25,00 mg/L	7,05	7,28	5,93	6,96	-
50,00 mg/L	7,04	7,24	5,65	6,97	-
100,0 mg/L	7,00	7,26	5,59	6,78	-
200,0 mg/L	6,91	7,27	5,62	5,60	-

Tabela 23. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem comercial Pedra 2.

Concentração Nominal	pH		Oxigênio Dissolvido (mg O_2/L)		Dureza total (mg $CaCO_3$/L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,41	7,29	7,03	7,58	46,0
25,00 mg/L	7,06	7,31	5,76	6,42	-
50,00 mg/L	7,05	7,30	5,97	6,39	-
100,0 mg/L	7,00	7,25	5,78	5,80	-
200,0 mg/L	6,94	7,31	5,73	5,97	-

Conforme esperado, não observou-se diferença significativa nas análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição para os diferentes tratamentos avaliados.

3.2.2. Avaliação da ecotoxicidade aguda da Linhagem RN1016 de levedura (*S. cerevisiae*) ao organismo indicador aquático *Danio rerio*;

Danio rerio, também conhecido como paulistinha ou *zebrafish*, é um peixe pequeno que vive em águas frescas de clima tropical. As características listras ao longo do corpo deram o nome à espécie, que hoje é um dos maiores modelos de estudos em Genética e Biologia Molecular do mundo (Bopp *et al*., 2006).

O desenvolvimento embrionário do peixe *Danio rerio* se assemelha à embriogênese em vertebrados superiores, incluindo os seres humanos, com a diferença de ter seu desenvolvimento embrionário ocorrendo no exterior do corpo materno (Wixon, 2000). Esta espécie já teve seu genoma sequenciado, e hoje conta com diversos bancos de dados e ferramentas de análise de expressão gênica em larga escala disponíveis ao público. *Danio rerio* é tradicionalmente um importante modelo para diversas áreas do conhecimento, como a genética e desenvolvimento, farmacologia, mutagênese e mais recentemente a toxicologia.

A utilização de *Danio rerio* em estudos de ecotoxicologia já atingiu considerável normatização, contando com diferentes testes padronizados por agências competentes e reproduzidos em diferentes Laboratórios do mundo (ANBT, 2005; 2011). Isso se deve principalmente ao curto ciclo de vida do animal, tamanho reduzido e rápida maturação sexual, adicionado a vasta quantidade de informações sobre a espécie na literatura científica (Bopp *et al*., 2006). Em conjunto, estas características fazem do peixe *D. rerio* um excelente organismo modelo para estudos de ecotoxicidade, e portanto foi empregado no estudo da avaliação de biossegurança da Levedura RN1016.

O objetivo deste ensaio foi determinar a toxicidade aguda de amostras biológicas de *S. cerevisiae* para peixes da espécie *Danio rerio*. Após 96 horas de exposição, deve ser estabelecida a concentração nominal inicial da amostra que causa a mortalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições de ensaio (Concentração Letal Inicial Mediana - $CL(I)_{50}$; 96h). Deste modo estima-se o potencial efeito tóxico da substância testada ao organismo indicador aquático.

3.2.2.1. Material e Métodos;

Tratamentos – *S. cerevisiae*

Linhagem RN1016 – Susbtância avaliada.

Linhagem CEN.PK – Substância controle parental não GM.

Linhagem Pedra 2 – Controle comercial não GM.

Organismo indicador

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

Período de aclimatação: 42 dias.

Peso do grupo controle: 0,4817 g.

Comprimento médio total do grupo controle: 154, ± 0,1 cm.

Condições de ensaio

Temperatura média da água: 23,6 ± 0,5°C.

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

Renovação do meio: a cada 24 horas (teste semi-estático).

Aeração: não.

Laboratório de ensaio acreditado pela Cgcre de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número CRL 0395

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 Laboratórios 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 864,0 mg KCl/L, com limites de controle (média ± 2.desvios-padrão) entre 569,0 a 1159 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 984,9 mg KCl/L, com intervalo de confiança entre 826,5 a 1174 mg KCl/L.

Procedimentos

Foram realizados ensaios com as seguintes concentrações: 25,00 mg/L; 50,00 mg/L; 100,0 mg/L e 200,0 mg/L. As amostras foram diluídas 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. Para cada tratamento 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 eutanásiados, 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 nas quarto concentrações testadas além da análise da dureza total da água de diluição.

3.2.2.2. Resultados e conclusão;

Os resultados do ensaio com as amostras de levedura são apresentados nas Tabelas de 24 a 26. Nas Tabelas 27 a 29 estão os resultados das análises físicas e químicas das soluções. O ensaio foi considerado válido, conforme estabelecido pela Norma ABNT (2011).

Após 96 horas de exposição aos diferentes tratamentos, não houve mortalidade em nenhuma das 4 concentrações de ensaio. Conforme mencionado no experimento anterior, as concentrações testadas foram determinadas considerando uma condição de extrema abundância relativa de células em um volume de meio aquoso. Mesmo nas altas concentrações testadas não observou-se mortalidade de nenhum organismo indicador quando exposto à células viáveis da Linhagem RN1016, bem como dos respectivos controles parental não GM (CEN.PK) e comercial (Pedra 2). Este resultado corrobora a hipótese de que a Linhagem RN1016 é equivalente aos controles parental não GM e comercial, não apresentando qualquer efeito adverso ao organismo indicador *Danio rerio*.

Em função dos resultados obtidos, a concentração inicial letal mediana ($CL(I)_{50}$; 96h) da amostra foi considerada superior a 200,0 mg/L.

Tabela 24. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem RN1016.

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
25,00 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
50,00 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
100,0 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
200,0 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0

Conforme observa-se na Tabela 24, não houve mortalidade para nenhuma das quatro concentrações de RN1016 testadas. Conclui-se que a concentração efetiva inicial $CE(I)_{50}$;96h é superior a 200mg/L de células puras de levedura da Linhagem RN1016.

Tabela 25. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle comercial Pedra 2.

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
25,00 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
50,00 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
100,0 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
200,0 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0

A Tabela 25 mostra a ocorrência de mortalidade nos tratamentos com diferentes concentrações de células puras da linhagem controle não GM CEN.PK. Não se observou mortalidade de organismo indicador para todas as concentrações testadas. Assim como no tratamento com a Levedura RN1016, conclui-se que a concentração efetiva inicial $CE(I)_{50}$;96h é superior a 200mg/L de células puras de levedura da Linhagem parental CEN.PK.

Tabela 26. Taxa de imobilidade após 48 horas de cultivo com diferentes concentrações da Linhagem controle comercial Pedra 2.

Concentração nominal	Número cumulativo de animais mortos/total				Mortalidade (%)
	24h	48h	72h	96h	
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0
25,00 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
50,00 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
100,0 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0
200,0 mg/L	0/10	0/10	0/10	0/10	0

Observa-se na Tabela 26 o mesmo padrão observado nos tratamentos anteriores. Não houve mortalidade para nenhuma das quatro concentrações da levedura Pedra 2 testadas. Conclui-se que a concentração efetiva inicial $CE(I)_{50}$;96h é superior a 200mg/L de células puras de levedura da Linhagem Pedra 2.

Tabela 27. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem RN1016.

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O_2/L)		Dureza total (mg $CaCO_3$/L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,42	7,37	7,47	5,22	46,0
25,00 mg/L	7,48	7,17	7,48	3,67	-
50,00 mg/L	7,60	7,19	7,33	3,35	-
100,0 mg/L	7,47	7,08	7,27	3,06	-
200,0 mg/L	7,42	7,04	7,13	1,79	-

Tabela 28. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem controle CEN.PK.

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O_2/L)		Dureza total (mg $CaCO_3$/L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,42	7,37	7,47	5,22	46,0
25,00 mg/L	7,65	7,09	7,29	2,83	-
50,00 mg/L	7,57	7,16	7,17	2,84	-
100,0 mg/L	7,53	7,08	7,11	2,73	-
200,0 mg/L	7,45	7,05	7,03	2,29	-

Tabela 29. Análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição. Tratamento Linhagem comercial Pedra 2.

Concentração nominal	pH		Oxigênio dissolvido (mg O_2/L)		Dureza total (mg $CaCO_3$/L)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
Controle	7,42	7,37	7,47	5,22	46,0
25,00 mg/L	7,55	7,13	7,12	2,96	-
50,00 mg/L	7,49	7,17	7,05	3,03	-
100,0 mg/L	7,45	6,97	6,99	3,80	-
200,0 mg/L	7,39	6,98	6,96	2,15	-

Conforme esperado, não observou-se diferença significativa nas análises de pH, dureza total e teor de oxigênio dissolvido da água de diluição para os diferentes tratamentos avaliados.

3.3. Avaliação do Impacto da Levedura RN1016 na microbiota aquática de fontes naturais;

Uma vez que a levedura RN1016 será utilizada apenas no interior dos fermentadores e será totalmente desvitalizada antes do descarte/destino dos resíduos da indústria de etanol celulósico, não existe razão para acreditar que células viáveis alcancem cursos naturais de água. No entanto, considerando um improvável acidente, optou-se por testar possíveis efeitos da levedura RN1016 na microbiota de fontes naturais de água em comparação com os efeitos da levedura controle parental (não-GM). Este experimento foi conduzido pelo Laboratório de Biotecnologia (Labiotec) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.3.1. Materiais e Métodos;

Coleta das amostras de água

Com o objetivo de testar possíveis efeitos das leveduras em amostras de água de fontes naturais, coletou-se amostra de três matrizes distintas: Um lago, um rio e da rede pública (torneira). As amostras foram coletadas com auxílio de garrafas de vidro borosilicato (Schott Duran). As garrafas foram lavadas e colocadas em estufas para secagem antes da coleta. As coletas foram feitas conforme o "Guia de coleta e preservação de amostras de água" (CETESB, 1987).

Locais de coleta

- **Coleta 1:** Lago do Instituto de Biologia – UNICAMP. Campinas, SP.
- **Coleta 2:** Ribeirão da Avenida Professor Romeu Tórtima. Barão Geraldo, Campinas, SP.
- **Coleta 3:** Água tratada da rede pública. Torneira do Laboratório de Genômica e Expressão. UNICAMP. Campinas, SP.

As Figuras 53 a 55 ilustram os locais e procedimentos de coleta das amostras de água utilizadas no experimento.

Figura 53. Coleta de amostra de água no Lago do Instituto de Biologia da Unicamp.

Figura 54. Coleta de amostra de água no Ribeirão da Avenida Romeu Tórtima. Barão Geraldo. Campinas – SP.

Figura 55. Coleta de amostra de água da rede pública (torneira). Campinas – SP.

Análise de Coliformes

A análise de coliformes foi feita pela determinação do número mais provável (NMP). Os procedimentos de análise foram feitos conforme Silva e colaboradores (2010) e Pinto e colaboradores (2003).

Resumidamente, as análises foram realizadas inoculando-se 1mL de amostra de água em 9mL de meio LST (caldo Lauril - Sulfato triptona) ou LST/MUG (para identificação de coliformes fecais) contendo tubo coletor de gás em triplicata em 2 diluições. Tais diluições foram 1:10 e 1:100.

Após devida incubação dos tubos à 37°C por 24-48 horas, foram realizadas provas confirmatórias dos tubos contendo crescimento

evidenciado por turbidez e/ou formação de gás observado no tubo de coleta. As provas se baseiam na confirmação de coliformes totais por repique em caldo verde brilhante dos tubos que foram positivos na análise precedente. A confirmação de coliformes fecais foi feita pela visualização de coloração azul fluorescente característica sob luz UV do crescimento em caldo LST - MUG.

Os resultado do número de tubos que observou-se crescimento (turbidez e/ou produção de gás) foram identificados na tabela de "Número Mais Provável" (NMP) demonstrando o NMP/mL.

Tabela 30. Resumo das análises microbiológicas realizadas com as amostras de água contendo a levedura RN1016 e controles. A Tabela indica a metodologia utilizada e respectiva bibliografia de referência.

Denominação da Análise	Metodologia	Bibliografia
Análise de Coliformes Totais	Determinação de Número Mais Provável (NMP) em Meio Lauril-Sulfato Triptona e confirmação em Caldo Verde Brilhante (tubos em 3 diluições em Triplicata para determinação do NMP/mL)	Silva *et al*., 2010 Pinto *et al*., 2003
Análise de Coliformes Fecais (Detecção de *Escherichia coli*)	Determinação de Número mais provável (NMP) em Meio Lauril-Sulfato Triptona – MUG e confirmação sob luz UV (tubos em 3 diluições em Triplicata para determinação do NMP/mL)	Silva *et al*., 2010 Pinto *et al*., 2003

Tratamentos

Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicatas.

Controle negativo (sem leveduras):

- **Amostra 1**: Lago do Instituo de Biologia/IB/UNICAMP.
- **Amostra 2**: Ribeirão da Avenida Professor Romeu Tórtima.
- **Amostra 3**: Água tratada da torneira do LGE/ IB/UNICAMP.

Controle positivo (leveduras parental não GM):

As amostras 1, 2 e 3 foram contaminadas com 0,5mL de uma suspensão celular DO600 = 1.0 (cerca de $1x10^7$ células de levedura/mL) da levedura selvagem parental em um volume de 50 mL de água obtendo-se as seguintes amostras:

- **Amostra 4:** Amostra 1 contaminada com a levedura selvagem Parental.
- **Amostra 5:** Amostra 2 contaminada com a levedura selvagem Parental.
- **Amostra 6:** Amostra 3 contaminada com a levedura selvagem Parental.

Linhagem avaliada (RN1016):

As amostras 1, 2 e 3 foram contaminadas com 0,5mL de uma suspensão celular DO600 = 1.0 (cerca de $1x10^7$ células de levedura/mL) da levedura RN1016 em um volume de 50 mL de água obtendo-se as seguintes amostras:

- **Amostra 7:** Amostra 1 contaminada com a levedura RN1016.
- **Amostra 8:** Amostra 2 contaminada com a levedura RN1016.
- **Amostra 9:** Amostra 3 contaminada com a levedura RN1016.

3.3.2. Resultados e Conclusão;

As amostras utilizadas se mostraram consideravelmente distintas umas das outras com relação a ocorrência de microrganismos.

A amostra oriunda do Ribeirão da Avenida Prof. Romeu Tórtima apresentou população superior aos limites estatísticos aceitáveis de contagem em meio PCA. Este padrão foi observado tanto para o controle sem tratamento (Amostra 2), quanto para as amostras onde foram inoculadas culturas celulares das leveduras parental não GM (Amostra 5) e RN1016 (Amostra 8). Esta observação limita a aplicação de testes estatísticos, mas demonstra que a população de microrganismos da amostra de água do Ribeirão não alterou sensivelmente quando em contato com a alta concentração de leveduras introduzidas no meio, seja controle convencional ou GM (RN1016).

A título de ilustração, a Figura 56 mostra fotos das placas contendo 3 diluições dos tratamentos referentes às amostras 2, 5 e 8, que representam a amostra de água do Ribeirão da Avenida Prof. Romeu Tórtima sem inóculo

de leveduras (B), com inóculo da levedura selvagem (C) e com inóculo da levedura RN1016 (D), respectivamente.

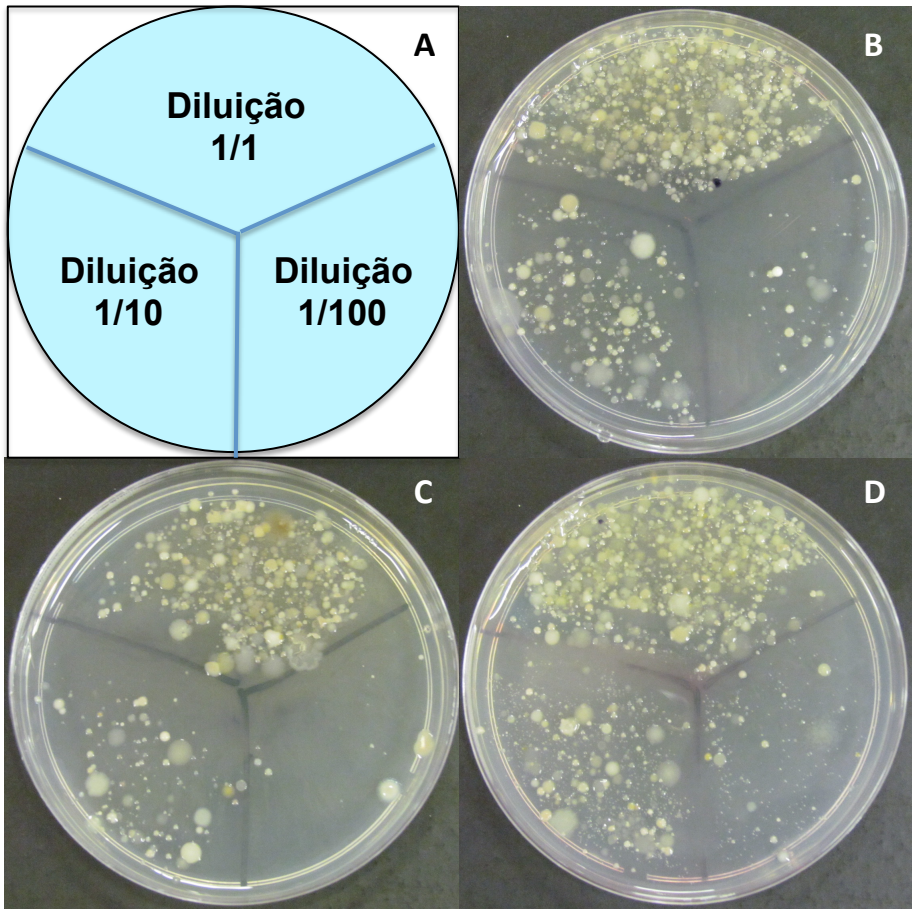

Figura 56. Placas das amostras 2, 5 e 8 em meio PCA. A figura ilustra 3 diferentes diluições (1/1, 1/10 e 1/100) da amostra de água da Avenida Prof. Romeu Tórtima (Campinas – SP) sem inóculo de leveduras e com inóculo das leveduras CEN.PK (parental não GM) e RN1016 (GMO avaliada).

A amostra de água tratada, obtida diretamente da rede pública (torneira) se mostrou ausente de microrganismos.

A amostra oriunda do lago do Instituto de Biologia mostrou uma ocorrência significativa de microrganismos. Analisando as contagens referentes aos três tratamentos avaliados: controle negativo (Amostras 1), levedura parental não GM (Amostra 4) e levedura RN1016 (Amostra 7), observa-se que o número (NMP) de coliformes totais e fecais observados entre tratamentos não difere estatisticamente. O tratamento que recebeu a levedura selvagem não GM apresentou número NMP de coliformes totais um pouco superior aos demais tratamentos, no entanto observa-se uma interseção nos números referentes aos limites de confiança (95%) tabelados.

Estes resultados indicam que não existe diferença significativa entre os tratamentos avaliados.

Tabela 31. Resultados das leituras de UFCs dos microrganismos em sistema PCA.

Amostra de Água	Número Mais Provável de coliformes TOTAIS/ml, e Limites de Confiança tabelados (95%)	Número Mais Provável de coliformes FECAIS/ml, e Limites de Confiança tabelados (95%)	Comentários
1 (Lago IB)	23 (4 a 47)	23 (4 a 47)	
2 (Ribeirão)	>2400	460 (71 a 2400)	Excessiva contaminação inicial foge dos parâmetros estatísticos
3 (Torneira)	Não detectado	Não detectado	Água tratada
4 (Lago IB)	150 (30 a 440)	7 (1 a 23)	
5 (Ribeirão)	>2400	15 (3 a 44)	Excessiva contaminação inicial foge dos parâmetros estatísticos
6 (Torneira)	Não detectado	Não detectado	Água tratada
7 (Lago IB)	23 (4 a 47)	11 (3 a 36)	
8 (Ribeirão)	>2400	11 (3 a 36)	Excessiva contaminação inicial foge dos parâmetros estatísticos
9 (Torneira)	Não detectado	Não detectado	Água tratada

Os resultados apresentados indicam que a levedura RN1016 não é potencialmente causadora de impacto à flora microbiana de fontes de água de ocorrência natural. A contagem de microrganismos mostrou equivalência para os tratamentos avaliados, indicando que as leveduras, tanto a RN1016 quanto a selvagem, não promovem impacto significativo na microbiota nativa.

Os dados observados também demonstram comportamento equivalente entre as duas linhagens de leveduras empregadas neste ensaio (RN1016 e parental).

Em conjunto, e somados às observações do ítem 4.2, os dados observados comprovam que a modificação genética incluída na levedura RN1016 não faz desta linhagem um organismo potencialmente causador de efeitos adversos à flora microbiana aquática.

3.4. Conclusões finais;

Leveduras da espécie *S. cerevisiae* são ubíquas na natureza. Sua utilização pelo homem data de milhares de anos atrás. Atualmente este microrganismo é a base para produção de etanol no Brasil e no mundo. Por estes motivos, a exposição do homem e de animais a este organismo é muito grande e íntima, uma vez que animais consomem leveduras em rações e o homem em pães, cervejas e outros alimentos.

Não existe motivo para acreditar que a introdução do gene *XylA* possa alterar de alguma forma as propriedades bioquímicas da levedura a ponto de torná-la potencialmente causadora de efeitos adversos a saúde humana, animal e ao meio ambiente.

Os experimentos de ecotoxicidade terrestre e aquática apresentados e discutidos nesta seção demonstram claramente que a Linhagem RN1016 não é tóxica para minhocas, peixes e para o microcrustáceo *Daphnia*. Mais do que isso, os experimentos mostram que a presença desta linhagem no meio de cultivo deste animais não provoca qualquer tipo de efeito quando comparado aos controles convencional (não GM) e comercial. Os resultados equivalem inclusive aos observados nos controles negativos, onde nenhuma substância foi introduzida.

Finalmente concluímos que a levedura RN1016 não é potencial causadora de efeitos adversos à saúde humana, animal e ao meio ambiente, e que a utilização deste organismo em sistemas fechados, sem liberação ambiental de formas viáveis, não apresenta riscos do ponto de vista da biossegurança em seu sentido mais amplo. Mesmo em um improvável caso de liberação acidental no meio ambiente esta linhagem se mostrou tão segura quanto seu equivalente não modificado geneticamente.

4. A sobrevivência e a dispersão do OGM na água, no ar e no solo;

4.1. Sobrevivência da Levedura RN1016 no Solo;

4.1.1. Introdução ;

A água é essencial para a vida, e assim, sua remoção, mesmo que de uma pequena quantidade, é frequentemente relacionada a um estresse letal para uma célula (Billi & Potts, 2002; Shirkey *et al*., 2003). Organismos que possuem a capacidade de remover virtualmente todo o conteúdo de água celular possuem um sistema de adaptação único que pode ter sido originado no princípio de sua evolução, talvez levando a uma distribuição generalizada de células primitivas (Potts,1994).

A tolerância a 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 contém embriões dessecados, e raramente também em adultos extremófilos, como bactérias (*Deinococcus radiodurans*), fungos, plantas (briófitas) e animais (nematóides, camarões de água salgada) (Potts, 1994). A dessecação impõe às células um variado número de estresses, incluindo hiper-osmolaridade, hiper-oxidação, hiper-inonicidade e agregação/não enovelamento de proteínas (Chakrabortee *et al*. 2007; Franca *et al*. 2005). Todos estes estresses têm um potencial efeito de impor danos letais a componentes essenciais da células, como o DNA, proteínas e membranas (Herrero *et al*. 2008; Hohmann, 2009; Verghese *et al*. 2012). Entretanto, quais desses estresses sozinhos ou em combinação são responsáveis pela morte induzida pela dessecação e como os extremófilos enfrentam os relevantes estresses letais são desconhecidos.

Organismos dessecados vêm sendo estudados por muitos anos e diversas moléculas que mitigam os efeitos dos diferentes estresses também vêm sendo identificadas nestes organismos. Estas putativas moléculas protetoras incluem osmólitos, proteínas *heat shock*, enzimas de balanço redox, trealose, pequenas proteínas hidrofílicas e outros (Billi & Potts, 2002; Crowe *et al*. 1992b; Tunnacliffe & Wise, 2007).

A tolerância à dessecação de células de *S. cerevisiae* durante a fase estacionária é maior se comparada com células em fase exponencial (Calahan *et al*. 2011; Ratnakumar e Tunnacliffe, 2006). Além disso, os esporos têm uma resistência ainda maior que células em fase estacionária aos extremos deste estresse. Esta característica está relacionada com a incorporação de trealose nos esporos, que, além da desidratação, confere uma resistência a temperatura elevada, sais e solventes.

A esporulação de leveduras é induzida quando as células estão presentes em meio com deficiência de nitrogênio e na presença de uma fonte pobre de carbono. Durante este processo, os cromossomos se duplicam seguido de duas divisões celulares, formando quatro núcleos haploides. Estes núcleos, juntamente com o citoplasma que os envolvem, são individualmente organizados em ascósporos, e os quatro ascósporos resultantes (tétrade) de uma única meiose são mantidos juntos em uma estrutura de parede celular espessa (asco).

A diploidia e a falta de nutrientes são duas condições sem as quais a meiose normalmente não ocorre. Além disso, ambos os produtos do sistema gênico *mating-type* (MATa e MATα) são requeridos para meiose. Assim, haploides MATa e MATα, assim como diploides com os genótipos MATa/MATa, MATα/MATα, mat_a/MATα, MATa/mat_α e mat_a/mat_α são deficientes em meiose (Kassir & Simchen, 1976; Kassir, 1982; MacKay e Manney, 1974; Roman & Sands, 1953; Strathern *et al*., 1981).

Portando, as linhagens RN1016 (diploide MATa/MATa) e CEN.PK (haploide MATa) não esporulam, enquanto que PE-2 (diploide MATa/MATα) possui uma alta taxa de esporulação (Argueso *et al*., 2009). Não esporulando, as células de RN1016 possuem capacidade altamente limitada de permanecer viável ao longo do tempo no solo. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a sobrevivência e dispersão de células da Linhagem RN1016 no solo. As questões referentes à esporulação são melhor detalhadas no item 1 do Anexo IV.

4.1.2. Materiais e Métodos;

Coleta e preparo do solo

Para avaliar o tempo de viabilidade no solo de linhagens de *S. cerevisiae,* foram utilizadas amostras de solo provenientes de um canavial livre de adição de vinhaça. O solo, coletado na região de Piracicaba – SP, foi homogeneizado e alíquotas de 500 g foram distribuídas em 15 garrafas de vidro tipo Schott com capacidade de 1 L. As garrafas com solo foram então fechadas com tampões de algodão, para permitir a troca de gases, e autoclavadas a 121°C durante 1 hora.

Preparo e inóculo das culturas

Duas linhagens de *S. cerevisiae* foram avaliadas quanto ao tempo de viabilidade no solo em condições controladas em comparação com a linhagem geneticamente modificada RN1016: (1) CEN.PK – parental selvagem de RN1016; (2) Pedra 2 (PE-2) - linhagem selvagem comercialmente usada na produção de etanol no Brasil.

Para o preparo do inóculo, 40 µL de culturas permanentes de cada linhagem foram inoculadas em cinco tubos contendo 5 mL de meio YPD rico em açúcar (12% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura). As culturas foram mantidas a 30°C por 48 horas e 250 rpm até atingirem a fase estacionária. Após este período, a densidade ótica (DO) das culturas foi obtida para calcular a quantidade de células a serem inoculadas no solo previamente autoclavado. De acordo com a DO, alíquotas das culturas foram completadas com água estéril para um volume final de 10 mL, de maneira a obter uma concentração similar de células na solução aquosa para cada linhagem (Tabela 32).

Tabela 32. Valor da densidade ótica usada como base para o cálculo do volume de cultura adicionado nas amostras de solo autoclavado.

Linhagem	DO	Volume de cultura (mL)	Volume de água (mL)
PE-2	32,75	2,7	7,3
RN1016	27,45	3,2	6,8
CEN.PK	19,45	4,5	5,5
DO: densidade ótica (média de cinco réplicas biológicas).			

As soluções aquosas das linhagens de levedura foram inoculadas diretamente no solo e homogeneizadas. Para cada linhagem foram utilizadas cinco réplicas biológicas. As garrafas foram então transferidas para uma casa de vegetação e mantidas no local durante todo o período do experimento.

Quantificação da viabilidade celular

Para contagem da quantidade de células, uma pequena amostra de solo de cada ensaio (entre 1,5 a 3 g) foi coletada em um tubo plástico estéril de 15 mL. Para cada grama de solo coletado foi adicionado 1 mL de água estéril para solubilização do material. A partir do solo diluído em água, foram feitas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-3}. Cem µL de cada diluição foram plaqueados em meio de cultivo sólido YPD e as culturas foram mantidas na estufa a 30°C por 48 horas ou até o aparecimento de colônias.

A viabilidade das leveduras foi acompanhada ao longo de 77 dias. Durante este período, sete coletas foram realizadas, compreendendo 7, 14, 21, 35, 49, 63 e 77 dias após o inóculo (DAI).

4.1.3. Resultados e Discussão;

O número de células de leveduras viáveis foi decrescendo gradativamente ao longo do tempo para as três linhagens. Entretanto, foi possível observar uma maior redução da contagem de células viáveis para as linhagens RN1016 e CEN.PK. Após 49 dias de cultivo das leveduras no solo, as comunidades de ambas as linhagens haviam reduzido para apenas 0,1% do total identificado previamente 7 DAI. A população de PE-2, no entanto, havia reduzido para para 13% da sua população original no mesmo período.

Na Figura 57 é possível observar que a taxa de morte celular para as linhagens CEN.PK e RN1016 ocorreu de forma mais acentuada.

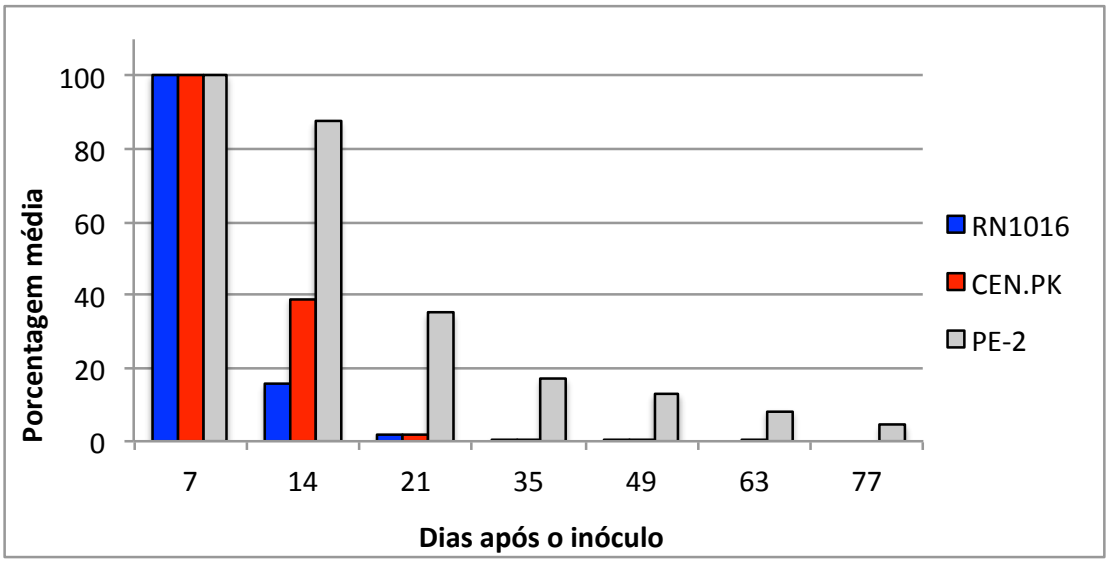

Figura 57. Porcentagem de células viáveis de levedura no solo. O tempo "7 DAI" foi utilizado como referência (100%) para acompanhar a taxa de viabilidade celular das linhagens no solo ao longo de 77 dias.

Após 63 dias a partir do inóculo não foram identificadas células viáveis de RN1016. Já para a linhagem CEN.PK, não foram observadas colônias em nenhuma diluição após 77 dias. Por outro lado, após este período foram identificadas em média 247 colônias de PE-2 na diluição 10^{-1}. O número de colônias isoladas ao longo do experimento para as três linhagens é mostrado na Tabela 33. A Figura 58 mostra a título de ilustração as colônias presentes no solo para cada linhagem ao longo do experimento.

Tabela 33. Número médio de colônias de leveduras no solo ao longo do tempo.

	Dias após o inóculo						
Linhagem	**7**	**14**	**21**	**35**	**49**	**63**	**77**
RN1016	3035 (80)	478 (4)	64 (44)	21 (11)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
CEN.PK	3450 (879)	1348 (184)	67 (6)	22 (7)	2 (2)	1 (1)	0 (0)
PE-2	5326 (509)	4660 (41)	1862 (62)	917 (55)	694 (125)	447 (62)	247 (60)
O desvio padrão das cinco réplicas biológicas é apresentado entre parênteses.							

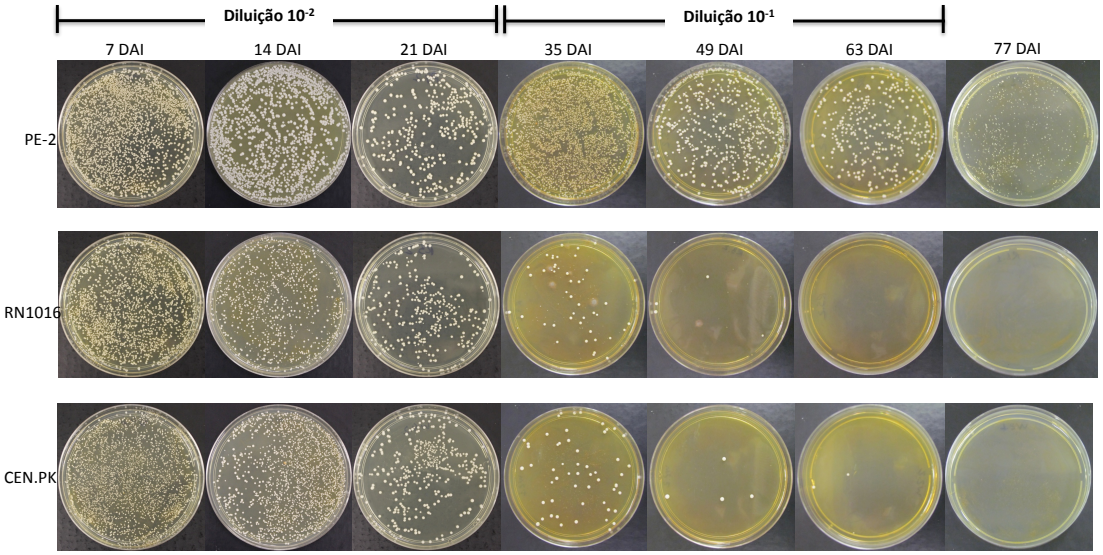

Figura 58. Colônias oriundas do plaqueamento de solução de solo nos diferentes tempos de coleta. A barras superiores indicam a diluição plaqueada. A ausência de barra indica aplicação de amostra sem diluição. Observa-se decaimento de viabilidade acelerado para as linhagens RN1016 e CEN.PK em relação à Linhagem comercial Pedra-2.

A partir desses valores foi possível observar que logo após 7 DAI das leveduras a população das linhagens CEN.PK e RN1016 apresentava-se com uma contagem significativamente inferior a de PE-2 (Tabela 33). Para facilitar a visualização desses dados, uma representação gráfica é apresentada na Figura 59.

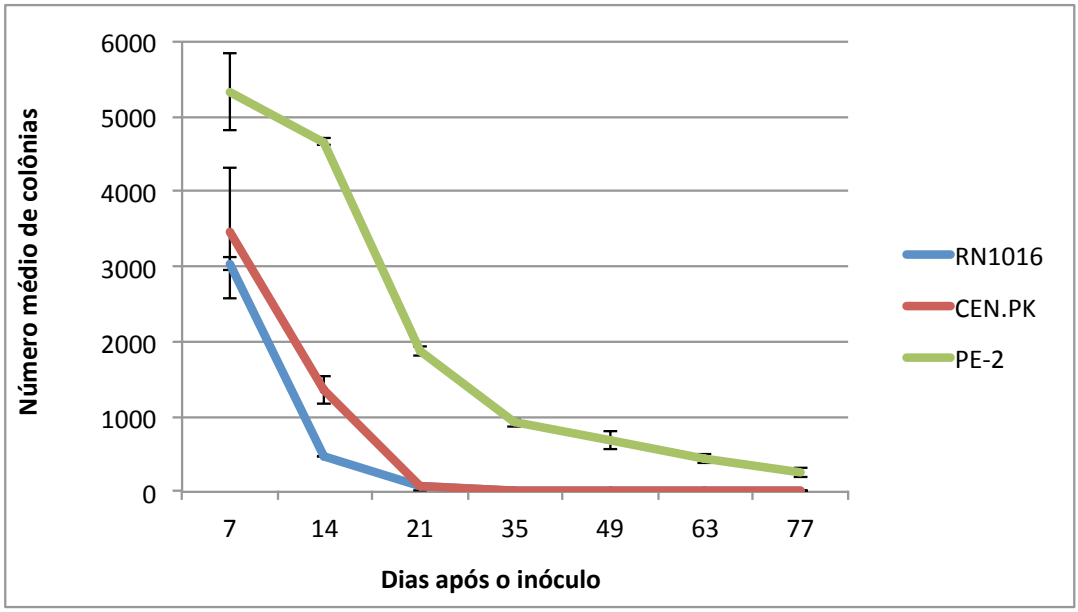

Figura 59. Representação gráfica do número médio de células de levedura viáveis no solo ao longo do tempo. As barras de erro são derivadas de cinco réplicas biológicas.

O maior tempo de viabilidade no solo observado para PE-2 pode estar relacionado a dois principais fatores: maior robustez da linhagem, e a capacidade desta de esporular (Argueso *et al*., 2009). Esses fatores são fundamentais para conferir tolerância a dessecação e, portanto, contribuíram para uma superior viabilidade de PE-2 no solo ao longo do experimento em comparação com as linhagens CEN.PK e RN1016.

4.1.4. Conclusão;

Após 77 dias de ensaio, apenas a cultura da linhagem comercial Pedra-2 permaneceu viável no solo. A partir dos dados apresentados, conclui-se que a linhagem PE-2 possui uma maior taxa de viabilidade no solo, e que as linhagens CEN.PK e RN1016 possuem um perfil semelhante, conforme esperado. Portanto, tanto a linhagem geneticamente modificada (RN1016) quanto sua parental (CEN.PK) não possuem tolerância a dessecação e não apresentam sobrevivência e dispersão no solo.

4.2. Sobrevivência e dispersão da Levedura RN1016 na água e no solo em diferentes condições de temperatura e competição com flora nativa;

A Linhagem RN1016 de *Saccharomyces cerevisiae* foi desenvolvida para a produção de etanol celulósico, a partir da introdução do gene *XylA* e aumento da expressão de relacionados ao metabolismo de açúcares C5 (xilose), presentes em abundância em materiais lignocelulósicos. Conforme discutido e observado nos resultados desse Relatório de Biossegurança, o gene introduzido, bem como os genes que tiveram expressão aumentada, não tem qualquer atividade que indique um comportamento diferente dessa Linhagem de levedura no solo e na água em comparação às demais leveduras do ambiente.

Para avaliar o comportamento da levedura RN1016 no solo e na água, em diferentes condições estabeleceu-se um experimento de sobrevivência ao longo do tempo. No presente experimento optou-se por avaliar a sobrevivência e comportamento das Leveduras na água e solo em duas diferentes condições de temperatura (8 e 25°C), simulando condições ambientais distintas. Testou-se também o comportamento da linhagem em estudo frente a populações de microrganismos nativos das amostras, buscando observar uma possível vantagem dessa linhagem em relação a outros microrganismos nativos.

Para isso, amostras de solo e água foram coletadas em fontes naturais, e parte destas amostras foram esterilizadas antes do experimento e parte foi utilizada sem esterilização. Este experimento foi conduzido pela Empresa DSM N.V. in Heerlen (Delft - Holanda).

<u>Objetivo</u>

Determinar a capacidade de sobrevivência da Linhagem RN1016 em comparação à linhagem selvagem BIE-104 (derivada da Linhagem CEN.PK) em amostras estéreis e não-estéreis de água e solo a 8°C e 25°C.

4.2.1. Material e Métodos;

Coleta de amostras ambientais

Água: Amostras de água foram coletadas diretamente no canal "Delfste Vliet" em Delft (Holanda). Metade do volume de água foi efetivamente esterilizado por 20 minutos a 121°C (autoclave). A outra metade foi estocada a 4°C para ser utilizada no mesmo dia.

Solo: Amostras de solo foram coletadas em Delft, próximo a "Het Haantje" na Empresa DSM. Metade do solo foi efetivamente esterilizado 3 vezes por 20 minutos a 121°C (tripla autoclavagem). A outra metade permaneceu sem esterilização.

Microrganismos utilizados

-*Saccharomyces cerevisiae* BIE104 – Selvagem (WT);

-*Saccharomyces cerevisiae* RN1016 (Linhagem testada).

Tabela experimental de tratamentos

Tabela 34: Planejamento experimental.

Água estéril 8°C WT	**Água estéril 8°C OGM**	**Água não estéril 8°C WT**	**Água não estéril 8°C OGM**	**Solo estéril 8°C WT**	**Solo estéril 8°C OGM**	**Solo não estéril 8°C WT**	**Solo não estéril 8°C OGM**
Água estéril 25°C WT	**Água estéril 25°C OGM**	**Água não estéril 25°C WT**	**Água não estéril 25°C OGM**	**Solo estéril 25°C WT**	**Solo estéril 25°C OGM**	**Solo não estéril 25°C WT**	**Solo não estéril 25°C OGM**

Inóculo das amostras

-Culturas permanentes das leveduras foram descongeladas e incubadas a 25°C;

-A contagem aproximada foi realizada em microscópio e as amostras foram diluídas ~10^8 células/mL;

-As inoculações foram realizadas separadamente para cada uma das linhagens, em experimentos separados, desta forma podendo-se comparar individualmente a sobrevivência de ambas em amostras equivalentes (sub-

amostras da mesma coleta). Os resultados foram colocados em um mesmo gráfico para permitir melhor visualização;

- As amostras ambientais (água e solo; estéril e não estéril) foram inoculadas com aproximadamente $2.5x10^5$ UFC por mL de água ou por grama de solo. As amostras foram estocadas a 8°C e 25°C, simulando condições ambientais distintas.

Análises microbiológicas

Todas as amostras foram cultivadas em meio Ágar + Extrato de Malte (MEA) suplementado com penicilina e estreptomicina. As placas foram incubadas a 25°C por aproximadamente 5 dias antes da contagem e determinação de UFCs/mL e UFC/g, conforme a matriz do teste (Solo/Água).

A microbiota nativa presente nas amostras não-estéreis foi determinada em meio Ágar Padrão de Contagem (PCA), incubado a 30°C por 3 dias. Após período de incubação, as amostras foram diluídas em solução salina (0,89% NaCl) e plaqueadas. O número de células viáveis foi contado e determinado a quantidade de UFCs/mL e UFCs/g, conforme a matriz do teste (Solo/Água).

Tempos de coleta

Todas as amostras do experimento foram coletadas nos tempos indicados na Tabela 35.

Tabela 35. Tempos de coleta.

T=	Tempo de coleta
t=0	Após inóculo
t=1	3 dias
t=2	1 semana
t=3	2 semanas
t=4	4 semanas

4.2.2. Resultados;

Os gráficos apresentados nas Figuras 60 a 67 representam as curvas de crescimento em escala logarítmica da levedura RN1016 e da linhagem selvagem nas amostras de água e solo, estéreis e não-estéreis. As curvas em escala logarítmica que representam a população nativa de

microrganismos também são apresentadas em comparação aos tratamentos para as amostras de solo e água não estéreis.

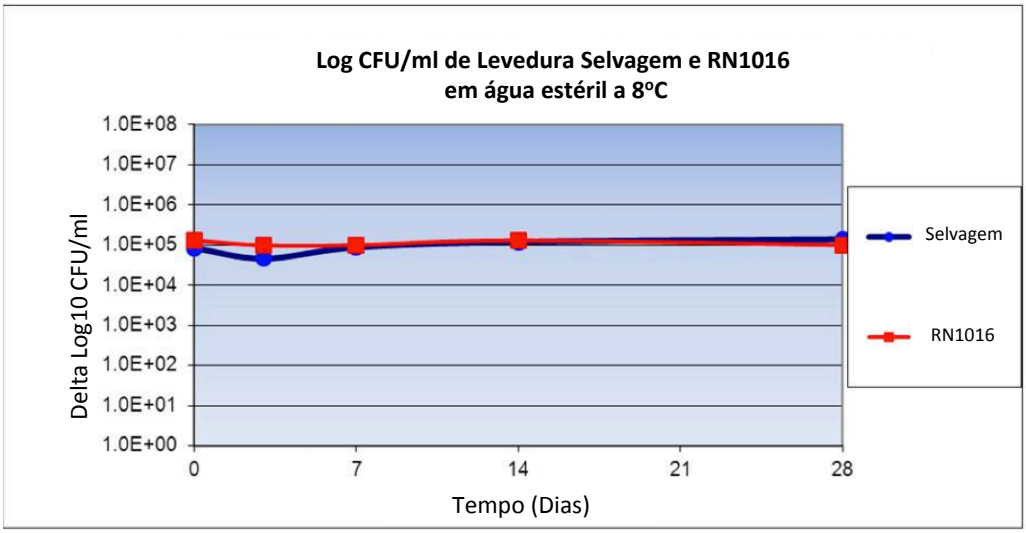

Figura 60. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água esterilizada mantida a 8°C.

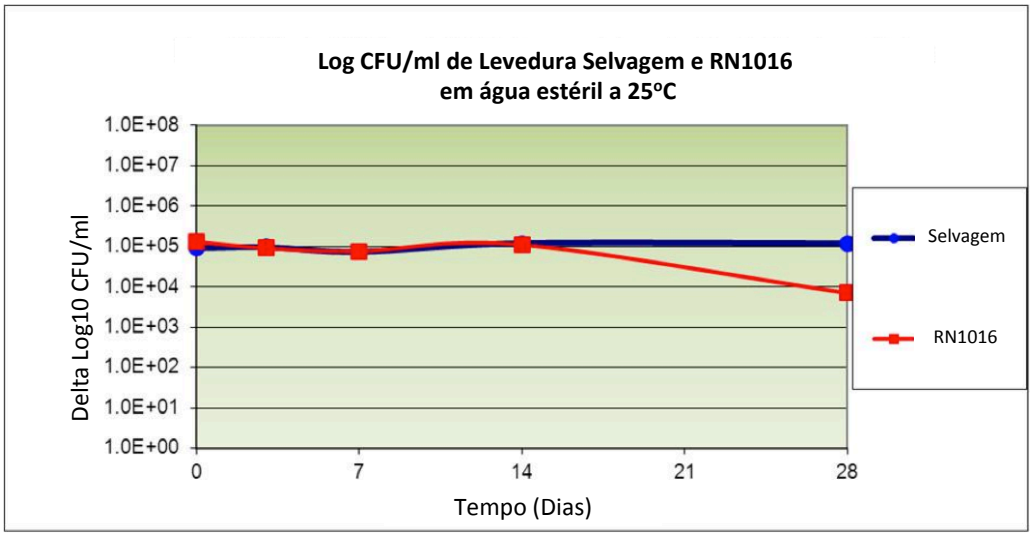

Figura 61. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água esterilizada mantida a 25°C.

Os gráficos apresentados nas Figuras 60 e 61 mostram comportamento semelhante das leveduras RN1016 e selvagem quando cultivadas em amostra de água natural estéril, mantidas a 8 e 25°C, respectivamente. No tratamento que utilizou 25°C percebe-se um leve decréscimo no crescimento da levedura RN1016 quando comparada à selvagem. Não observou-se comportamento que indique qualquer vantagem adaptativa da levedura RN1016 em relação à selvagem nas condições avaliadas.

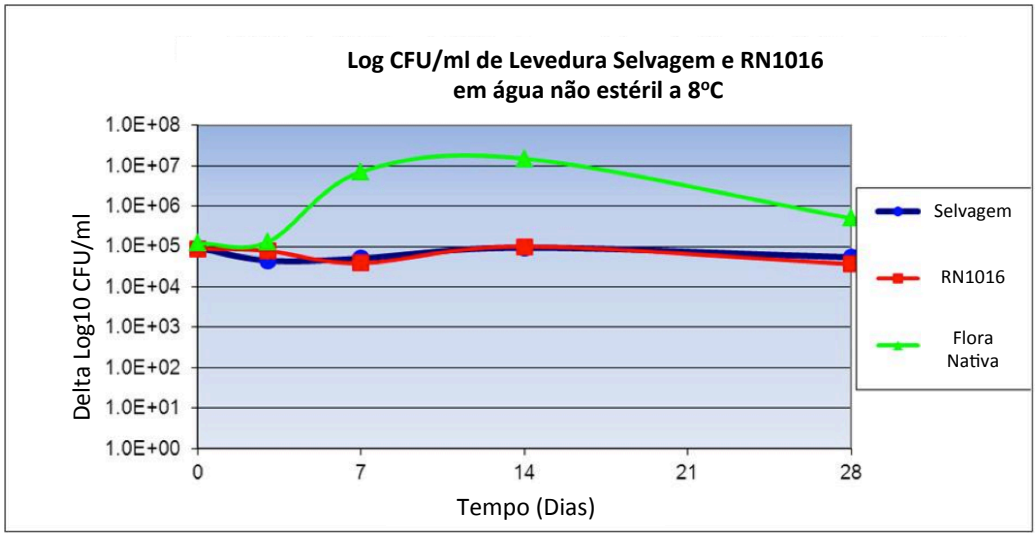

Figura 62. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água não esterilizada mantida a 8°C.

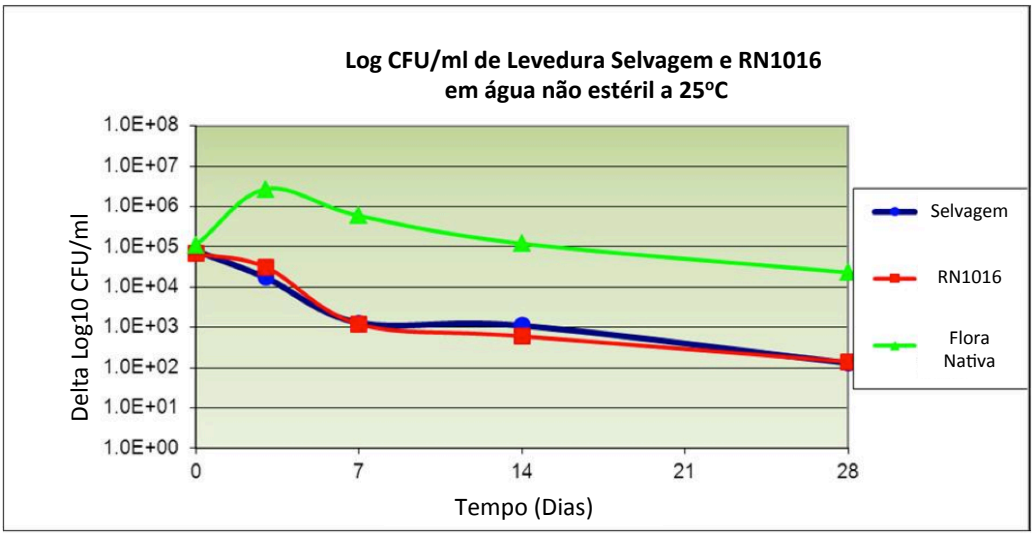

Figura 63. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de água não esterilizada mantida a 25°C.

Nas Figuras 62 e 63 observamos comportamento bastante semelhante das leveduras RN1016 e selvagem quando cultivadas em amostra de água natural não esterilizada, mantidas a 8 e 25°C, respectivamente. Em ambos os casos percebe-se um desenvolvimento mais acentuado da microbiota nativa, que demonstra nítida vantagem sob as leveduras avaliadas. Não observou-se comportamento que indique qualquer vantagem adaptativa da levedura RN1016 em relação à selvagem nas condições avaliadas.

Estes experimentos demonstram que a levedura RN1016 não difere da levedura selvagem quando inoculada em uma fonte de água natural e, mais

ainda, não causa impacto sobre a microbiota nativa de amostra ambiental de água.

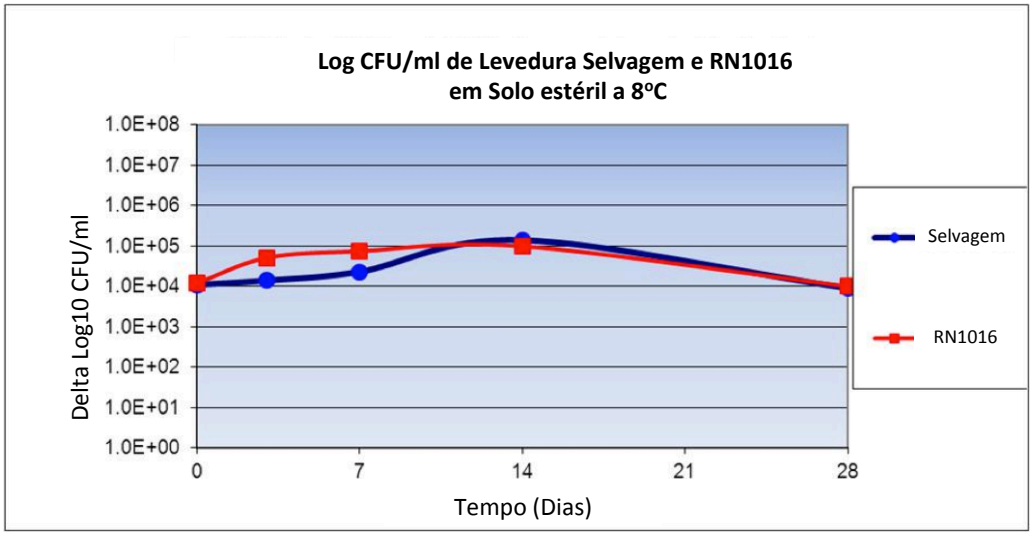

Figura 64. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo esterilizado mantido a 8°C.

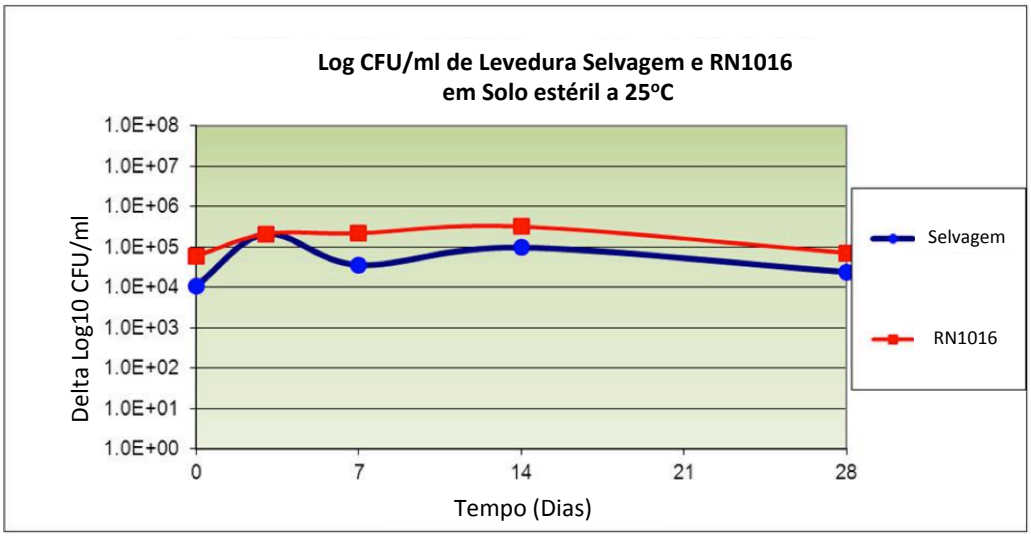

Figura 65. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo esterilizado mantido a 25°C.

Observa-se nos gráficos apresentados nas Figuras 64 e 65 o comportamento equivalente das leveduras RN1016 e selvagem quando cultivadas em amostras de solo natural estéril, mantidas a 8 e 25°C, respectivamente. Não observou-se comportamento que indique qualquer vantagem adaptativa da levedura RN1016 em relação à selvagem nas condições avaliadas.

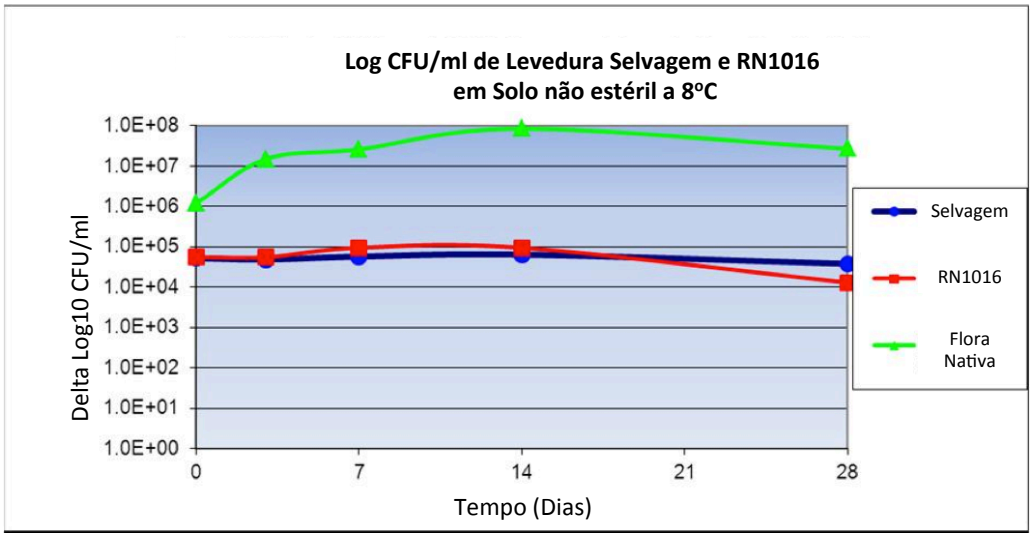

Figura 66. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo não esterilizado mantido a 8°C.

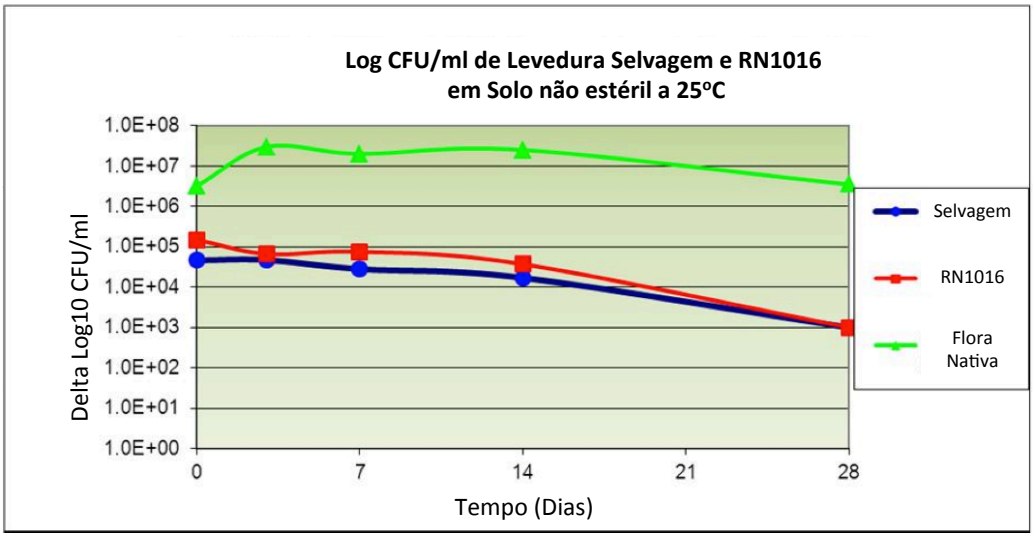

Figura 67. Sobrevivência das leveduras RN1016 e Selvagem em amostra de solo não esterilizado mantido a 25°C.

Nas Figuras 66 e 67 pode-se obsevar comportamento equivalente das leveduras RN1016 e selvagem quando cultivadas em amostra de solo natural não esterilizada, mantidas a 8 e 25°C, respectivamente. A curva referente ao desenvolvimento da microbiota nativa mostra nítida vantagem destes organismos de ocorrência natural em às leveduras avaliadas. A diferença populacional inicial e final das duas linhagens mostra queda contínua de viabilidade. Por outro lado, quando comparadas as diferenças populacionais iniciais e finais das leveduras com a microbiota nativa percebe-se uma diferença crescente no decorrer do experimento, e acumulada ao final. O

número de UFCs da microbiota nativa se torna significativamente superior ao final do experimento.

Estes experimentos demonstram que a levedura RN1016 não difere da levedura selvagem quando inoculada em uma amostra de solo natural e, mais ainda, não causa impacto sobre a microbiota nativa da amostra ambiental de solo, que tem desenvolvimento mais acentuado na presença da levedura RN1016.

De acordo com os resultados, todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas apresentaram capacidade de sobrevivência semelhantes. Adicionalmente, nenhuma das linhagens testadas foi capaz de superar ou impactar de forma negativa o crescimento da microbiota nativa presente nas amostras. As modificações genéticas incluídas na levedura RN1016 não interferem positiva ou negativamente em seu crescimento e desenvolvimento em solo ou água. O comportamento do crescimento da levedura RN1016 equivale aquele observado com a linhagem selvagem. Por fim, as leveduras utilizadas no experimento (RN1016 e selvagem) são equivalentes em não promover impacto negativo evidente nas populações de microrganismos de água e solo, em condições distintas de temperatura.

5. Avaliação do Impacto de vinhaça e resíduos celulares de RN1016 na propriedades químicas, físicas e biológicas do solo;

O solo é o principal componente da produção de alimentos e matérias primas diversas, nas quais o homem se apoia para seu desenvolvimento e sobrevivência. A qualidade de um solo é determinada em função de três principais componentes: as propriedades químicas, físicas e biológicas, bem como a interação entre os três. Por este motivo torna-se particularmente importante a avaliação de possíveis impactos de substâncias químicas ou biológicas aplicadas no solo sobre estas propriedades.

A vinhaça é um subproduto gerado pelas usinas de açúcar e álcool. A aplicação de vinhaça no solo é uma prática comum na produção de cana-de-açúcar do País. A utilização deste subproduto em áreas agrícolas representa a reaplicação no solo de diversos nutrientes retirados com a colheita da cana, com destaque para potássio e fósforo.

A produção de etanol de segunda geração (2G), que utiliza biomassa como matéria prima, também irá produzir vinhaça ao final do processo. Uma vez que este processo utiliza palha, bagaço e outras fontes de biomassa, ao invés do caldo da cana, observa-se que esta vinhaça é mais rica em nutrientes do que a vinhaça de primeira geração (1G).

5.1. Material e Métodos;

O presente experimento foi conduzido em casa de vegetação no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB-UNICAMP, CQB 069/98). Os serviços de análise química e física das amostras de solo foram contratados com o Laboratório Athenas Agrícola – Jaboticabal, e a análise da diversidade microbiana do solo foi conduzida pela *Facility* de sequenciamento de DNA da Universidade da Carolina do Norte - EUA (*Department of Genetics, School of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America*). Para garantir a melhor avaliação do efeito das substâncias teste na matriz, aproximando-se ao máximo das condições reais, utilizou-se solo de canavial coletado diretamente em área dedicada. O solo foi gentilmente cedido pela

Usina Costa Pinto (Piracicaba), onde coletou-se 15 vasos de 30 litros cada, correspondendo a 3 repetições de cada um dos 5 tratamentos utilizados.

Uma vez que a vinhaça é tradicionalmente aplicada em condições de pré ou pós-plantio e em estágios iniciais de desenvolvimento da cana, aplicou-se a vinhaça teste 7 dias após o plantio dos toletes nos vasos. Neste momento já era possível observar a emergência das primeiras folhas.

O experimento teve o objetivo de promover uma ampla avaliação comparativa do potencial impacto dos diferentes tratamentos para os atributos químicos, físicos e biológicos do solo. Para tanto produziu-se em Laboratório a vinhaça de xarope de cana-de-açúcar (1G) simulando a substância atualmente produzida pelas Usinas; e as vinhaças de hidrolisado lignocelulósico (2G) produzido pela planta piloto da empresa Chemtex (Itália) e fermentado pela levedura avaliada (RN1016), bem como pelos respectivos controles parental e comercial não-GMs.

Assim pôde-se observar possíveis diferenças promovidas entre os produtos da fermentação das leveduras GM e convencionais de um mesmo substrato (2G), bem como compará-las com o efeito da vinhaça amplamente produzida e aplicada no solo pelas Usinas de Açúcar e Álcool (1G).

Tratamentos:

1- **1G Pedra 2** - Vinhaça não filtrada produzida pela fermentação de **xarope 1G** pela levedura Pedra 2 (comercial);
2- **2G Pedra 2** - Vinhaça não filtrada produzida pela fermentação de **hidrolisado 2G** pela levedura Pedra 2 (comercial);
3- **2G RN1016** - Vinhaça não filtrada produzida pela fermentação de **hidrolisado 2G** pela levedura RN1016 (avaliada);
4- **2G CEN.PK** - Vinhaça não filtrada produzida pela fermentação de **hidrolisado 2G** pela levedura CEN.PK (parental não GM);
5- **CTL(-)** - Controle sem aplicação de vinhaça.

As vinhaças foram produzidas no Laboratório de Genômica e Expressão (IB-UNICAMP) em escala de bancada, com volume total inferior a 5 litros (reação). A quantidade aplicada de vinhaça em solos de canaviais é determinada em função da concentração de potássio. A composição das

vinhaças obtidas foram determinadas pelo Laboratório TASQA (Paulínia – SP, após esterilização das amostras). As quantidades de vinhaça aplicadas variaram em função das concentrações de K, obtendo-se o equivalente a 100 Kg de K_2O por hectare. Utilizou-se água destilada para completar o volume obtendo-se 400 mL de solução de aplicação por vaso.

Antes da aplicação dos tratamentos os vasos foram numerados de 1 a 15, e a definição de qual vaso receberia cada tratamento foi feita através de sorteio, gerando a seguinte distribuição:

Vaso	Tratamento
Vaso 1	1G Pedra 2
Vaso 2	CTL (-)
Vaso 3	CTL (-)
Vaso 4	2G CENPK
Vaso 5	1G Pedra 2
Vaso 6	2G RN1016
Vaso 7	CTL (-)
Vaso 8	2G RN1016
Vaso 9	2G Pedra 2
Vaso 10	2G CENPK
Vaso 11	2G Pedra 2
Vaso 12	2G CENPK
Vaso 13	1G Pedra 2
Vaso 14	2G RN1016
Vaso 15	2G Pedra 2

Solo e Planta:

Coletou-se solo de área de canavial, gentilmente cedido pela Usina Costa Pinto (Piracicaba). Foram coletados aproximadamente 450 kg de solo, suficiente para preencher os 15 vasos do ensaio. Utilizou-se apenas a porção superficial de aproximadamente 25 cm de profundidade. O Solo foi homogeneizado antes de ser introduzido em cada vaso.

Toletes de cana-de-açúcar de uma variedade comercial de amplo uso, foram dispostos nos vasos em uma profundidade de 10 a 15 cm de profundidade com as gemas voltadas para a superfície. Os vasos foram regados com 500 mL de água a cada 2 dias.

Coletas de amostras:

As amostras de solo dos vasos foram coletadas em três momentos distintos: 1, 15 e 30 dias após a aplicação da vinhaça, obedecendo instruções de amostragem de solo em área agrícola, adaptando-se ao estudo em questão (http://www.cnps.embrapa.br/servicos/metodo_coleta.html). Com auxílio de um tubo de PVC de 2,5 cm de diâmetro procedeu-se a coleta de 3 sub-amostras por vaso por tempo de coleta. As três sub-amostras de cada coleta foram colocadas em recipiente plástico e homogeneizadas, constituindo uma amostra composta. As amostras foram coletadas dos 20 cm superficiais do solo (Figura 68). De cada amostra composta separou-se 5 mL de solo que foi utilizado para extração de DNA total para avaliação de diversidade microbiana. O restante do solo foi esterilizado e enviado ao Laboratório Athenas Agrícola (Jaboticabal) para as análises química e física.

Figura 68. Coleta de amostras de solo. Nas fotos observa-se os 3 pontos de coleta das sub-amostras por vaso. As sub-amostras são misturadas e homogeneizadas formando uma amostra composta representativa por vaso e por coleta.

Coletas de amostras:

As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do software StatPlus (AnalystSoft Inc.). Os dados do presente experimento foram

analisados através de Análise de Variância (ANOVA) de fator simples. Os quadros representativos das análises são fornecidos nos respectivos itens.

5.2 Resultados e conclusão;

5.2.1 Avaliação do impacto da vinhaça e resíduos celulares da Levedura RN1016 nas propriedades químicas do solo;

A vinhaça tem um importante papel na reposição de nutrientes retirados do solo com a colheita da cana. A vinhaça produzida pela indústria de etanol celulósico (2G), por utilizar biomassa como fonte de açúcares, é mais rica em nutrientes do que a vinhaça comum (1G) que utiliza o caldo da cana. Por este motivo, a vinhaça 2G apresenta grande potencial de ser utilizada como fertilizante em solos agrícolas de canaviais.

Tendo em vista a aplicação deste subproduto, o objetivo da análise química do solo que recebeu vinhaças produzidas pela Linhagem RN1016 e respectivos controles, é de observar possíveis diferenças em atributos químicos do solo que podem estar relacionados com o emprego da linhagem geneticamente modificada de *S. cerevisiae*, linhagem RN1016, em comparação com o emprego de linhagens convencionais.

As amostras de solo foram submetidas à análises químicas completas, com a determinação da concentração de macro e micronutrientes minerais, capacidade de troca catiônica (CTC), matéria orgânica e pH. As Tabelas 36 e 37 agrupam todas as avaliações dos diferentes tratamentos nos tempos de coleta.

Tabela 36. Resultados da análise química (Macronutrientes) para os diferentes tratamentos e repetições. As cores agrupam as repetições e separam os tratamentos nos 3 tempos de coleta.

AMOSTRA		ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO										
Coleta / Repetição	Tratamento	pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	K	Al	H+Al	Soma Bases	CTC
				Resina						SMP	S.B.	
		$CaCl_2$	g dm^{-3}	---------mg dm^{-3}---------		----------$mmol_c$ dm^{-3}----------						
1a / 1	1G Pedra 2	5,8	19	51	163	57	20	2,0	1	26	79,0	105,0
1a / 5	1G Pedra 2	5,8	19	34	132	46	18	1,8	2	28	65,8	93,8
1a / 13	1G Pedra 2	5,9	19	44	50	48	19	2,0	1	22	69,0	91,0
1a / 6	2G RN1016	5,6	18	48	107	49	17	1,7	1	26	67,7	93,7
1a / 8	2G RN1016	5,5	22	60	136	44	16	1,3	1	28	61,3	89,3
1a / 14	2G RN1016	5,7	18	52	83	40	17	1,3	1	25	58,3	83,3
1a / 4	2G CENPK	5,7	20	69	128	49	16	0,7	0	25	65,7	90,7
1a / 10	2G CENPK	5,9	20	49	133	38	16	0,8	1	26	54,8	80,8
1a / 12	2G CENPK	5,8	20	55	118	56	21	1,8	5	26	78,8	104,8
1a / 2	CTL (-)	5,7	21	60	109	48	19	1,0	1	28	68,0	96,0
1a / 3	CTL (-)	5,8	24	72	57	43	18	1,2	1	27	62,2	89,2
1a / 7	CTL (-)	5,6	24	51	89	43	17	0,6	1	26	60,6	86,6
1a / 9	2G Pedra 2	5,8	21	48	114	42	17	1,5	1	26	60,5	86,5
1a / 11	2G Pedra 2	5,8	21	49	96	61	21	2,5	0	28	84,5	112,5
1a / 15	2G Pedra 2	5,6	21	50	165	53	20	2,1	1	25	75,1	100,1
2a / 1	1G Pedra 2	5,7	18	43	127	58	22	5,3	1	22	85,3	107,3
2a / 5	1G Pedra 2	5,7	19	40	130	49	21	5,3	1	22	75,3	97,3
2a / 13	1G Pedra 2	6,0	17	33	134	49	21	6,7	1	19	76,7	95,7
2a / 6	2G RN1016	5,6	18	38	96	48	19	5,0	1	23	72,0	95,0
2a / 8	2G RN1016	5,8	19	51	113	56	21	4,4	1	22	81,4	103,4
2a / 14	2G RN1016	5,8	16	42	102	56	20	4,1	1	22	80,1	102,1
2a / 4	2G CENPK	5,8	18	48	98	56	21	5,0	0	20	82,0	102,0
2a / 10	2G CENPK	5,8	19	46	100	65	23	5,9	0	21	93,9	114,9
2a / 12	2G CENPK	5,6	20	49	107	58	22	3,0	0	24	83,0	107,0
2a / 2	CTL (-)	5,8	16	63	112	55	21	5,5	0	22	81,5	103,5
2a / 3	CTL (-)	6,0	20	54	95	54	20	4,5	0	24	78,5	102,5
2a / 7	CTL (-)	5,7	18	55	95	53	19	4,6	0	24	76,6	100,6
2a / 9	2G Pedra 2	5,9	17	45	105	51	20	4,7	0	21	75,7	96,7
2a / 11	2G Pedra 2	5,7	18	56	90	50	21	5,5	1	21	76,5	97,5
2a / 15	2G Pedra 2	5,9	18	61	135	49	23	3,2	0	21	75,2	96,2
3a / 1	1G Pedra 2	5,6	18	52	131	64	21	4,1	1	21	89,1	110,1
3a / 5	1G Pedra 2	5,7	18	42	117	51	21	4,1	0	24	76,1	100,1
3a / 13	1G Pedra 2	5,6	14	38	86	44	19	4,4	1	26	67,4	93,4
3a / 6	2G RN1016	5,8	18	39	92	52	22	4,9	1	22	78,9	100,9
3a / 8	2G RN1016	5,7	17	53	108	53	21	4,1	1	24	78,1	102,1
3a / 14	2G RN1016	5,9	16	35	78	56	21	4,6	1	21	81,6	102,6
3a / 4	2G CENPK	5,9	18	47	111	64	22	5,9	1	19	91,9	110,9
3a / 10	2G CENPK	5,9	18	56	97	63	22	5,0	0	22	90,0	112,0
3a / 12	2G CENPK	5,7	20	60	81	63	22	3,7	0	21	88,7	109,7
3a / 2	CTL (-)	5,9	17	60	126	53	20	6,0	0	23	79,0	102,0
3a / 3	CTL (-)	5,9	17	56	114	58	20	5,3	0	22	83,3	105,3
3a / 7	CTL (-)	5,9	17	61	100	58	19	5,0	0	21	82,0	103,0
3a / 9	2G Pedra 2	5,8	18	51	111	69	21	5,3	1	21	95,3	116,3
3a / 11	2G Pedra 2	5,8	18	59	110	63	22	5,3	0	22	90,3	112,3
3a / 15	2G Pedra 2	5,9	16	68	120	51	22	6,3	0	21	79,3	100,3

Tabela 37. Resultados da análise química (Micronutrientes) para os diferentes tratamentos e repetições. As cores agrupam as repetições e separam os tratamentos nos 3 tempos de coleta.

AMOSTRA		MICRONUTRIENTES				
Coleta / Vaso	Tratamento	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
		----------mg dm^{-3}----------				
1a / 1	1G Pedra 2	0,18	0,6	34	9,1	0,8
1a / 5	1G Pedra 2	0,18	1,4	35	13,3	0,8
1a / 13	1G Pedra 2	0,19	0,6	33	8,0	0,7
1a / 6	2G RN1016	0,19	0,4	36	9,3	0,7
1a / 8	2G RN1016	0,18	0,6	34	10,4	0,7
1a / 14	2G RN1016	0,19	0,4	33	10,2	0,7
1a / 4	2G CENPK	0,19	0,6	37	9,5	0,9
1a / 10	2G CENPK	0,19	0,8	39	11,5	0,8
1a / 12	2G CENPK	0,22	0,5	38	9,8	0,8
1a / 2	CTL (-)	0,25	0,1	26	3,5	0,7
1a / 3	CTL (-)	0,22	0,3	33	5,0	0,9
1a / 7	CTL (-)	0,22	0,2	26	4,4	0,5
1a / 9	2G Pedra 2	0,23	0,3	31	7,8	1,1
1a / 11	2G Pedra 2	0,30	0,3	28	6,9	0,7
1a / 15	2G Pedra 2	0,41	0,3	29	7,1	1,1
2a / 1	1G Pedra 2	0,15	1,2	30	7,8	0,7
2a / 5	1G Pedra 2	0,14	1,2	26	6,7	0,7
2a / 13	1G Pedra 2	0,12	1,2	29	7,3	0,6
2a / 6	2G RN1016	0,14	1,2	30	5,1	0,7
2a / 8	2G RN1016	0,16	1,3	33	4,5	0,7
2a / 14	2G RN1016	0,15	1,1	26	4,0	0,6
2a / 4	2G CENPK	0,15	2,0	30	5,2	0,7
2a / 10	2G CENPK	0,15	1,1	28	4,8	0,6
2a / 12	2G CENPK	0,16	1,3	32	4,7	0,8
2a / 2	CTL (-)	0,14	1,1	28	2,9	0,6
2a / 3	CTL (-)	0,14	0,9	23	2,0	0,6
2a / 7	CTL (-)	0,15	1,1	28	2,9	0,6
2a / 9	2G Pedra 2	0,15	1,1	25	5,3	0,8
2a / 11	2G Pedra 2	0,14	1,0	23	3,3	0,6
2a / 15	2G Pedra 2	0,10	1,1	28	5,0	0,7
3a / 1	1G Pedra 2	0,14	1,2	27	4,7	0,9
3a / 5	1G Pedra 2	0,15	1,2	31	4,5	0,8
3a / 13	1G Pedra 2	0,14	1,2	32	5,6	0,9
3a / 6	2G RN1016	0,14	1,2	29	4,2	0,8
3a / 8	2G RN1016	0,14	1,2	31	3,6	0,9
3a / 14	2G RN1016	0,14	1,1	31	3,7	0,9
3a / 4	2G CENPK	0,15	1,1	32	5,8	0,9
3a / 10	2G CENPK	0,12	1,2	30	4,0	1,0
3a / 12	2G CENPK	0,14	1,1	28	4,0	0,8
3a / 2	CTL (-)	0,15	1,1	28	2,7	1,0
3a / 3	CTL (-)	0,15	1,1	24	2,3	1,4
3a / 7	CTL (-)	0,13	1,0	24	2,4	0,6
3a / 9	2G Pedra 2	0,15	1,1	23	3,7	0,9
3a / 11	2G Pedra 2	0,14	1,0	23	4,5	0,5
3a / 15	2G Pedra 2	0,14	1,1	26	3,9	1,1

Análises estatísticas foram conduzidas individualmente para todos os analitos avaliados. Através da Análise de Variância (ANOVA) dos dados conjuntos de todas as coletas por analito, bem como individuais por coleta, observou-se que não existe diferença significativa entre os 5 tratamentos avaliados para o conteúdo de matéria orgânica, pH e os macronutrientes minerais enxofre, cálcio, magnésio e potássio.

Para o macronutriente fósforo observou-se diferença quando comparados os tratamentos que receberam vinhaça 2G e o tratamento controle negativo. No entanto, entre os tratamentos 2G RN1016, 2G CEN.PK e 2G Pedra 2 não se observou diferença. Esse perfil era esperado, uma vez que o nutriente fósforo é abundante na composição da vinhaça. Com estes resultados conclui-se que a utilização da Levedura RN1016 não provocou qualquer efeito quando comparado aos correspondentes não GM e comercial. As Análises de Variância podem ser observadas nas tabelas Tabelas 38 a 57.

Os macronutrientes ocorrem naturalmente em maior quantidade no solo, e por isso a aplicação dos tratamentos (vinhaça) não foi suficiente para alterar significativamente as concentrações, mesmo quando comparados com o controle negativo sem aplicação de vinhaça. O tratamento que representa a utilização da linhagem RN1016 de levedura não promoveu qualquer alteração significativa nas concentrações de macronutrientes minerais quando comparado aos controles parental não GM, comercial e negativo (sem tratamento).

As análises de pH e quantidade de matéria orgânica mostraram equivalência entre todos os tratamentos avaliados ao longo das diferentes coletas (Tabelas 58 a 65). Com este resultado é possível fazer inferências à atividade biológica do solo, uma vez que o pH e o conteúdo de matéria orgânica do solo seriam certamente alterados caso ocorresse alguma alteração significativa na biologia do solo. Os dados de metagenômica do solo apresentados a seguir (item 5.2.3) discutem melhor este tema.

As mesmas análises foram conduzidas para os micronutrientes minerais, onde observou-se resultado semelhante. Os micronutrientes avaliados foram: Boro, Ferro, Cobre, Manganês e Zinco. As análises estatísticas conjuntas de cada um dos analitos Boro, Cobre e Zinco

mostraram que não existem diferenças significativas na concentração destes nutrientes ao longo do experimento para os 5 tratamentos avaliados, incluindo controle negativo. Os analitos Ferro e Manganês não mostraram diferença significativa quando comparados os 4 tratamentos com aplicação de vinhaça. Observou-se diferença apenas quando comparou-se o tratamento referente ao controle negativo (sem aplicação) com os demais tratamentos para estes dois analitos (ferro e manganês). Isso se deve ao fato de que os micronutrientes ocorrem em menor concentração no solo, e a aplicação dos tratamentos foi suficiente para promover uma pequena alteração quando comparado ao controle negativo. Este resultado é esperado, uma vez que a vinhaça tem função fertilizante.

As Análises de Variância (ANOVA) conjunta para cada um destes analitos podem ser observadas nas Tabelas 66 a 70.

Conclui-se que a utilização da Levedura geneticamente modificada RN1016 não provoca alterações nas propriedades químicas do solo quando comparada a utilização de seu correspondente convencional CEN.PK, bem como da Linhagem comercial Pedra 2. Do ponto de vista da nutrição mineral, a utilização de vinhaça produzida pela Levedura RN1016 e resíduos celulares da mesma, é tão segura quanto a utilização do seu equivalente não geneticamente modificado. A equivalência do pH e do conteúdo de matéria orgânica também permitem inferências a respeito da ausência de impacto da levedura RN1016 na biologia do solo, uma vez que estes são indicadores de atividade biológica.

Tabela 38. Análise de Variância conjunta para o analito **Enxofre** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	1.071,06275	119,00697	1.070,24566
2G RN1016	9	914,5941	101,62157	299,39116
2G CENPK	9	972,60072	108,06675	261,7229
CTL (-)	9	896,00699	99,55633	386,98861
2G Pedra 2	9	1.046,99655	116,33295	507,77678

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	2.685,3501	4	671,33752	1,32879	0,27595	3,82829
Dentro de grupos	20.209,0009	40	505,22502			
Total	22.894,351	44				

Tabela 39. Análise de Variância para o analito **Enxofre** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	345,8	115,26667	3.435,05333
2G RN1016	3	325,7	108,56667	698,16333
2G CENPK	3	378,2	126,06667	61,05333
CTL (-)	3	254,8	84,93333	687,70333
2G Pedra 2	3	375,8	125,26667	1.287,22333

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	3.386,81067	4	846,70267	0,68623	0,61762	5,99434
Dentro de grupos	12.338,39333	10	1.233,83933			
Total	15.725,204	14				

Tabela 40. Análise de Variância para o analito **Enxofre** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	390,95826	130,31942	11,87899
2G RN1016	3	310,57358	103,52453	74,69555
2G CENPK	3	305,46029	101,8201	21,93996
CTL (-)	3	301,78921	100,5964	99,19106
2G Pedra 2	3	330,33656	110,11219	522,37903

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	1.822,59018	4	455,64755	3,12051	0,06574	5,99434
Dentro de grupos	1.460,16917	10	146,01692			
Total	3.282,75936	14				

Tabela 41. Análise de Variância para o analito **Enxofre** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	334,30449	111,43483	535,10228
2G RN1016	3	278,32052	92,77351	229,48999
2G CENPK	3	288,94043	96,31348	212,16264
CTL (-)	3	339,41778	113,13926	161,94541
2G Pedra 2	3	340,85999	113,62	32,70079

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	1.217,58331	4	304,39583	1,29928	0,33431	5,99434
Dentro de grupos	2.342,80222	10	234,28022			
Total	3.560,38553	14				

Tanto na análise conjunta, contemplando todos os tempos de coleta, quando nas análises separadas por tempo de coleta, os valores de *F* calculados são inferiores aos valores de *F* Tabelados (*Crit. F*), e o *p-value* é superior ao nível de significância da análise (0,01). Assim, a hipótese inicial (H_0) não é rejeitada, confirmando que não existem diferenças significativas da concentração de **enxofre** entre os tratamentos ao nível de 1% de significância.

Análises de Variância (ANOVA) para o Analito **Cálcio** - Macronutriente

Tabela 42. Análise de Variância conjunta para o analito **Cálcio** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	467,43099	51,93678	43,68162
2G RN1016	9	453,70439	50,4116	32,99233
2G CENPK	9	511,64752	56,84972	79,01225
CTL (-)	9	466,50328	51,8337	34,35547
2G Pedra 2	9	489,96144	54,44016	67,03119

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	234,36375	4	58,59094	1,13958	0,35185	3,82829
Dentro de grupos	2.056,58285	40	51,41457			
Total	2.290,9466	44				

Tabela 43. Análise de Variância para o analito **Cálcio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	151,62509	50,5417	35,90671
2G RN1016	3	132,9722	44,32407	22,64724
2G CENPK	3	142,62295	47,54098	86,85548
CTL (-)	3	134,11262	44,70421	7,68351
2G Pedra 2	3	156,95652	52,31884	88,78406

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	148,89905	4	37,22476	0,7695	0,569	5,99434
Dentro de grupos	483,754	10	48,3754			
Total	632,65305	14				

Tabela 44. Análise de Variância para o analito **Cálcio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	156,13391	52,04464	28,85021
2G RN1016	3	159,52457	53,17486	20,85046
2G CENPK	3	179,30344	59,76781	24,81935
CTL (-)	3	162,07985	54,02662	1,10329
2G Pedra 2	3	150,26167	50,08722	1,37233

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	158,76277	4	39,69069	2,57746	0,10239	5,99434
Dentro de grupos	153,99127	10	15,39913			
Total	312,75404	14				

Tabela 45. Análise de Variância para o analito **Cálcio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	159,67199	53,224	104,54732
2G RN1016	3	161,20762	53,73587	4,85499
2G CENPK	3	189,72113	63,24038	0,36166
CTL (-)	3	170,31081	56,77027	8,6226
2G Pedra 2	3	182,74324	60,91441	79,92236

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	232,69765	4	58,17441	1,46676	0,28326	5,99434
Dentro de grupos	396,61785	10	39,66178			
Total	629,3155	14				

Tanto na análise conjunta, contemplando todos os tempos de coleta, quando nas análises separadas por tempo de coleta, os valores de *F* calculados são inferiores aos valores de *F* Tabelados (*Crit. F*), e o *p-value* é superior ao nível de significância da análise (0,01). Assim, a hipótese inicial (H_0) não é rejeitada, confirmando que não existem diferenças significativas da concentração de **cálcio** entre os tratamentos ao nível de 1% de significância.

Análises de Variância (ANOVA) para o Analito **Magnésio** - Macronutriente

Tabela 46. Análise de Variância conjunta para o analito **Magnésio** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	180,83476	20,09275	1,53476
2G RN1016	9	174,69051	19,41006	4,46927
2G CENPK	9	185,31034	20,59004	7,34982
CTL (-)	9	172,8975	19,21083	1,43164
2G Pedra 2	9	187,31125	20,81236	3,01062

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	17,8632	4	4,4658	1,25471	0,30372	3,82829
Dentro de grupos	142,36885	40	3,55922			
Total	160,23205	44				

Tabela 47. Análise de Variância para o analito **Magnésio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	56,93939	18,9798	1,72939
2G RN1016	3	50,20937	16,73646	0,17391
2G CENPK	3	52,92837	17,64279	9,05266
CTL (-)	3	54,32231	18,10744	0,86923
2G Pedra 2	3	58,2562	19,41873	4,39207

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	13,65531	4	3,41383	1,05253	0,42826	5,99434
Dentro de grupos	32,43453	10	3,24345			
Total	46,08985	14				

Tabela 48. Análise de Variância para o analito **Magnésio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	63,4025	21,13417	0,27468
2G RN1016	3	60,88926	20,29642	0,7499
2G CENPK	3	65,56267	21,85422	0,63446
CTL (-)	3	60,22163	20,07388	1,35668
2G Pedra 2	3	63,82619	21,2754	2,97699

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	6,44847	4	1,61212	1,34507	0,31942	5,99434
Dentro de grupos	11,98541	10	1,19854			
Total	18,43388	14				

Tabela 49. Análise de Variância para o analito **Magnésio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	60,49286	20,16429	0,64248
2G RN1016	3	63,59188	21,19729	0,26128
2G CENPK	3	66,81929	22,2731	0,03647
CTL (-)	3	58,35355	19,45118	0,47051
2G Pedra 2	3	65,22886	21,74295	0,13951

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	15,90919	4	3,9773	12,82802	0,0006	5,99434
Dentro de grupos	3,10048	10	0,31005			
Total	19,00966	14				

Tanto na análise conjunta, contemplando todos os tempos de coleta, quando nas análises separadas por tempo de coleta, os valores de *F* calculados são inferiores aos valores de *F* Tabelados (*Crit. F*), e o *p-value* é superior ao nível de significância da análise (0,01). Assim, a hipótese inicial (H_0) não é rejeitada, confirmando que não existem diferenças significativas da concentração de **magnésio** entre os tratamentos ao nível de 1% de significância.

Análises de Variância (ANOVA) para o Analito **Potássio** - Macronutriente

Tabela 50. Análise de Variância conjunta para o analito **Potássio** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	35,74112	3,97124	2,98213
2G RN1016	9	31,45363	3,49485	2,47612
2G CENPK	9	31,71314	3,52368	4,23592
CTL (-)	9	33,77252	3,7525	4,60916
2G Pedra 2	9	36,43099	4,04789	3,0305

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	2,2832	4	0,5708	0,16465	0,95506	3,82829
Dentro de grupos	138,67064	40	3,46677			
Total	140,95383	44				

Tabela 51. Análise de Variância para o analito **Potássio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	5,7488	1,91627	0,00967
2G RN1016	3	4,31131	1,4371	0,05993
2G CENPK	3	3,29582	1,09861	0,33646
CTL (-)	3	2,8802	0,96007	0,08885
2G Pedra 2	3	6,09989	2,0333	0,27604

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	2,74107	4	0,68527	4,44433	0,0254	5,99434
Dentro de grupos	1,54189	10	0,15419			
Total	4,28296	14				

Tabela 52. Análise de Variância para o analito **Potássio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	17,28366	5,76122	0,64313
2G RN1016	3	13,53366	4,51122	0,17438
2G CENPK	3	13,83366	4,61122	2,1225
CTL (-)	3	14,58366	4,86122	0,29438
2G Pedra 2	3	13,42244	4,47415	1,35821

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	3,42993	4	0,85748	0,93355	0,48283	5,99434
Dentro de grupos	9,18517	10	0,91852			
Total	12,6151	14				

Tabela 53. Análise de Variância para o analito **Potássio** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	12,70866	4,23622	0,03
2G RN1016	3	13,60866	4,53622	0,1425
2G CENPK	3	14,58366	4,86122	1,20563
CTL (-)	3	16,30866	5,43622	0,26063
2G Pedra 2	3	16,90866	5,63622	0,34313

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	4,1865	4	1,04663	2,64049	0,09708	5,99434
Dentro de grupos	3,96375	10	0,39638			
Total	8,15025	14				

Tanto na análise conjunta, contemplando todos os tempos de coleta, quando nas análises separadas por tempo de coleta, os valores de *F* calculados são inferiores aos valores de *F* Tabelados (*Crit. F*), e o *p-value* é superior ao nível de significância da análise (0,01). Assim, a hipótese inicial (H_0) não é rejeitada, confirmando que não existem diferenças significativas da concentração de **potássio** entre os tratamentos ao nível de 1% de significância.

Tabela 54. Análise de Variância conjunta para o analito **Fósforo** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2).

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
2G RN1016	9	417,145	46,34944	69,39263
2G CENPK	9	478,385	53,15389	57,36041
2G Pedra 2	9	487,645	54,18278	55,36871

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	326,16056	2	163,08028	2,68634	0,08855	5,61359
Dentro de grupos	1.456,97397	24	60,70725			
Total	1.783,13453	26				

Tabela 55. Análise de Variância para o analito **Fósforo** compreendendo as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2). Primeiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
2G RN1016	3	127,	42,33333	89,33333
2G CENPK	3	162,99	54,33	42,5277
2G Pedra 2	3	178,06	59,35333	68,81223

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	458,83429	2	229,41714	3,42971	0,10158	10,92477
Dentro de grupos	401,34653	6	66,89109			
Total	860,18082	8				

Tabela 56. Análise de Variância para o analito **Fósforo** compreendendo as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2). Segundo tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
2G RN1016	3	130,83	43,61	45,0853
2G CENPK	3	142,32	47,44	1,3273
2G Pedra 2	3	162,74	54,24667	70,42303

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	174,13829	2	87,06914	2,23568	0,18812	10,92477
Dentro de grupos	233,67127	6	38,94521			
Total	407,80956	8				

Tabela 57. Análise de Variância para o analito **Fósforo** compreendendo as amostras de todos os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Pedra-2). Terceiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
2G RN1016	3	127,	42,33333	89,33333
2G CENPK	3	162,99	54,33	42,5277
2G Pedra 2	3	178,06	59,35333	68,81223

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	458,83429	2	229,41714	3,42971	0,10158	10,92477
Dentro de grupos	401,34653	6	66,89109			
Total	860,18082	8				

Tanto na análise conjunta, contemplando todos os tempos de coleta, quando nas análises separadas por tempo de coleta, os valores de *F* calculados são inferiores aos valores de *F* Tabelados (*Crit. F*), e o *p-value* é superior ao nível de significância da análise (0,01). Assim, a hipótese inicial (H_0) não é rejeitada, confirmando que não existem diferenças significativas da concentração de **fósforo** entre os tratamentos que receberam vinhaça 2G (RN1016, CEN.PK e Comercial Pedra-2) ao nível de 1% de significância.

Análises de Variância (ANOVA) para o Analito **Conteúdo de Matéria Orgânica**

Tabela 58. Análise de Variância conjunta para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	158,94512	17,66057	2,68694
2G RN1016	9	162,07528	18,00836	3,50036
2G CENPK	9	174,087	19,343	1,09363
CTL (-)	9	173,11548	19,23505	8,33719
2G Pedra 2	9	167,99548	18,66616	3,41498

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	19,71697	4	4,92924	1,29491	0,28835	3,82829
Dentro de grupos	152,26486	40	3,80662			
Total	171,98183	44				

Tabela 59. Análise de Variância para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	55,91	18,63667	0,03413
2G RN1016	3	58,16	19,38667	5,38563
2G CENPK	3	60,71	20,23667	0,13653
CTL (-)	3	68,1	22,7	2,7648
2G Pedra 2	3	62,98	20,99333	0,03413

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	29,41343	4	7,35336	4,40045	0,02614	5,99434
Dentro de grupos	16,71047	10	1,67105			
Total	46,12389	14				

Tabela 60. Análise de Variância para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	53,71796	17,90599	1,08133
2G RN1016	3	53,49792	17,83264	2,7598
2G CENPK	3	57,67868	19,22623	0,83924
CTL (-)	3	53,49792	17,83264	3,09873
2G Pedra 2	3	53,49792	17,83264	0,19367

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	4,55125	4	1,13781	0,71356	0,60131	5,99434
Dentro de grupos	15,94553	10	1,59455			
Total	20,49678	14				

Tabela 61. Análise de Variância para o analito **Matéria Orgânica** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	49,31716	16,43905	5,87467
2G RN1016	3	50,41736	16,80579	0,79082
2G CENPK	3	55,69832	18,56611	1,275
CTL (-)	3	51,51756	17,17252	0,14525
2G Pedra 2	3	51,51756	17,17252	0,91993

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	7,79201	4	1,948	1,08154	0,41591	5,99434
Dentro de grupos	18,01135	10	1,80113			
Total	25,80335	14				

Tanto na análise conjunta, contemplando todos os tempos de coleta, quando nas análises separadas por tempo de coleta, os valores de *F* calculados são inferiores aos valores de *F* Tabelados (*Crit. F*), e o *p-value* é superior ao nível de significância da análise (0,01). Assim, a hipótese inicial (H_0) não é rejeitada, confirmando que não existem diferenças significativas no conteúdo de **matéria orgânica** entre os tratamentos ao nível de 1% de significância.

Análises de Variância (ANOVA) para o Analito **pH ($CaCl_2$)**

Tabela 62. Análise de Variância conjunta para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	51,96	5,77333	0,01668
2G RN1016	9	51,2	5,68889	0,01709
2G CENPK	9	52,08	5,78667	0,01348
CTL (-)	9	52,35	5,81667	0,0132
2G Pedra 2	9	52,13	5,79222	0,00772

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	0,08575	4	0,02144	1,57263	0,20029	3,82829
Dentro de grupos	0,54524	40	0,01363			
Total	0,63099	44				

Tabela 63. Análise de Variância para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no primeiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	17,58	5,86	0,0019
2G RN1016	3	16,77	5,59	0,0157
2G CENPK	3	17,38	5,79333	0,01013
CTL (-)	3	17,12	5,70667	0,00503
2G Pedra 2	3	17,2	5,73333	0,00743

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	0,12253	4	0,03063	3,81012	0,03923	5,99434
Dentro de grupos	0,0804	10	0,00804			
Total	0,20293	14				

Tabela 64. Análise de Variância para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no segundo tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	16,94	5,64667	0,00363
2G RN1016	3	17,34	5,78	0,0169
2G CENPK	3	17,49	5,83	0,0201
CTL (-)	3	17,69	5,89667	0,00203
2G Pedra 2	3	17,44	5,81333	0,00423

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	0,10233	4	0,02558	2,72743	0,09029	5,99434
Dentro de grupos	0,0938	10	0,00938			
Total	0,19613	14				

Tabela 65. Análise de Variância para o analito **pH ($CaCl_2$)** compreendendo as amostras de todos os tratamentos no terceiro tempo de coleta.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	3	12,70866	4,23622	0,03
2G RN1016	3	13,60866	4,53622	0,1425
2G CENPK	3	14,58366	4,86122	1,20563
CTL (-)	3	16,30866	5,43622	0,26063
2G Pedra 2	3	16,90866	5,63622	0,34313

ANOVA

Origem de variação	*SQ*	*GL*	*QM*	*F*	*p-value*	*Crit. F*
Entre grupos	4,1865	4	1,04663	2,64049	0,09708	5,99434
Dentro de grupos	3,96375	10	0,39638			
Total	8,15025	14				

Tanto na análise conjunta, contemplando todos os tempos de coleta, quando nas análises separadas por tempo de coleta, os valores de *F* calculados são inferiores aos valores de *F* Tabelados (*Crit. F*), e o *p-value* é superior ao nível de significância da análise (0,01). Assim, a hipótese inicial (H_0) não é rejeitada, confirmando que não existem diferenças significativas no valor de **pH ($CaCl_2$)** entre os tratamentos ao nível de 1% de significância.

Análises de Variância (ANOVA) conjunta para o Analito **Boro** – Micronutriente

Tabela 66. Análise de Variância conjunta para o analito **Boro** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	1,39	0,15444	0,00055
2G RN1016	9	1,43	0,15889	0,00049
2G CENPK	9	1,47	0,16333	0,00095
CTL (-)	9	1,55	0,17222	0,00199
2G Pedra 2	9	1,76	0,19556	0,01008

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	0,00956	4	0,00239	0,84947	0,50243	3,82829
Dentro de grupos	0,11249	40	0,00281			
Total	0,12204	44				

Análises de Variância (ANOVA) conjunta para o Analito **Cobre** – Micronutriente

Tabela 67. Análise de Variância conjunta para o analito **Cobre** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	9,84324	1,09369	0,08457
2G RN1016	9	8,77559	0,97507	0,13866
2G CENPK	9	10,01292	1,11255	0,18626
CTL (-)	9	6,95926	0,77325	0,17948
2G Pedra 2	9	7,23051	0,80339	0,13896

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	0,90378	4	0,22594	1,55197	0,20585	3,82829
Dentro de grupos	5,82342	40	0,14559			
Total	6,72719	44				

Análises de Variância (ANOVA) conjunta para o Analito **Ferro** – Micronutriente

Tabela 68. Análise de Variância conjunta para o analito **Ferro** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos, exceto o controle negativo sem aplicação.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	276,20188	30,6891	8,91327
2G RN1016	9	282,25034	31,36115	8,16323
2G CENPK	9	293,82907	32,64767	17,9846
2G Pedra 2	9	249,52221	27,72469	4,36718

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	117,42784	3	39,14261	3,97102	0,01634	4,45943
Dentro de grupos	315,42626	32	9,85707			
Total	432,8541	35				

Análises de Variância (ANOVA) conjunta para o Analito **Manganês** – Micronutriente

Tabela 69. Análise de Variância conjunta para o analito **Manganês** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos, exceto o controle negativo sem aplicação.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	67,06455	7,45162	7,29093
2G RN1016	9	55,07703	6,11967	8,71387
2G CENPK	9	59,4058	6,60064	8,29224
2G Pedra 2	9	47,49822	5,27758	2,65466

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	22,31017	3	7,43672	1,10371	0,36195	4,45943
Dentro de grupos	215,61365	32	6,73793			
Total	237,92381	35				

Análises de Variância (ANOVA) conjunta para o Analito **Zinco** – Micronutriente

Tabela 70. Análise de Variância conjunta para o analito **Zinco** compreendendo todas as amostras de todos os tratamentos.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	6,80446	0,75605	0,01064
2G RN1016	9	6,6888	0,7432	0,01065
2G CENPK	9	7,18022	0,7978	0,01317
CTL (-)	9	6,89525	0,76614	0,08079
2G Pedra 2	9	7,48149	0,83128	0,05297

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	0,04554	4	0,01139	0,33839	0,85044	3,82829
Dentro de grupos	1,34581	40	0,03365			
Total	1,39135	44				

Nas análises conjutas para os analitos boro, cobre, ferro, manganês e zinco, que representam os principais micronutrientes minerais, não observou-se diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que a utilização da linhagem RN1016 não promove diferenças nas propriedades do solo em comparação a seu correspondente convencional, bem como aos controles comerciais amplamente utilizados no Brazil.

5.2.2. Avaliação do impacto da vinhaça e resíduos celulares da Levedura RN1016 nas propriedades físicas do solo;

O solo é uma matriz ambiental bem definida, e sua constituição depende da origem de sua formação. O intemperismo de rochas é responsável pela formação dos sedimentos que compões os diferentes tipos de solo. Em geral o solo é composto pelos componentes areia, silte e argila. Estas partículas possuem tamanhos distintos, separando-se umas das outras de 10 a 100 vezes em ordem de magnitude (Barreto *et al*., 1997).

Uma vez que a composição dos diversos tipos de solo é determinada pelo intemperismo de rochas de uma certa região, não espera-se que intervenções agrícolas alterem de forma significativa a composição mineralógica do solo, uma vez que componentes não são incluídos ou retirados em proporções significativas.

Partindo deste pressuposto, não existe motivo para acreditar que a aplicação de substâncias como a vinhaça ou resíduos celulares de levedura seriam suficientes para promover qualquer alteração nas propriedades físicas do solo. No entanto, para comprovar esta hipótese, as amostras de solo obtidas do experimento que trata este tópico tiveram sua composição mineralógica analisada.

Os dados das análises físicas das amostras são visualizados na Tabela 71. Observa-se que as quantidades de areia, silte e argila não diferem entre os tratamentos no início do experimento (primeira coleta) ou ao final do experimento (terceira coleta). Os dados puderam ser analisados em conjunto, agrupando-se as avaliações de todas as coletas por tratamento. Através de Análise de Variância (ANOVA) foi aceita a hipótese inicial de que as amostras de solo que receberam os diferentes tratamentos não diferem significativamente entre si.

As Tabelas 72 a 74 mostram os resumos das análises estatísticas conjuntas dos três principais componentes da fração mineralógica do solo.

Tabela 71. Análise das propriedades físicas do solo para os diferentes tratamentos com e sem aplicação de vinhaça não filtrada ao longo do tempo.

AMOSTRA		ANÁLISE FÍSICA DO SOLO							
				AREIA					
Coleta / Vaso	Tratamento	ARGILA	SILTE	Total	AMG	AG	AM	AF	AMF
1a / 1	1G Pedra 2	52	14	34	-	8	-	26	-
1a / 5	1G Pedra 2	52	13	35	-	8	-	27	-
1a / 13	1G Pedra 2	52	13	35	-	8	-	27	-
1a / 6	2G RN1016	47	18	35	-	8	-	27	-
1a / 8	2G RN1016	52	14	34	-	8	-	26	-
1a / 14	2G RN1016	55	11	34	-	8	-	26	-
1a / 4	2G CENPK	52	14	34	-	8	-	26	-
1a / 10	2G CENPK	51	14	35	-	7	-	28	-
1a / 12	2G CENPK	52	14	34	-	8	-	26	-
1a / 2	CTL (-)	52	13	35	-	7	-	28	-
1a / 3	CTL (-)	48	18	34	-	8	-	26	-
1a / 7	CTL (-)	52	14	34	-	7	-	27	-
1a / 9	2G Pedra 2	52	14	34	-	7	-	27	-
1a / 11	2G Pedra 2	56	10	34	-	7	-	27	-
1a / 15	2G Pedra 2	55	10	35	-	8	-	27	-
2a / 1	1G Pedra 2	56	19	25	-	8	-	17	-
2a / 5	1G Pedra 2	55	21	24	-	8	-	16	-
2a / 13	1G Pedra 2	57	19	24	-	8	-	16	-
2a / 6	2G RN1016	56	20	24	-	7	-	17	-
2a / 8	2G RN1016	58	18	24	-	7	-	17	-
2a / 14	2G RN1016	58	18	24	-	7	-	17	-
2a / 4	2G CENPK	55	19	26	-	8	-	18	-
2a / 10	2G CENPK	55	19	26	-	8	-	18	-
2a / 12	2G CENPK	54	20	26	-	8	-	18	-
2a / 2	CTL (-)	57	17	26	-	8	-	18	-
2a / 3	CTL (-)	57	18	25	-	8	-	17	-
2a / 7	CTL (-)	55	19	26	-	8	-	18	-
2a / 9	2G Pedra 2	57	16	27	-	8	-	19	-
2a / 11	2G Pedra 2	56	19	25	-	8	-	17	-
2a / 15	2G Pedra 2	57	17	26	-	9	-	17	-
3a / 1	1G Pedra 2	57	19	24	-	8	-	16	-
3a / 5	1G Pedra 2	57	19	24	-	8	-	16	-
3a / 13	1G Pedra 2	55	21	24	-	8	-	16	-
3a / 6	2G RN1016	57	19	24	-	7	-	17	-
3a / 8	2G RN1016	56	19	25	-	8	-	17	-
3a / 14	2G RN1016	57	19	24	-	7	-	17	-
3a / 4	2G CENPK	55	19	26	-	8	-	18	-
3a / 10	2G CENPK	55	19	26	-	8	-	18	-
3a / 12	2G CENPK	57	19	24	-	7	-	17	-
3a / 2	CTL (-)	57	17	26	-	8	-	18	-
3a / 3	CTL (-)	57	17	26	-	7	-	19	-
3a / 7	CTL (-)	55	20	25	-	8	-	17	-
3a / 9	2G Pedra 2	57	17	26	-	8	-	18	-
3a / 11	2G Pedra 2	56	19	25	-	8	-	17	-
3a / 15	2G Pedra 2	54	19	27	-	8	-	19	-

MG= areia muito grossa G= areia grossa M= areia média F= areia fina MF= areia muito fina

Tabela 72. Análise de Variância conjunta (ANOVA) da fração **argila** presente nas diferentes amostras de solo avaliadas.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	495,86471	55,09608	4,85811
2G RN1016	9	497,2265	55,24739	11,26684
2G CENPK	9	487,14968	54,12774	3,52907
CTL (-)	9	492,05924	54,67325	11,57462
2G Pedra 2	9	502,13785	55,79309	3,12652

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	14,09625	4	3,52406	0,51289	0,72659	3,82829
Dentro de grupos	274,84134	40	6,87103			
Total	288,93759	44				

Tabela 73. Análise de Variância conjunta (ANOVA) da fração **silte** presente nas diferentes amostras de solo avaliadas.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	158,	17,55556	10,77778
2G RN1016	9	156,	17,33333	8,5
2G CENPK	9	157,	17,44444	6,77778
CTL (-)	9	153,	17,	5,
2G Pedra 2	9	141,	15,66667	13,

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	21,55556	4	5,38889	0,6116	0,6567	3,82829
Dentro de grupos	352,44444	40	8,81111			
Total	374,	44				

Tabela 74. Análise de Variância conjunta (ANOVA) da fração **areia** presente nas diferentes amostras de solo avaliadas.

Análise de variância (Fator Exclusivo)

Resumo

Grupos	*Tamanho da amostra*	*Soma*	*Média*	*Variância*
1G Pedra 2	9	249,	27,66667	27,75
2G RN1016	9	248,	27,55556	26,02778
2G CENPK	9	257,	28,55556	19,27778
CTL (-)	9	257,	28,55556	19,02778
2G Pedra 2	9	259,	28,77778	17,94444

ANOVA

Origem de variação	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-nível*	*Crit. F*
Entre grupos	11,55556	4	2,88889	0,13128	0,97005	3,82829
Dentro de grupos	880,22222	40	22,00556			
Total	891,77778	44				

Para os três analitos avaliados que representam os componentes físicos do solo, a areia, o silte e a argila, não observou-se diferença significativa entre as amostras de solo dos 5 tratamentos. Conclui-se que a aplicação em solo de vinhaça não filtrada produzida pela Levedura GM RN1016 não é causadora de alterações nas propriedades físicas do solo, sendo tão segura quanto seu equivalente convencional, bem como dos controles comercial e sem tratamento.

5.2.3. Avaliação do impacto da vinhaça e resíduos celulares da Levedura RN1016 na comunidade microbiana do solo;

5.2.3.1. Introdução;

A diversidade biológica é um tema de particular relevância na natureza. Direta ou indiretamente a variabilidade dos organismos em geral afeta a todos, e por isso é um tema que ultrapassa os limites da ciência, impactando a esfera socioeconômica.

A Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) define a biodiversidade do solo como "A variação da vida no solo, de genes a comunidades, e a complexidade ecológica da qual fazem parte, de micro-habitats a paisagens".

O solo é uma matriz ambiental bastante dinâmica e complexa. A diversidade microbiana do solo tem papel fundamental na ciclagem de nutrientes, decomposição de resíduos, descontaminação de poluentes, estruturação do solo e interações com outros organismos. A diversidade microbiana é frequentemente utilizada como indicador de qualidade do solo.

Os recentes avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA têm revolucionado diversas áreas da biologia, possibilitando a realização de experimentos para obtenção de dados bastante completos, que eram inviáveis até alguns anos atrás (Wang *et al*., 2012; Abecasis *et al*., 2010).

A metagenômica foi uma das grandes áreas que se beneficiou destas novas tecnologias hoje disponíveis (Pace, 2009). A nova era da metagenômica tem se baseado no uso de marcadores filogenéticos, como o RNA ribossomal 16S para bactérias e ITS para fungos, para a inferência taxonômica de microrganismos presentes em diversos ambientes (Foster *et al*., 2012).

A estrutura do gene ribossomal 16S e do ITS consistem em regiões conservadas interespaçadas por regiões variadas, o que permite o uso de estratégias de amplificação por PCR e sequenciamento através do desenho de *primers* em regiões conservadas que flanqueiam as regiões variadas. A tecnologia de sequenciamento Miseq da Illumina é apropriada para o sequenciamento dessas regiões variadas (tanto de bactéria como de fungo)

por ser capaz de produzir milhões de *reads* com 250 pb (pares de bases) cada. Além disso, é possível utilizar a metodologia chamada de *paired-end* que permite sequenciar as duas extremidades de um fragmento de DNA.

Nesta técnica, a partir de um fragmento de DNA de até 450 pb são gerados outros dois *reads* de 250 pb cada um. Estes *reads* podem então ser transformados em um *read* único com tamanho efetivo de 450 pb devido a sobreposição *(overlap)* de 50 pb entre os dois *reads*. Uma ilustração do emprego desta estratégia para o sequenciamento da região v4 do gene ribossomal 16S é apresentado na Figura 69.

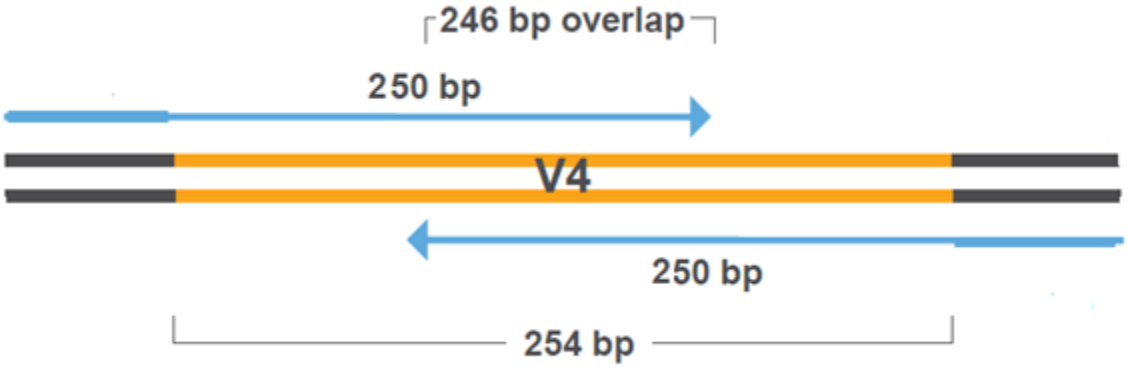

Figura 69: Região variada v4 do gene ribossomal 16S sequenciada por *reads paired-end* de 250 bp. Devido a sobreposição de 246 bp entre os *reads* é possível reconstruir o fragmento completo que possui 254 bp e promover e identificação em bancos de dados publicos.

Em paralelo a evolução tecnológica da área de metagenômica, grandes avanços ocorreram nas áreas de computação (Meyer *et al*., 2008; Huson *et al*., 2011; Caporaso *et al*., 2010; Schloss *et al*., 2009) e bancos de dados (Quast *et al*., 2013) de forma a permitir o processamento da enorme quantidade de informação produzida nesse tipo de experimento. De forma resumida, essas metodologias computacionais comparam os *reads* à sequências de RNA ribossomal encontradas em banco de dados específico. Através de análises estatísticas (máxima parcimônia, *bootstrap,* entre outras) tais ferramentas computacionais conseguem identificar a população de microrganismos que deram origem àquelas sequências. Neste contexto, a inferência taxonômica pode ser realizada em diversos níveis como filo, classe, ordem, família, gênero e espécie.

Utilizando destas tecnologias de última geração foi possível conduzir a análise de metagenômica das amostras do solo que receberam a vinhaça

não filtrada produzida pela levedura RN1016 e controles não GM (Pedra-2 e CEN.PK) após fermentação de hidrolisado, bem como da levedura comercial Pedra-2 fermentando o xarope de cana-de-açúcar, que representa o processo amplamente empregado pelas usinas brasileiras de primeira geração. Este é um estudo pioneiro que, além de demostrar a biossegurança da linhagem RN1016, fornece uma análise comparativa do efeito da vinhaça de primeira geração (atual) com a vinhaça da produção de etanol celulósico (2G), que em breve deverá atingir escala comercial no Brasil.

5.2.3.2. Materiais e métodos;

Obtenção de DNA genômico 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 60µLde solução C1 a cada tubo. As amostras foram homogeneizada vigorosamente por 2 minutos utilizando Mini-Beadbeater (BioSpec) e, em seguida, centrifugadas a 10.000xg por 30 segundos. Aproximadamente 400-500µLde sobrenadante foram transferidos para "2 mL Collection Tubes", 250 µL de C2 foram adicionados e as amostras foram mantidas a 4ºC por 5 min. Os tubos foram então centrifugados a 10.000xg por 30s e 600µLde sobrenadante foram transferidos para tubos novos. 200µL de C3 foram adicionados e as amostras foram mantidas novamente a 4ºC por 5 min.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000xg por 30s e 750µL de sobrenadante foram transferidos para novos tubos. 1.200µL de C4 foram adicionados a estes tubos, homogeneizados e 675µL foram transferidos para a "Spin filter", seguido de centrifugação a 10.000xg por 30s (passo repetido 3 vezes). Em seguida, a coluna foi lavada com 500µL de C5 e realizou-se uma nova centrifugação a 10.000xg por 1 min. Por fim, 100µL 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 padrão de sequenciamento da *facility*.

Montagem dos *reads* e inferência taxonômica

As regiões variadas V4 do gene ribossomal 16S de bactéria e ITS9 de fungo foram sequenciadas com a tecnologia de ultima geração *Miseq* (Illumina) produzindo milhares de sequências (*reads*) *paired-end* de 250 pb para cada amostra. A utilização de kit de código de barras durante a preparação das bibliotecas permitiu o sequenciamento de múltiplas amostras em uma única corrida de *Miseq*.

As sobreposições entre os *reads paired-end* foram computadas através do programa Seqprep (https://github.com/jstjohn/SeqPrep) considerando um mínimo de 30 pb com uma diferença máxima de 10%. As análises foram realizadas pelos programas MOTHUR (Schloss *et al*., 2009) e BLAST (Altschul *et al*., 1997) utilizando os banco de dados de sequências ribossomais Greengenes (DeSantis *et al*., 2006) e de sequencias de ITS de fungo disponíveis no NCBI (Fungi[Organism] and (internal transcribed spacer OR ITS OR ITS1 OR ITS2)).

As análises taxonômicas de bactérias foram realizadas no MOTHUR considerando apenas as sequencias resultantes da sobreposição. Cada sequencia foi alinhada contra o Greengenes utilizando o método de alinhamento global, com penalidade de gaps = -1, calculando no final a matriz de distância. O método de agrupamento por distância foi aplicado sobre a matriz de distâncias de forma a obter as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com os seus respectivos número de *reads*. As OTUs foram agrupadas pelo método *average neighbor* considerando uma distância máxima de 0.1. Finalmente cada OTU foi classificada em todos os níveis taxonômicos utilizando um *bootstrap* igual a 1000 interações e um valor de confiança maior ou igual a 70%.

Para as análises taxonômicas de fungo foram utilizados as sequencias resultantes da sobreposição dos *reads* e também todos os *reads* que falharam na análise de sobreposição. Estes últimos foram incluídos na análise pelo fato do tamanho da região ITS em fungos variar entre 370 a 1200 bp. O programa BLASTn foi utilizado para alinhar todos as sequencias contra o banco de ITS de fungos e a associação taxonômica foi obtida considerando o resultado mais significativo do BLAST, apenas sequencias com pelo menos 90% de cobertura foram consideradas na análise.

5.2.3.3. Resultados e discussão;

O DNA genômico de todas as 36 amostras foi extraído e teve rendimento conforme o esperado, obtendo-se quantidades e qualidade apropriadas para o sequenciamento (Figura 70). Através do serviço oferecido pela HTSF (*North Carolina University*) as regiões 16S e ITS foram amplificadas e em seguida o produto da PCR foi utilizado no sequenciamento seguindo os protocolos estabelecido pela *facility*.

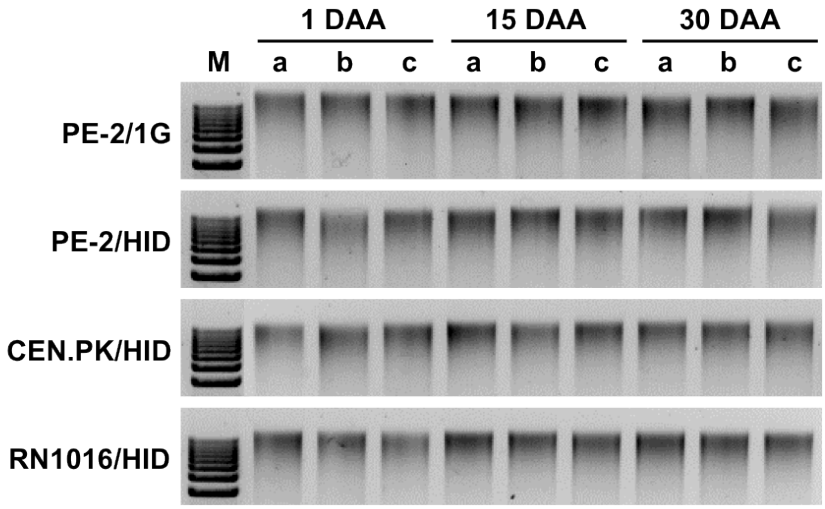

Figura 70: Gel de agarose 0,7% para avaliar a qualidade do DNA genômico extraído de amostras de solo suplementado com diferentes fontes de vinhaça. PE-2/1G: vinhaça similar a obtida no processo de produção de etanol de primeira geração utilizando a levedura selvagem Pedra-2; PE-2/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, processo de etanol celulósico, pela linhagem PE-2; CEN.PK/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem selvagem CEN.PK, parental da RN1016; RN1016/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem geneticamente modificada RN1016. DAA: dias após a aplicação da vinhaça. a, b e c: réplicas biológicas.

Aproximadamente 3,4 milhões de sequências referente à região 16S e 6,8 milhões referente à região ITS foram geradas para as 36 bibliotecas. Destas, obteve-se uma média de 107 mil *reads* para cada amostra cuja região 16S foi sequenciada para a detecção de bactérias e 68 mil sequências para a detecção de fungos através do sequenciamento da região ITS. A partir destas, foram utilizados os descritos anteriormente para a analisar de forma qualitativa e quantitativa as possíveis alterações na microbiota do solo em função do uso da linhagem RN1016 para a produção de etanol de segunda geração, bem como dos diferentes tipos de vinhaça produzidos.

5.2.3.3.1. Avaliação sobre a comunidade bacteriana;

A análise qualitativa do sequenciamento da região 16S revelou a ocorrência de dez classes entre toda comunidade bacteriana dos solos analisados: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Sphingobacteria, Gemmatimonadetes, Deltaproteobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi. A única diferença qualitativa observada é a ausência de representantes da classe Chloroflexi apenas nas amostras coletadas um dia após a aplicação das vinhaças (1 DAA) (Figura 71). No entanto, este resultado é observado nos quatros tratamentos realizados, incluindo o tratamento PE-2/1G que mimetiza as condições industriais atuais, eliminando a possibilidade desta observação sobre a comunidade microbiana estar relacionada à (i) utilização da linhagem RN1016, (ii) de qualquer resíduo produzido por ela durante a fermentação do hidrolisado ou (iii) ocorrer função da tecnologia industrial que será empregada na produção de etanol celulósico (segunda geração).

Analisando a distribuição das classes dentro de cada tratamento, dada pela média da frequência ou abundância relativa de sequências do gene rRNA 16S, observa-se a prevalência de algumas classes dentro da comunidade bacteriana presente neste microambiente. No primeiro ponto amostrado (1 DAA) bactérias da classe Bacilli são mais abundantes em todas os solos analisados, representando 24,7%, 23,9%, 21,1% e 27,8% da diversidade bacteriana das amostras PE-2/1G; PE-2/HID, CEN.PK/HID e RN1016/HID, respectivamente. A classe Actinobacteria é a segunda mais

abundante, correspondendo a 14,5%, 21,1%, 18,0% e 14,6% da comunidade bacteriana detectada nos mesmos tratamentos (Figura 71).

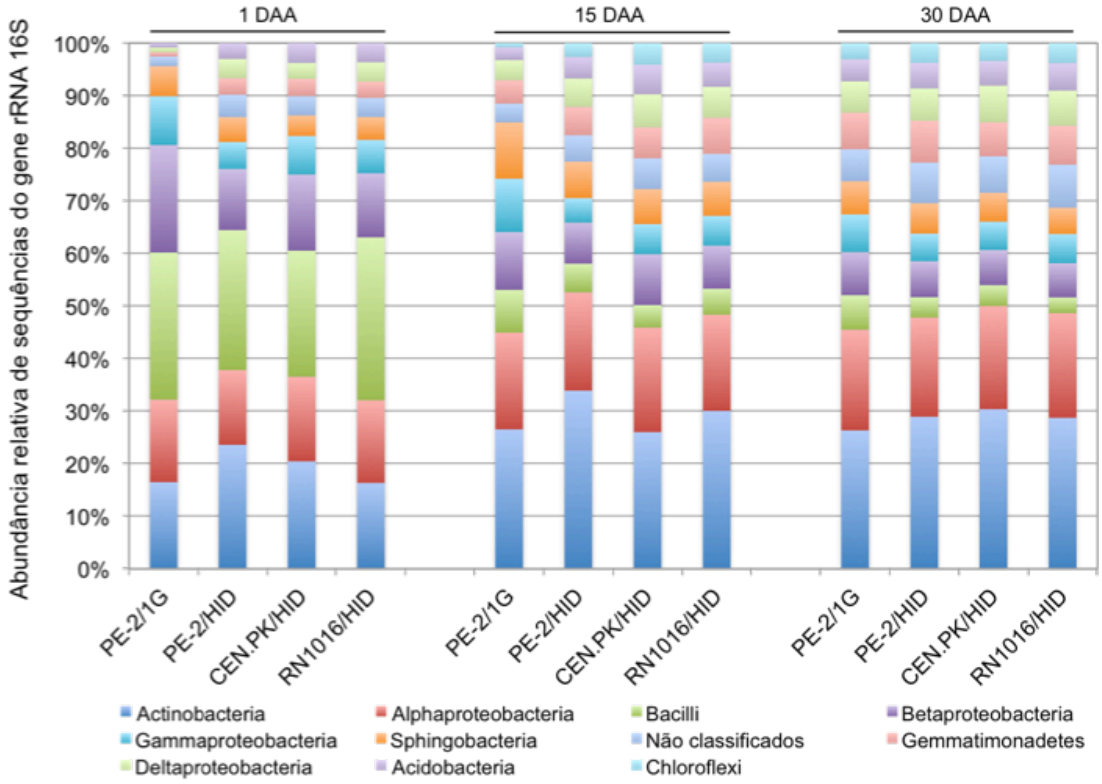

Figura 71. Efeito da aplicação de diferentes vinhaças sobe a comunidade bacteriana do solo de canavial. Dados gerados a partir do sequenciamento da região v4 do gene rRNA 16S utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração *Miseq* (Illumina). Todas as bactérias detectadas foram agrupadas em diferentes classes. A distribuição das classes em cada amostra é representada pela média de três réplicas biológicas. Cada réplica biológica é composta por três diferentes pontos de amostragem. PE-2/1G: vinhaça similar a obtida no processo de produção de etanol de primeira geração utilizando a levedura selvagem Pedra-2; PE-2/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, processo de etanol celulósico, pela linhagem PE-2; CEN.PK/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem selvagem CEN.PK, parental da RN1016; RN1016/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem geneticamente modificada RN1016. DAA: dias após a aplicação da vinhaça.

Nos dois pontos seguintes (15 e 30 DAA) Actinobacteria e Alphaproteobacteria são as duas classes mais representadas em todos os tratamentos. Actinobacteria constitui 23,5%, 28,7%, 22,1% e 25,8% da população bacteriana das amostras PE-2/1G; PE-2/HID, CEN.PK/HID e RN1016/HID 15 dias após a aplicação e 22,6%, 24,8%, 25,8% e 24,2% no terceiro ponto amostrado. De modo similar, Alphaproteobacteria representa 16,3%, 15,9%, 16,9% e 15,7% das bactérias detectadas 15 DAA e 16,5%, 16,2%, 16,7% e 16,8% 30 DAA (Figura 71).

É importante notar que as diferenças na distribuição das classes se reproduz em todos as amostras coletadas no mesmo período, indicando que estas estão diretamente relacionadas ao tempo, ou seja, ocorrem em função da disponibilidade de nutrientes gerada pela aplicação das vinhaças e não em função dos microrganismos (PE-2, CEN.PK ou RN1016) ou dos substratos (1G ou HID) utilizados para a fermentação. Além disso, é possível observar uma maior equivalência entre os resultado obtidos a partir das amostras coletadas 15 e 30 após a aplicação das vinhaças. Isto demonstra que a comunidade bacteriana se estabiliza em curto prazo e indica que os tratamentos não causam alterações irreversíveis ou prejudiciais na diversidade bacteriana (Figura 72).

A comunidade microbiana naturalmente apresenta um alto poder tampão. A estabilidade observada 15 após a aplicação, que se repete aos 30 dias após aplicação, demonstra que esta comunidade leva poucos dias para atingir o equilíbrio após determinada interferência, neste caso representada pela aplicação dos tratamentos.

Adicionalmente, realizou-se diferentes comparações par-a-par para a confirmar a segurança no uso da linhagem RN1016.

Para demostrar incialmente alterações em função dos diferentes substratos utilizados na fermentação (1G e HID) comparou-se os tratamentos PE-2/1G e PE-2/HID, que representam as diferentes tecnologias de produção de etanol, utilizando a levedura controle não GM Pedra-2 em ambos os casos. Como demostrado na Figura 72, diferenças sutis são observadas, possivelmente associadas à composição dos substratos. Porém, é importante notar que nenhuma classe de bactéria é drasticamente afetada, a ponto de ser eliminada ou altamente favorecida pelo uso do hidrolisado da palha da cana-de-açúcar como substrato para a fermentação. Este resultado não faz referencia à biossegurança da linhagem RN1016, mas indica a equivalência de ambos os processos industriais no impacto à microbiota do solo. Pode-se assumir que a tecnologia de produção de etanol celulósico não traz diferenças significativas de impacto à microbiota quando comparada a tecnologia atual amplamente utilizada no Brasil e no mundo.

Em outras duas comparações avaliou-se o efeito direto do tratamento RN1016 sobre a comunidade microbiana. Os resultados obtidos

demonstraram que a vinhaça não filtrada resultante da fermentação do hidrolisado pela linhagem RN1016 não provoca alterações significativas em relação às vinhaças derivadas da fermentação utilizando duas leveduras selvagens, os controles PE-2 (Figura 73) e CEN.PK (Figura 74). Analisando-se o perfil de ocorrência, e respectivas barras de erro, das classes bacterianas nas comparações de RN1016 com os controles não GM parental e comercial ao longo do tempo, pode-se observar que a utilização da linhagem RN1016 não implica em alterações significativas.

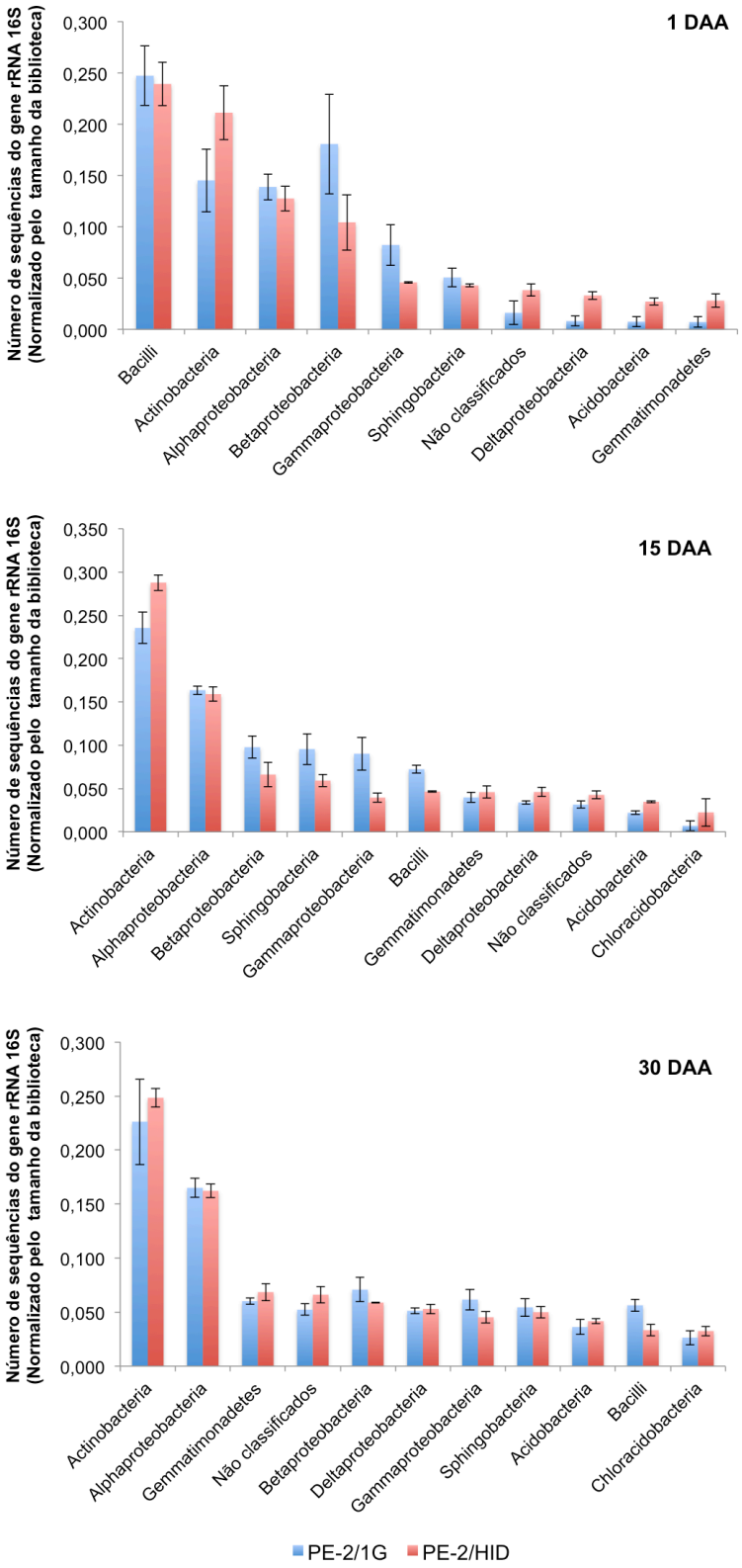

Figura 72. Efeito da vinhaça não filtrada derivada da fermentação do hidrolisado pela levedura PE-2 sobre a comunidade bacteriana do solo de canavial. PE-2/1G: vinhaça similar a obtida no processo de produção de etanol de primeira geração utilizando a levedura selvagem Pedra-2; PE-2/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, processo de etanol celulósico, pela linhagem PE-2.

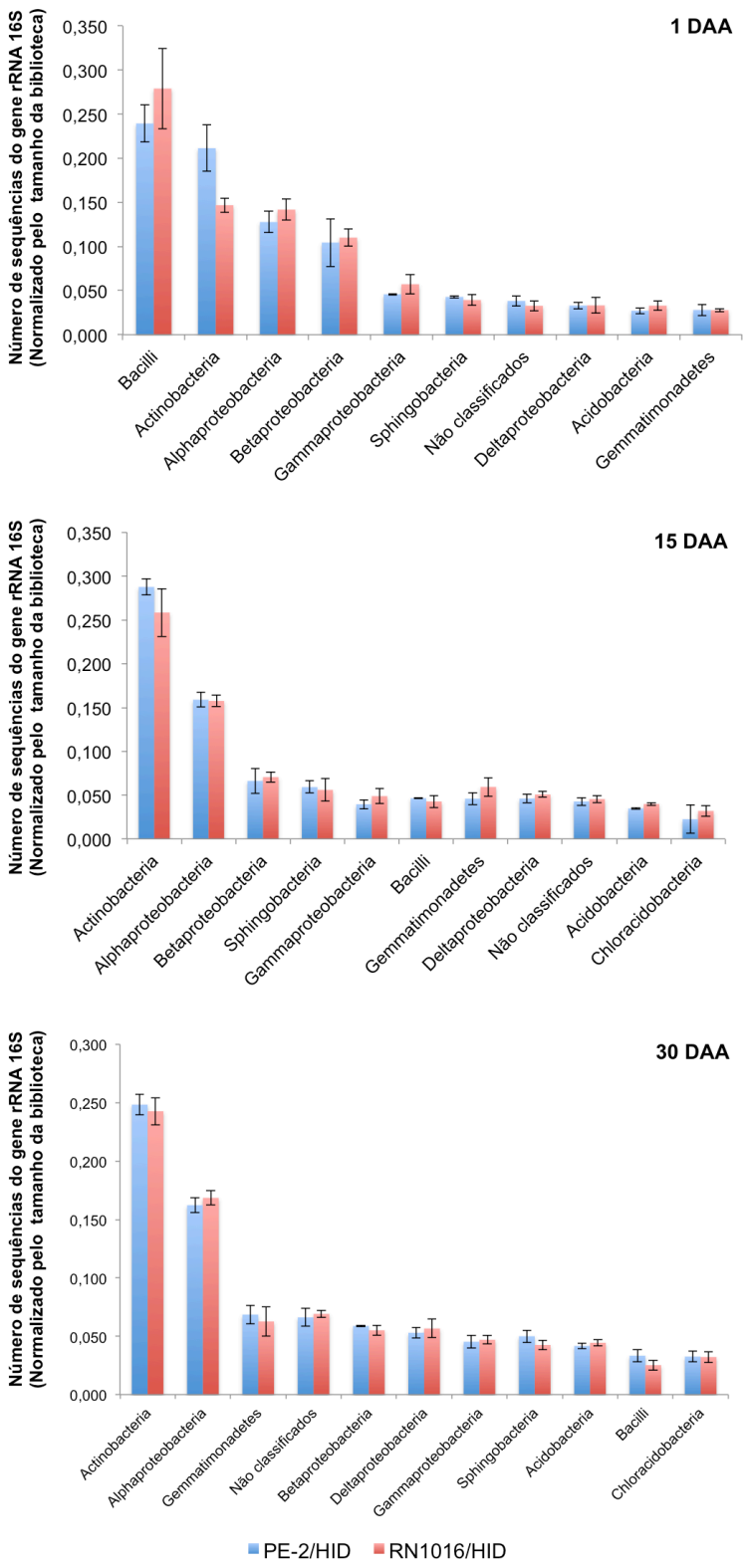

Figura 73. Efeito da vinhaça não filtrada derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras PE-2 e RN1016 sobre a comunidade bacteriana do solo de canavial. PE-2/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, processo de etanol celulósico, pela linhagem PE-2. RN1016/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem geneticamente modificada RN1016.

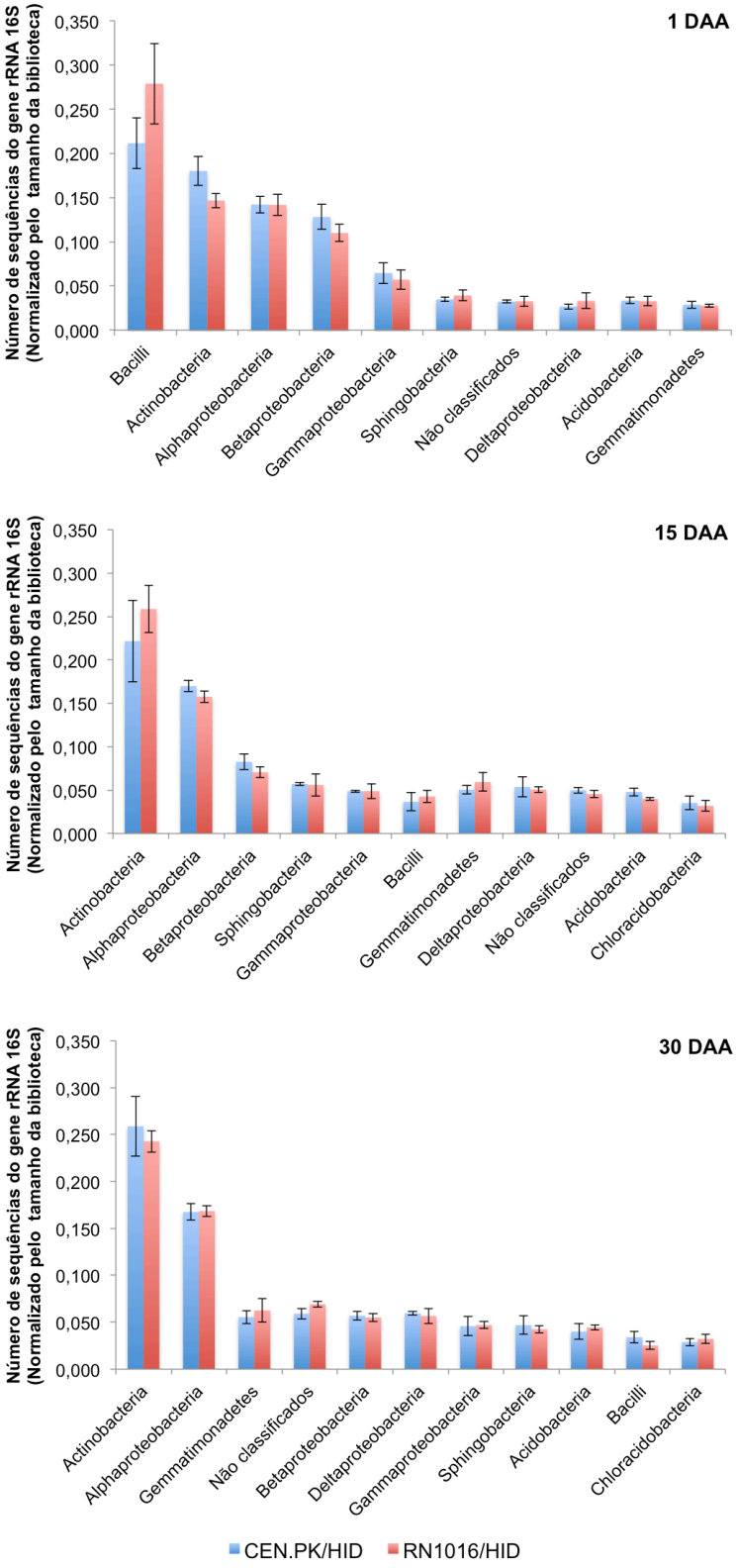

Figura 74. Efeito da vinhaça não filtrada derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras CEN.PK e RN1016 sobre a comunidade bacteriana do solo de canavial. CEN.PK/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem selvagem CEN.PK, parental da RN1016; RN1016/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem geneticamente modificada RN1016.

Em resumo, a comunidade microbiana presente no solo utilizado para o cultivo da cana-de-açúcar, não sofre alterações significativas em função do tratamento com vinhaça não filtrada derivada da fermentação do hidrolisado empregando a linhagem geneticamente modificada RN1016, assegurando que o uso deste OGM não põe em risco à diversidade microbiana encontrada neste microambiente.

5.2.3.3.2. Avaliação sobre a comunidade fúngica;

Para avaliar o potencial impacto do uso da levedura RN1016 sobre a comunidade de fungos do solo, a região ITS de toda microbiota foi sequenciada. A partir dos resultados obtidos, detectou-se representantes constituintes de quatro classes predominantes: Sordariomycetes, Tremellomycetes, Dothideomycetes, e Eurotiomycetes, além de um número significativo de fungos ascomicetos cuja a classe não é determinada. Estes últimos foram inseridos na análise e agrupados em um grupo específico denominado Ascomycetes.

Como apresentado na Figura 75, as cinco classes são encontradas em todos os tratamentos, sendo o grupo dos Sordariomycetes a classe mais abundante em todas as amostras, variando de 55,5% a 73,1% dentro da diversidade de fungos detectada. A maior população foi identificada nos tratamentos PE-2/1G (55,5%) e CEN.PK/HID (73,1%) no primeiro ponto amostrado (1 DAA) e nos pontos seguintes (15 e 30 DAA), compreendendo 57,5% a 69,0% da população total de fungos nas amostras, respectivamente.

Assim como para bactérias, a disponibilidade de nutrientes gerada pela aplicação das vinhaças causa uma breve e esperada resposta, que é revertida em curto prazo. É importante notar que não houveram mudanças drásticas na diversidade, como por exemplo, o desaparecimento de algum grupo em função dos tratamentos, indicando que o emprego da RN1016 e o uso do hidrolisado como substrato para a fermentação também não oferecem riscos para a comunidade de fungos do solo.

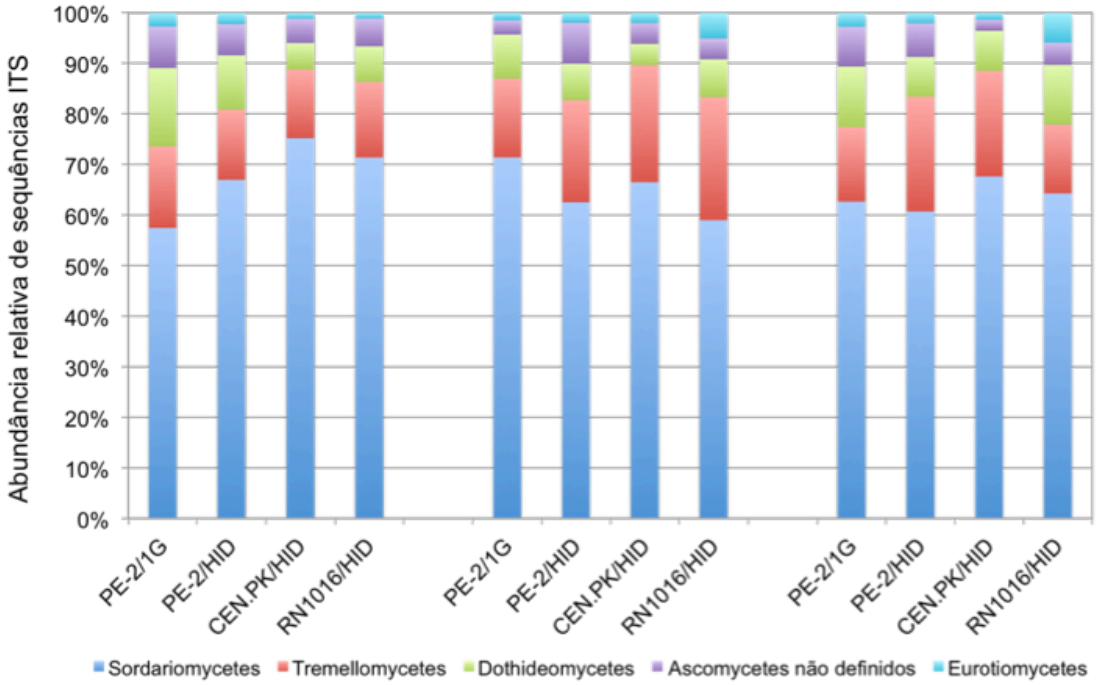

Figura 75. Efeito da aplicação de diferentes vinhaças sobe a comunidade de fungos do solo de canavial. Dados gerados a partir do sequenciamento da região ITS utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração *Miseq* (Illumina). Todas os fungos detectados foram agrupadas em diferentes classes. A distribuição das classes em cada amostra é representada pela média de três réplicas biológicas. PE-2/1G: vinhaça similar a obtida no processo de produção de etanol de primeira geração utilizando a levedura selvagem Pedra-2; PE-2/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, processo de etanol celulósico, pela linhagem PE-2; CEN.PK/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem selvagem CEN.PK, parental da RN1016; RN1016/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem geneticamente modificada RN1016. DAA: dias após a aplicação da vinhaça; Ascomycetes não definidos: fungos ascomicetos que não possuem classe definida.

Adicionalmente, a análise par-a-par entre diferentes amostras fornece uma comparação direta entre os diferentes tratamentos empregados. Assim como observado nas análises sobre a comunidade bacteriana, a aplicação das vinhaças não filtradas produzidas pela fermentação de xarope de cana-de-açúcar (1G) e hidrolisado de palha (2G) pela levedura comercial Pedra-2 não promovem alterações significativas na comunidade fúngica do solo ao longo do tempo quando comparadas entre si (Figura 76).

Observa-se na comparação do processo tradicional (1G) com o processo celulósico (2G), ambos com a utilização de Pedra-2, que as mesmas classes de fungos são identificadas, mostrando 100% de equivalência. As quantidades de ocorrência das diferentes classes de fungos não diferem entre si de forma significativa. Uma pequena alteração

observada entre estes dois tratamentos, por mais que seja não significativa, pode ser justificada pela composição dos produtos da fermentação, uma vez que o processo 2G produz uma vinhaça um pouco mais rica em nutrientes, devido a utilização de biomassa como substrato, e não apenas do caldo da cana.

Sabe-se que a microbiota do solo pode ser consideravelmente variável em diferentes amostras mesmo de locais muito próximos, e diversos fatores como água, aeração, compactação, histórico de uso e outros podem alterar de forma significativa a ocorrência dos microrganismos. Por este motivo o solo coletado do canavial foi homogeneizado e acondicionado em vasos, que foram irrigados com a mesma periodicidade e quantidade de água durante todo o experimento, de modo a minimizar os efeitos de variabilidade inerentes à matriz solo. As análises mostradas a seguir fazem referência à comparação do tratamento RN1016 com os controles não GM.

As comparações entre os tratamentos RN1016 e os controles não GM Pedra-2 (comercial) e CEN.PK (parental) são mostradas nas Figuras 77 e 78, respectivamente. Observa-se 100% de equivalência das classes de fungos que ocorreram entre os tratamentos e, mais ainda, uma elevada equivalência numérica na quantidade observada.

Estas comparações do tratamento RN1016 com os controles não GM mostram uma equivalência ainda maior do que a comparação dos dois tratamentos que utilizaram a mesma linhagem comercial selvagem Pedra-2 (Figura 76). Essa observação é bastante relevante, indicando que a utilização da levedura geneticamente modificada RN1016 não promove qualquer alteração causadora de impacto quando comparada as controles não GM.

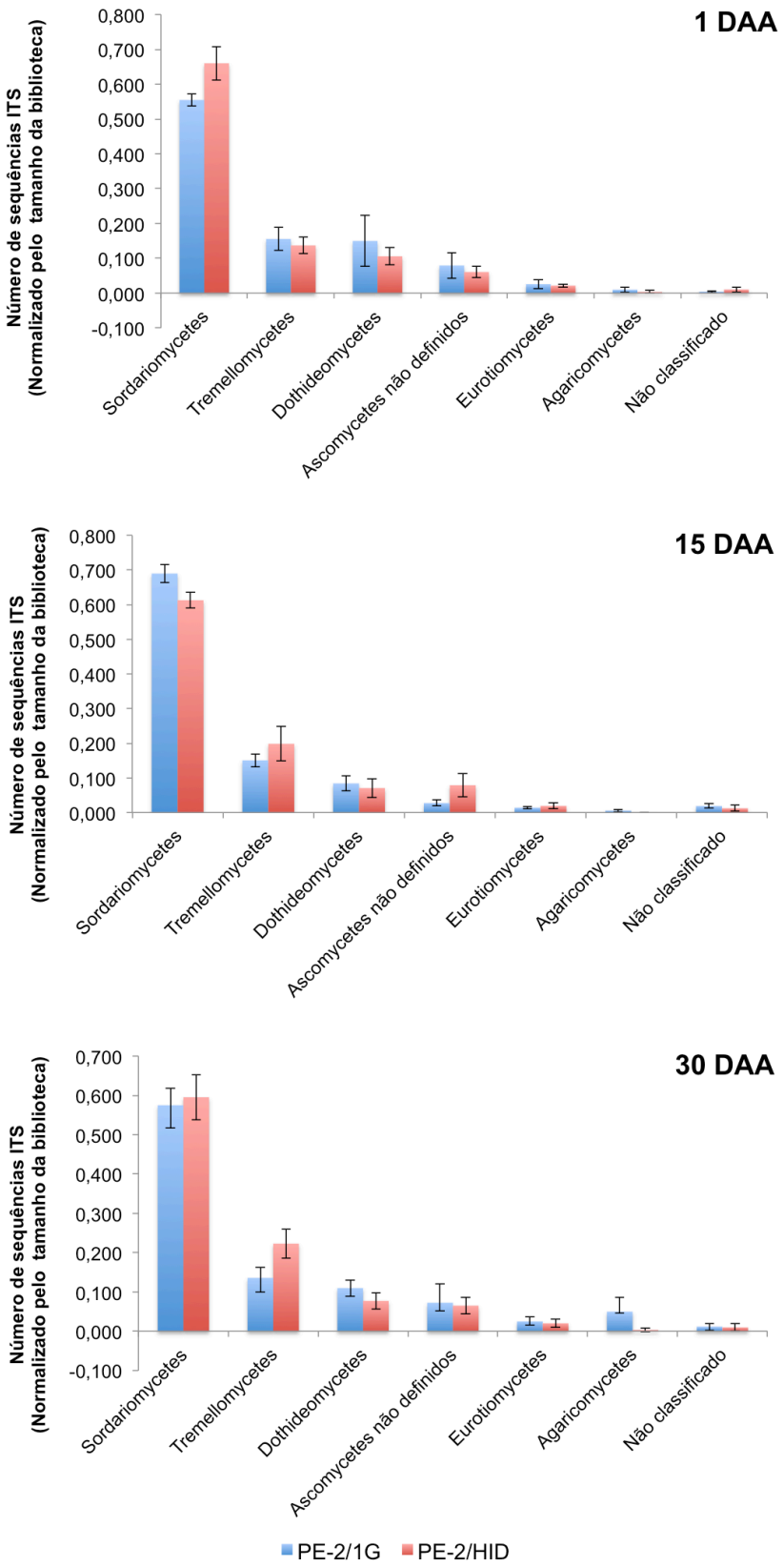

Figura 76. Efeito da vinhaça derivada da fermentação do hidrolisado pela levedura PE-2 sobre a comunidade de fungos do solo utilizado para o cultivo de cana-de-açúcar. PE-2/1G: vinhaça similar a obtida no processo de produção de etanol de primeira geração utilizando a levedura selvagem Pedra-2; PE-2/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, processo de etanol celulósico, pela linhagem PE-2.

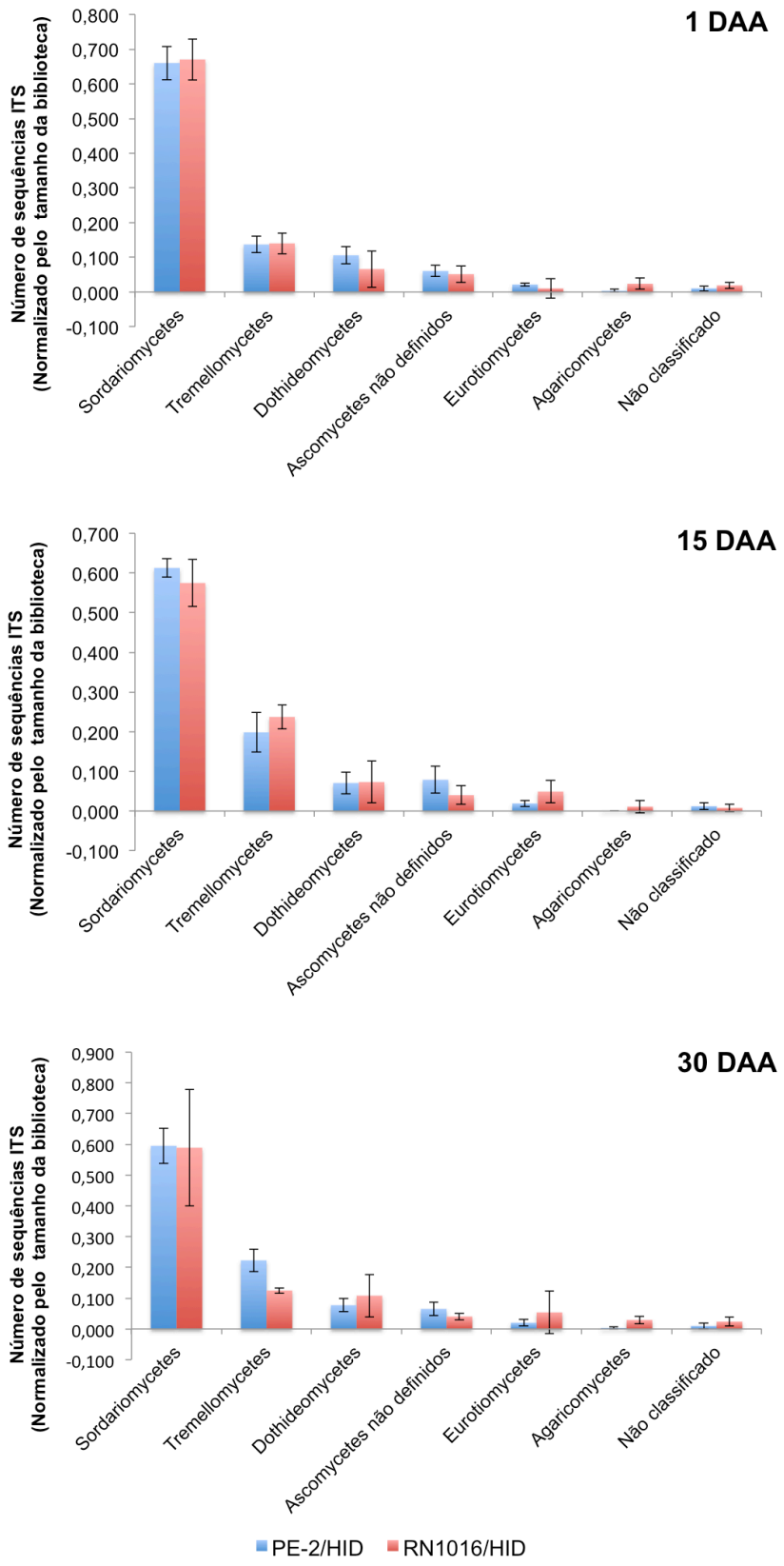

Figura 77. Efeito da vinhaça derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras PE-2 e RN1016 sobre a comunidade de fungos do solo utilizado para o cultivo de cana-de-açúcar. PE-2/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, processo de etanol celulósico, pela linhagem selvagem PE-2; RN1016/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem geneticamente modificada RN1016.

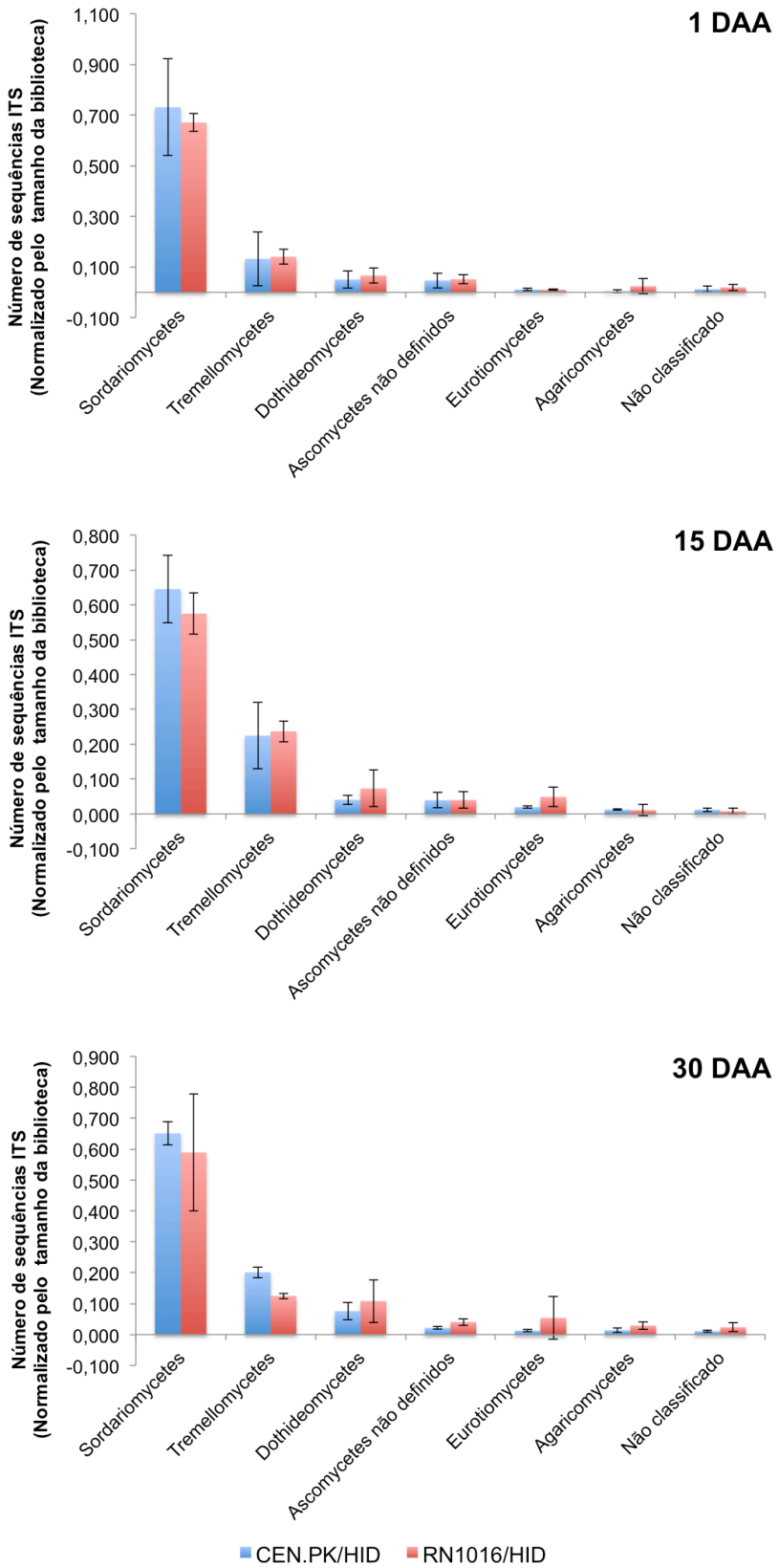

Figura 78. Efeito da vinhaça derivada da fermentação do hidrolisado pelas leveduras CEN.PK e RN1016 sobre a comunidade de fungos do solo utilizado para o cultivo de cana-de-açúcar. CEN.PK/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem selvagem CEN.PK, parental da RN1016; RN1016/HID: vinhaça obtida pela fermentação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pela linhagem geneticamente modificada RN1016.

5.2.3.4. Conclusões;

O processo industrial de produção de etanol celulósico prevê a possibilidade de aplicação no solo da vinhaça resultante. No processo industrial, a vinhaça passará por processo de filtragem para retenção da lignina, que é imediatamente queimada para geração de calor. Sabe-se que esta filtragem retém a grande maioria dos resíduos celulares das leveduras. No presente experimento optou-se por realizar uma avaliação mais abrangente, que possibilitou tanto a avaliação das diferentes vinhaças no solo, quanto dos resíduos celulares das leveduras, de forma comparativa.

O experimento mostrou que a Usina de etanol celulósico utilizará uma prática amplamente utilizada pela usina brasileira de açúcar e álcool, e que não existe diferença entre os dois processos com relação ao impacto na microbiota do solo de canavial, bem como em suas características físicas e químicas.

Ainda, com a utilização dos tratamentos representados pela vinhaça propositalmente não filtrada, pôde-se avaliar o potencial efeito direto da levedura geneticamente modificada RN1016 em comparação com controles não GM, parental e comercial. Os resultados, obtidos com a utilização de técnicas modernas de metagenômica, demonstraram que a utilização da levedura RN1016 não é potencialmente causadora de alterações significativas na comunidade microbiana do solo, bem como às características físicas e químicas.

Estes resultados somados aos demais apresentados neste relatório de biossegurança indicam que a levedura RN1016, que expressa o gene exógeno *XylA*, não é potencialmente causadora de efeitos adversos à saúde humana, animal e ao meio ambiente.

XII. Considerações finais

A tecnologia que permite a fermentação de biomassa lignocelulósica representa uma importante alternativa sustentável para a produção do biocombustível etanol. Pesquisas nesta área vem sendo desenvolvidas nas últimas décadas, mas somente nos dias atuais a otimização das etapas do processo atingiram o refinamento necessário para que o emprego em escala comercial seja economicamente viável.

Poucos países no mundo já possuem unidades industriais de produção de etanol celulósico, e nestes países os Governos tem adotado políticas de incentivo e prêmios fiscais para a produção deste combustível de fontes renováveis. A utilização de palha, bagaço e outros resíduos industriais representa o aproveitamento da biomassa vegetal para a síntese de um importante combustível sem necessidade de expansão da fronteira agrícola ou competição com a produção de alimentos.

Com a aprovação da utilização comercial da levedura RN1016, o Brasil será o primeiro pais do hemisfério sul a iniciar a produção em escala comercial do etanol celulósico. Esta produção se dará pela usina de etanol celulósico da Empresa brasileira GraalBio, atualmente em construção no estado de Alagoas. A operação desta unidade industrial será o marco de uma nova era na produção de etanol no Brasil e no mundo, e se concretizará através de uma Empresa 100% brasileira, investindo no país e apostando em uma tecnologia inovadora.

A linhagem RN1016 passou por um processo simples de modificação genética por recombinação homóloga, tento recebido apenas um gene exógeno, além do aumento da expressão de genes endógenos e uma deleção. As modificações genéticas incluídas na linhagem RN1016 estão relacionadas ao metabolismo de açúcares, e não interferem em características adicionais da célula.

Os diversos resultados experimentais apresentados neste Relatório, bem como a vasta quantidade de informações disponíveis na literatura, atestam a biossegurança da linhagem RN1016 para a saúde humana, animal e para o meio ambiente.

XIII. Referências bibliográficas

Abecasis, G. R., Altshuler, D., and Auton, A. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061–1073. 2010.

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

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.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389–3402. 1997.

Amore, R.; Wilhelm, M.; Hollenberg, C. P. 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.

Amorim, M.J., Natal-da-Luz, T.T., Sousa, J.P., Loureiro, S.S., Becker, L., Römbke, J., Soares, A.M. Boric acid as reference substance: pros, cons and standardization. Ecotoxicology 21(3):919-24. 2012.

Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski PA, Duarte FM, Netto OVC, Missawa SK, Galzerani F, Costa GGL, Vidal RO, Noronha MF, Dominska M, Andrietta MGS, Andrietta SR, Cunha AF, Gomes LH, Tavares FCA, Alcarde AR, Dietrich FS, McCusker JH, Petes TD, Pereira GAG. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research* **19**:2258-70. 2009.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, A. J.; Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology. New York - USA, John Wiley & Sons Inc, 1998.

Barnett, JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characterization and identification. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1990.

Barr, D. J. S. How modern systematics relates to the rumen fungi. Biosystems, 21:351-356, 1988.

Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. FEMS Yeast Research 8:1155-63. 2008.

Berman, H.M. et al., The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), pp.235–42. 2000.

Bhosale, S. H.; Rao, M. B.; Deshpande, V. V. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. Microbiological Reviews, 60:280–300, 1996.

Billi, D; Potts, M. Life and death of dried prokaryotes. Research in microbiology **153**: 7-12. 2002.

Boeckmann, B. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research*, 31(1), pp.365–370. 2003.

Bopp, S.K., Minuzzo, M., Lettieri, T. The Zebrafish (Danio rerio): an Emerging Model Organism in the Environmental Field. Joint Research Centre. European Commission. EUR 22598. 2006.

Boudou, A., Ribeyre, F. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. Environ Health Perspect. 105(Suppl 1): 21–35. 1997.

Brat, D.; Boles, E.; Wiedemann, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in Saccharomyces cerevisiae. Applied And Environmental Microbiology, 75:2304–2311. 2009.

Briza, P., M. Breitenbach, A. Ellinger, and J. Segall. Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in Saccharomyces cerevisiae. Genes Dev. 4: 1775–1789. 1990.

Cai, Z.; Zhang, B.; Li, Y. Engineering Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: Reflections and perspectives. Biotechnol. J., 7:34–46, 2012.

Calahan, D; Dunham, M; Desevo, C; Koshland, DE. Genetic analysis of desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 2011.

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.

Caporaso, J., Kuczynski, J., and Stombaugh, J. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Genetics* 7, 335–336. 2010.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Método de Ensaio, Norma Técnica L6.401 “Solo – Teste de Toxicidade com *Eisenia foetica* (minhoca)”. São Paulo, 13 p., 1990.

CETESB. Guia de coleta e preservação de amostras de água. 1ªed. São Paulo, 155p. 1987.

Chakrabortee, S; Boschetti, C; Walton, LJ; Sarkar, S; Rubinsztein, DC; Tunnacliffe, A. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad

protein stabilization function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**:18073-18078. 2007.

Chandrakant, P.; Bisaria, V. S. Application of a Compatible Xylose Isomerase in Simultaneous Bioconversion of Glucose and Xylose to Ethanol. Biotechnol. Bioprocess Eng., 5: 32-39, 2000.

Chang, C.; Park, B. C.; Lee, D.; Suh, S. W. Crystal Structures of Thermostable Xylose Isomerases from Thermus caldophilus and Thermus thermophilus: Possible Structural Determinants of Thermostability. J. Mol. Biol., 288:623-634, 1999.

Chapman MD. Allergen Nomenclature. In “Allergens and Allergen Immunotherapy” 4th Edition. Editors, Richard F.Lockey, Dennis K.Ledford, pp 47-58. Informa Healthcare, New York. 2008.

Chapman, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. Marine pollution bulletin 44, 7-15. 2002.

Cheng, Z., and Menees, T. M. RNA branching and debranching in the yeast retrovirus-like element Ty1. *Science* 303, 240–3. 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2005.

Conde J, Fink G. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73:** 3651-3655. 1976.

Covitz PA, Herskowitz I, Mitchell AP. The yeast *RME1* gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by a1-alpha 2. Genes Dev **5**:1982-9. 1991.

Crowe, JH; Hoekstra, FA; Crowe LM, Anhydrobiosis. Annual Review of Physiology **54**: 579-599. 1992.

da Silva-Filho EA, Brito dos Santos SK, Resende ADM, de Morais JOF, de Morais MA, Ardaillon-Simões D. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. Antonie van Leeuwenhoek 88:13-23. 2005.

Davies, D. R.; Theodorou, M. K.; Lawrence, M. I.; Trinci, A. P. J. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. Journal of General Microbiology 139: 1395-1400, 1993.

DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G. L. Greengenes, a chimera-

checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology* 72, 5069–72. 2006.

Devine, S. E.; Boeke, J. D. Regionally specific, targeted integration of the yeast retrotransposon Ty1 upstream of genes transcribed by RNA polymerase III. Genes & Dev., 10: 620–633, 1996.

Dickinson, JR, Schweizer, M. The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae, 2a. edição, Philadelphia, PA: Taylor & Francis. 2004.

Ding, M.; Teng, Y.; Yin, Q.; Chen, W.; Zhao, F. Identification, expression, and characterization of the highly conserved D-xylose isomerase in animals. Acta Biochim Biophys Sin, 116–122, 2009.

EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solos. 2nd ed. Claessen, M. E. C.; Barreto, W. O.; Paula, J. L. de, and Duarte, M. N.Rio de Janeiro, RJ, Brazil: EMBRAPA; 212pp. 1997.

EVANGELISTA, José. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003.

Fink GR, Guthrie, C. Guide to yeast genetics and molecular biology – A. Ed. Academic Press. **194:** 94-110. 1991.

Foster, J. a, Bunge, J., Gilbert, J. a, and Moore, J. H. Measuring the microbiome: perspectives on advances in DNA-based techniques for exploring microbial life. *Briefings in bioinformatics* 13, 420–9. 2012.

Franca, MB; Panek, AD; Eleutherio, EC. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Cell stress & chaperones **10**: 167-170. 2005.

Friedl, A. A.; Kiechle, M.; Maxeiner, H. G.; Schiestl, R. H.; Eckardt-Schupp, F. Ty1 integrase overexpression leads to integration of non-Ty1 DNA fragments into the genome of Saccharomyces cerevisiae. Mol Genet Genomics, 284:231–242, 2010.

Gietz, R. D.; Woods, R. A. Genetic transformation of Yeast. BioTechniques, 30:816-831, 2001.

Goffeau, A., Barrell, B., Bussey, H., and Davis, R. Life with 6000 genes. *Science* 274, 546–567. 1996.

Griffith, G.W.; Oskoze, E.; Theodorou, M. K.; Davies, D. R. Diversity of anaerobic fungal population in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. Fungal Ecol. 2, 87–97, 2009.

Gueldener, U.; Heinisch, J.; Koehler, G. J.; Voss, D.; Hegemann, J. H. A second set of *loxP* marker cassettes for cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic acids research, 30, 2002.

Guerra, O. G., Rubio, I. G. S., Da Silva Filho, C. G., Bertoni, R. A., Dos Santos Govea, R. C., and Vicente, E. J. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in Saccharomyces cerevisiae chromosomes. *Journal of microbiological methods* 67, 437–45. 2006.

Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res. 24(13):2519-24. 1996.

Guttmann-Raviv N, Martim S, Kassir Y. Ime2, a meiosis-specific kinase in yeast, is required for destabilization of its transcriptional activator, Ime1. Mol Cell Biol 22(7):2047-56. 2002.

Ha S-J, Galazka JM, Kim SR, Choi J-H, Yang X, Seo J-H, Glass NL, Cate JHD, Jin Y-S. Engineered Saccharomyces cerevisiae capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:504-9. 2011.

Haber, J.E. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(1), pp.33–64. 2012.

Harhangi, H. R. Molecular studies of (Hemi-) cellulolytic enzymes from the anaerobic fungus Piromyces sp. E2. Ph.D. Thesis, Katholieke Universiteit Nijmegen, 2002.

Harhangi, H. R.; Akhmanova, A. S.; Emmens, R.; van der Drift, C.; de Laat, W. T. A. M.; van Dijken, J. P.; Jetten, M. S. M.; Pronk, J. T.; Op den Camp, H. J. M. Xylose metabolism in the anaerobic fungus Piromyces sp. strain E2 follows the bacterial pathway. Arch Microbiol, 180 : 134–141, 2003.

Harhangi, H. R.; Akhmanova, A. S.; Emmens, R.; van der Drift, C.; de Laat, W. T. A. M.; van Dijken, J. P.; Jetten, M. S. M.; Pronk, J. T.; Op den Camp, H. J. M. Xylose metabolism in the anaerobic fungus Piromyces sp. strain E2 follows the bacterial pathway. Arch Microbiol, 180 : 134–141, 2003.

Hauber, J.; Nelböck-Hochstetter, P.; Feldmann, H. Nucleotide sequence and characteristics of a Ty element from yeast. Nucleic Acids Research, 13(8):2715-2758, 1985.

Hepworth SR, et al. NDT80 and the meiotic recombination checkpoint regulate expression of middle sporulation-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 18(10):5750-61. 1998.

Herrero, E; Ros, J; Belli G; Cabiscol, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. Biochimica et biophysica acta **1780**: 1217-1235. 2008.

Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Jalaludin, S. The diversity and taxonomy of anaerobic gut fungi. Fungal Diversity 4: 37-51, 2000.

Hohmann, S. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters **583**: 4025-4029. 2009.

Huson, D., Mitra, S., and Ruscheweyh, H. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Research* 21, 1552–1560. 2011.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/FDIS 11268-1:2012.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/FDIS 17512-1:2007: Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei), Geneva, 2007.

Ivanciuc, O. et al., Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 54(3), pp.S11–19. 2009.

Ivanciuc, O., Schein, C.H. & Braun, W., SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Research*, 31(1), pp.359–362. 2003

Jensen RE, Sprague GFJr., Herskowitz I. Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of HO gene expression by the mating-type locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80:** 3035-3039. 1983.

Kassir Y, Adir N, Boger-Nadjar E, Raviv NG, Rubin-Bejerano I, Sagee S, Shenhar G. Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. Int Rev Cytol 224():111-71. 2003.

Kassir Y, Granot D, Simchen G. *IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. Cell **52**:853-62. 1988.

Kassir Y, Simchen G. Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating type locus. Genetics, **82:** 187–206. 1976.

Kassir Y, Simchen G. Mutations leading to expression of the cryptic HMRa locus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, **109**:481-492. 1985.

Kassir, Y; Simchen, G. Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating type locus. Genetics, **82**: 187–206. 1976.

Kassir, Y. Control of meiosis in yeast by the mating-type gene system. Ph.D. thesis, Hebrew University, Jerusalem, Israel. 1982.

Kawai, Y.; Konishi, H.; Horitsu, H.; Sakurai, H.; Takamizawa, K.; Suzuki, T.; Kawai, K. Purification and characterization of D-Xylose Isomerase from Bifidobacterium adolescentis. Biosci. Biotech. Biochem, 58(4), 691-694, 1994.

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

Kim, J. M.; Vanguri, S.; Boeke, J. D.; Gabriel, A.; Voytas, D. F. Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete Saccharomyces cerevisiae genome sequence. Genome Res., 8: 464-478, 1998.

Kittelmann, S.; Naylor, G. E.; Koolaard, J. P.; Janssen, P. H. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class Neocallimastigomycetes) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. PLoS ONE 7:5, 2012.

Klar AJS. Mating-type functions for meiosis and sporulation in yeast act through cytoplasm. Genetics, **94**:597-605. 1980.

Kondrashov, F. Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proceedings. Biological sciences* 279, 5048–57. 2012.

Krull, M., Barros, F. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. Vol 7, No 2. 2012.

Kuyper, M.; Harhangi, H. R.; Stave, A. K.; Winkler, A. A.; Jetten, M. S.; De Laat, W. T.; De Ridder, J. J.; Op Den Camp, H. J.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by Saccharomyces cerevisiae? FEMS Yeast Research, Delft, v.4, n.1, p.69–78, 2003.

Kuyper, M.; Hartog, M. M.; Toirkens, M. J.; Almering, M. J.; Winkler, A. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing Saccharomyces cerevisiae strain for rapid anaerobic xylose fermentation. FEMS Yeast Research, Delft, v.5, n.4, p.399–409, 2005a.

Kuyper, M.; Toirkens, M. J.; Diderich, J. A.; Winkler, A. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting Saccharomyces cerevisiae strain. FEMS Yeast Research, Delft, v.5, n.10, p.925–934, 2005b.

Kuyper, M.; Winkler, A. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Minimal metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. FEMS Yeast Research, Delft, v.4, n.6, p.655–664, 2004.

Ladics, G.S. & Selgrade, M.K. Identifying food proteins with allergenic potential: evolution of approaches to safety assessment and research to provide additional tools. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 54(3), pp.S2–6. 2009.

Lee, C., Lee, S., Shin, S. G., and Hwang, S. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with Escherichia coli. *Applied microbiology and biotechnology* 78, 371–6. 2008.

Lee, S.; Jellison, T.; Alper, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol, 2012.

Lehmacher, A.; Bisswanger, H. Isolation and characterization of an extremely thermostable D-xylose isomerase from Thermus aquaticus HB 8. Journal of General Microbiology, 136:679-686, 1990.

Lesage, P., and Todeschini, L. Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts. *Cytogenetic and genome research* 110, 70–90. 2005.

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.

Lynch M., Koskella B., Schaack S. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. Science 311: 1727–1730. 2006.

MacKay, VI; Manney, TR. Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of non-mating mutants. Genetics, **76**: 272–288. 1974.

Madhavan, A.; Tamalampudi, S.; Ushida, K.; Kanai, D.; Katahira, S.; Srivastava, A.; Fukuda, H.; Bisaria, V. S.; Kondo, A. Xylose isomerase from polycentric fungus Orpinomyces: gene sequencing, cloning, and expression in Saccharomyces cerevisiae for bioconversion of xylose to ethanol. Appl Microbiol Biotechnol 82:1067–1078, 2009.

Magni GE, von Borstel RC. Different rates of spontaneous mutation during mitosis and meiosis in yeast. Genetics 47: 1097–1108. 1962.

Maringele, L., and Lydall, D. “Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Budding Yeast Chromosomes,” in *Methods in Molecular Biology*, 65–73. 2006.

McGuire, Pettinger. Hygromycin I. Preliminary studies on the production and biological activity of a new antibiotic., *Antibiot. Chemother.* **3**: 1268-1278. 1953.

Meilleur, F.; Snell, E. H.; van der Woerd, M. J.; Judge, R. A.; Myles, D. A. A quasi-Laue neutron crystallographic study of D-xylose isomerase. Eur Biophys J, 35:601–609, 2006.

Meyer, F., Paarmann, D., D’Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, a, Stevens, R., Wilke. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics* 9, 386. 2008.

Mitchell AP, Herskowitz I. 1986. Activation of meiosis and sporulation by repression of the *RME1* product in yeast. Nature, **319**: 738–742.

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. Biotechnology Letters, 18:269-274, 1996.

Murakami, H., Borde, V., Nicolas, A., and Keeney, S. Gel Electrophoresis Assays for Analyzing DNA Double-Strand Breaks in Saccharomyces cerevisiae at Various Spatial Resolutions. *Methods in Molecular Biology* 557. 2011.

Nei, M. The new mutation theory of phenotypic evolution. Proc Nat Acad Sci USA 104: 12235–12242. 2007.

Neiman AM. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. **189**:737-65. 2011.

Nicholson, M. J.; Theodorou, M. K.;Brookman, J. L. Molecular analysis of the anaerobic rumen fungus Orpinomyces – insights into an AT-rich genome. Microbiology 151:121–133, 2005.

Nishant, K.T., Wei, W., Mancera, E., Argueso, J.L., Schlattl, A., Delhomme, N., Ma, X., Bustamante, C., Korbel, J.O., Gu, Z., Steinmetz, L.M., Alani, E. The Baker's Yeast Diploid Genome Is Remarkably Stable in Vegetative Growth and Meiosis. PLoS Genetics 6: 1-5. 2010.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Nº 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 9p. 1984.

Orpin, C. G. Studies on the rumen flagellate Neocallimastix frontalis. Journal of General Microbiology 91: 249-262, 1975.

Orpin, C. G.; Bountiff, L. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete Neocallimastix frontalis. J. Gen. Microbiol, 104:113-122, 1978.

Pace, N. R. Mapping the tree of life: progress and prospects. *MMBR* 73, 565–76. 2009.

Parachin, N. S.; Gorwa-Grauslund, M. F. Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library. Biotechnology for Biofuels, 4:9, 2011.

Patel, D. H.; Cho, E. J.; Kim, H. M.; Choi, I. S.; Bae, H. Engineering of the catalytic site of xylose isomerase to enhance bioconversion of a non-preferential substrate. Protein Engineering, Design & Selection, 25:331–336, 2012.

Pearson, W.R. & Lipmant, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. *PNAS*, 85, pp.2444–2448. 1988.

Perlman, P. S., and Boeke, J. D. Molecular biology. Ring around the retroelement. *Science* 303, 182–4. 2004.

Pierce M, Benjamin KR, Montano SP, Georgiadis MM, Winter E, Vershon AK. Sum1 and Ndt80 proteins compete for binding to middle sporulation element sequences that control meiotic gene expression. Mol Cell Biol 23(14):4814-25. 2003.

Pinto, Teresinha de Jesus Andreoli, ET AL. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2ª Ed, Editora Atheneu – 2003.

Potts, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiological reviews **58**: 755-805. 1994.

Qiu, X.; Selinger, B.; Yanke, L. J.; Cheng, K. J. Isolation and analysis of two cellulase cDNAs from Orpinomyces joyonii. Gene, 245:119–126, 2000.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glöckner, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research* 41, D590–6. 2013.

Ratnakumar, S; Tunnacliffe, A. Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. FEMS Yeast Research **6**: 902-913. 2006.

Rattray AJ, McGill CB, Shafer BK, Strathern JN. Fidelity of mitotic double-strand-break repair in Saccharomyces cerevisiae: a role for SAE2/COM1. Genetics 158: 109–122. 2001.

Reinecke, A.J., Maboeta, M.S., Vermeulen, L.A., Reinecke, S.A. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 68, 779– 786. 2002.

Rifkin SA, Houle D, Kim J, White KP. A mutation accumulation assay reveals a broad capacity for rapid evolution of gene expression. Nature 438: 220–223. 2005.

Rine J, Sprague GFJr, Herskowitz I. rme1 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*: map position and bypass of mating type locus control of sporulation. Molecular Cell Biology, 1:958-60. 1981.

Rine JD, Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, **116**: 9-22. 1987.

Roman, H; Sands, S. Heterogeneity of clones of *Saccharomyces* derived from haploid ascospores Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **39**: 171–179. 1953.

Sanchez, S.; Smiley, K. L. Properties of D-Xylose Isomerase from Streptomyces albus. Applied Microbiolgy, 29:745-750, 1975.

Sarthy, A. V.; McConaughy, B. L.; Lobo, Z.; Sundstrom, J. A.; Furlong, C.E.; Hall, B. D. Expression of the Escherichia coli xylose isomerase gene in Saccharomyces cerevisiae. Appl Environ Microbiol, 53:1996-2000, 1987.

Schacherer, J., De Montigny, J., Welcker, A., Souciet, J.-L., and Potier, S. Duplication processes in Saccharomyces cerevisiae haploid strains. *Nucleic acids research* 33, 6319–26. 2005.

Schacherer, J., Tourrette, Y., Souciet, J.-L., Potier, S., and De Montigny, J. Recovery of a function involving gene duplication by retroposition in Saccharomyces cerevisiae. *Genome research* 14, 1291–7. 2004.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. a, Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 75, 7537–41. 2009.

Shirkey, B; McMaster, NJ; Smith, SC; Wright, DJ; Rodriguez, H; Jaruga, P; Birincioglu, M; Helm, RF; Potts, M. Genomic DNA of *Nostoc commune* (cyanobacteria) becomes covalently modified during long-term (decades) desiccation but is protected from oxidative damage and degradation. Nucleic Acids Research, **31**:2995-3005. 2003.

Sikorski, R., and Hieter, P. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. 1989.

Silva, Neuseli ET AL. Manual de métodos de análise de alimentos e água. 4ª. Ed, Editora Varela – 2010.

Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms -- Part 1: Determination of acute toxicity to Eisenia fetida/Eisenia andrei. 2012.

Sprengel, C. Chemie für Landwirte, Forstmanner und Cameralisten Part I. Vandenhouk und Ruprecht, Göttingen, FRG, 1832.

Srinivasarao, G.Y. et al. PIR-ALN: a database of protein sequence alignments. *Bioinformatics*, 15(5), pp.382–90. 1999.

Sriprapundh, D.; Vieille, C.; Zeikus, J. G. Directed evolution of Thermotoga neapolitana xylose isomerase: high activity on glucose at low temperature and low pH. Protein Engineering, 16:683-690, 2003.

Steenbakkers, P. J. M.; Irving, J. A.; Harhangi, H. R.; Swinkels, W. J. C.; Akhmanova, A.; Dijkerman, D., Jetten, M. S. M.; van der Drift, C.; Whisstock, J. C.; op den Camp, H. J. M. A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus Piromyces sp. strain E2. Mycological research, 112:999-1006, 2008.

Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In: MAYER, F.L.; HAMELINK, J.L.

eds. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: First Symposium. ASTM - STP 634. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1977.

Strathern, JN; Hicks, J; Herskowitz, I. Control of cell type in yeast by the mating type locus. J. Mol. Biol., **147**: 357–372. 1981.

Teunissen A, Dumortier F, Gorwa M, Bauer J, Tanghe A, Lopez A, Smet P, Van Dijck P, Thevelein JM. Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs. Applied and Environmental Microbiology, **68:** 4780-4787. 2002.

Theodorou, M. K.; Lowe, S. E.; Trinci, A. P. J. Anaerobic fungi and the rumen ecosystem. In The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem, 2nd edn (ed. G. C. Carroll &: D. T. Widdow), pp. 43-72. Marcel Dekker: New York, 1992.

Trinci, A. P. J.; Davies, D. R.; Gull, K.; Lawrence, M. I.; Nielson, B. B.; Rickers, A.; Theodorou, M. K. Anaerobic fungi in herbivorous animals. Mycol. Res. 98:129-152, 1994.

Tunnacliffe, A; Wise, MJ. The continuing conundrum of the LEA proteins. Die Naturwissenschaften **94**: 791-812. 2007.

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.

Van Dijken, J.P., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J.M., Gancedo, C., Giuseppin, M.L., Heijnen, J.J., Hoare, M., Lange, H.C., Madden, E.A., Niederberger, P., Nielsen, J., Parrou, J.L., Petit, T., Porro, D., Reuss, M., van Riel, N., Rizzi, M., Steensma, H.Y., Verrips, C.T., Vindelov, J. and Pronk, J.T. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four Saccharomyces cerevisiae strains. Enzym. Microb. Technol. 26, 706–714, 2000.

van Maris AJ, Abbott, DA, Bellissimi, E, van den Brink, J, Kuyper, M, Luttik, MA, Wisselink, HW, Scheffers, WA, van Dijken, JP, Pronk, JT. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status. Antonie Van Leeuwenhoek, v.90, n.4, p.391-418. 2006.

van Maris, A. J. A.; Winkler, A. A.; Kuyper, M.; de Laat, W. T. A. M.; van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Development of Efficient Xylose Fermentation in Saccharomyces cerevisiae: Xylose Isomerase as a Key Component. Adv Biochem Engin/Biotechnol, 108: 179–204, 2007.

Verghese, J; Abrams, J; Wang, Y; Morano, KA. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (Saccharomyces cerevisiae) as a

Model System. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR **76**: 115-158. 2012.

Vershon, A.K. & Pierce, M., Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Current opinion in cell biology*, 12(3), pp.334–9. 2000.

Vieille, C., Hess, J. M., Kelly, R. M., Zeikus, J. G. xylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from Thermotoga neapolitana. Appl Environ Microbiol 61:1867–1875, 1995.

Walfridsson, M.; Bao, X.; Anderlund, M.; Lilius, G.; Bulow, L.; Hahn-Hägerdal, B. Ethanolic fermentation of xylose with Saccharomyces cerevisiae harboring the Thermus thermophilus xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.62, n.12, p.4648–4651, 1996.

Wang, C., Krishnakumar, S., Wilhelmy, J., Babrzadeh, F., Stepanyan, L., Su, L. F., Levinson, D., Fernandez-Viña, M. a, Davis, R. W., Davis, M. M., et al. High-throughput, high-fidelity HLA genotyping with deep sequencing. *PNAS* 109, 8676–81. 2012.

Wheeler, D.L. et al., Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*, 35(Database issue), pp.D5–12. 2007.

WHO. Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. In Rome. 2001.

WHO. *Report of the fourth session of the CODEX ad hoc intergovernamental task force on foods derived from biotechnology*. 2003

WHO. *Report of the seventh session of the CODEX ad hoc intergovernamental task force on foods derived from biotechnology*. 2007

Wixon, J. *Danio rerio*, the zebrafish. Yeast, 17: 225-231. 2000.

Zhang, H., Zeidler, A. F. B., Song, W., Puccia, C. M., Malc, E., Greenwell, P. W., Mieczkowski, P. A., Petes, T. D., and Argueso, J. L. Gene copy number variation (CNV) in haploid and diploid strains of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. 2013.