



APLICAÇÃO DE NORMAS DE BIOSSEGURANÇA NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE FARNESENO

GABRIEL ALVES DE JONG

Projeto de Final de Curso

Orientadores:

Prof. Maria Antonieta Gimenes Couto, D. Sc.

Prof. Andrea Salgado Medeiros, D. Sc.

Agosto de 2018

APLICAÇÃO DE NORMAS DE BIOSSEGURANÇA NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE FARNESENO

Gabriel Alves de Jong

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Prof. Carlos André Vaz Junior, D. Sc., EQ/UFRJ

Prof. Élcio Ribeiro Borges, D. Sc., EQ/UFRJ

Farm^a. Roberta Giovanini Busnardo, D. Sc.

Orientado por:

Prof^ª. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, D. Sc.

Prof^ª. Andrea Medeiros Salgado, D. Sc. – Co-Orientador

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Agosto de 2018

Ficha Catalográfica

De Jong, Gabriel Alves

Aplicação de normas de Biossegurança na produção industrial de farneseno / Gabriel Alves De Jong. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2018.

xiii, 91p., il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2018.

Orientadores: Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto e Andrea Medeiros Salgado.

1. Biossegurança. 2. Organismos geneticamente modificados. 3. Farneseno. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto. 6. Andrea Medeiros Salgado. I. Aplicação de normas de Biossegurança na produção industrial de farneseno

Dedico esse trabalho aos meus avós Célia D'Orsi Alves e Celso D'Orsi Alves.

“Knowing is not enough; we must apply.

Willing is not enough; we must do.”

GOETHE, J. W.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus Mestres, Orientadores que me louvaram com seus conhecimentos.

Agradeço à minha família que me acolheu nos momentos que mais precisei.

Agradeço todo o corpo técnico da Escola de Química, GESTORE e PRH-41 por sua atenção e trabalho.

Agradeço à Biol^a. Kelly Seligman, M. Sc., e à Biol^a. Bianca Curzio, M. Sc., da Amyris Brasil Ltda por disponibilizarem do seu tempo, atenção e, especialmente, pela oportunidade de visitar as instalações para enriquecimento do meu projeto final e conhecimento de vida.

APLICAÇÃO DE NORMAS DE BIOSSEGURANÇA NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE FARNESENO

Gabriel Alves De Jong

Orientadores: Prof^ª Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, D. Sc.

Prof^ª Andrea Medeiros Salgado, D. Sc.

A intensificação do uso da biotecnologia levou a preocupação com normas, protocolos e procedimentos de biossegurança, cada vez mais presentes no trabalho diário, nas mais diversas áreas. Na produção de biocombustíveis, por exemplo, os organismos geneticamente modificados (OGM) têm cada vez mais se tornado presentes não só em laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), mas também em plantas industriais. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), biossegurança é a “Condição de segurança alcançada por um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e o meio ambiente” (ANVISA, 2015). No Brasil foi criada a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) que regulamenta as atividades envolvendo o uso de OGM. A CTNBio estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre os centros de estudo e empresas que façam uso de OGM e seus derivados. Tem sido descoberto que biomoléculas possuem potencial aplicação na composição de combustível como alternativa renovável aos compostos de fontes fósseis. Dentre essas, ganha destaque na última década os isoprenóides, tais como o farneseno, molécula comum de plantas e insetos (AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC., 2007). Essa foi a motivação para especialistas em Biologia Sintética construírem OGM capazes de sintetizar farneseno, um precursor de biocombustíveis. Nesse contexto, a rota biotecnológica de produção de farneseno aplicando OGM necessita adequação ao que é estabelecido pela lei 11.105 de 2005 (BRASIL, 2005). O objetivo do trabalho desenvolvido, dentro das linhas da ênfase em Segurança, Meio Ambiente e Saúde (SMS) do Programa de Recursos Humanos N° 41 (PRH41), foi avaliar as normas vigentes de Biossegurança e sua aplicação no processo produtivo de obtenção de farneseno usando cepa de levedura geneticamente modificada para o caso de uma empresa em específico. Foi possível avaliar a adequação da empresa às normas em vista dos documentos técnicos disponíveis, da visita técnica realizada e do questionário respondido.

Palavras-chave: Biossegurança, organismos geneticamente modificados, farneseno.

ABSTRACT

The increase use of biotechnology has raised the concern regarding guidelines, protocols and procedures of biosafety, more present in daily work in many different areas. As an example, in the biofuel production area, genetically modified organisms (GMO) have become more present in research and development (R&D) laboratories, and also in industrial facilities. According to the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA), biosafety is the "Safety condition achieved by a set of actions aimed at preventing, controlling, reducing or eliminating risks inherent in activities that could compromise human, animal and environmental health" (ANVISA, 2015). In Brazil was created the National Technical Biosafety Commission (CTNBio) which regulate GMO use activities. The CTNBio establishes safety guidelines and surveillance methods for research institutions and companies using GMO and their derivatives. It has been found that biomolecules have potential application as fuel components as an renewable alternative to fossil fuels compounds. Among these, isoprenoids have gained attention in the last decade, such as farnesene, a common molecule in plants and animals (AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC., 2007). This was the main motivation for Synthetical Biology specialists to craft GMO able to synthesize farnesene, a a biofuel precursor. In this context, the biotechnological production pathway of farnesene applying GMO requires compliance within established by the law 11.105 of 2015. The objective of the developed work, within the lines of the Health, Safety and Environment (HSE) from the Human Resource Program N°41 (PRH41) emphasis, is to evaluate the application of biosafety requirements and protocols in the industrial production of biofuels produced by using GMO strain of a specific company. It was possible to assess conformity of the company to the legal requirements through disclosed technical reports, technical visitation and completion of a checklist.

Keywords: Biosafety, genetically modified organisms, farnesene

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	14
1.1	INTRODUÇÃO	14
1.2	OBJETIVOS	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	BIOTECNOLOGIA	18
2.2	BIOCOMBUSTÍVEIS	25
2.3	BIOSSEGURANÇA	33
3	METODOLOGIAS.....	45
3.1	ESTUDO DE CASO DA PRODUÇÃO DE FARNESENO	45
3.2	ANÁLISE DO ESTUDO DE CASO	50
3.3	VISITA TÉCNICA EM UNIDADE PRODUTIVA DE FARNESENO	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA	56
4.2	AVALIAÇÃO TÉCNICA DA EMPRESA	64
4.3	AVALIAÇÃO DO QUESTIONÁRIO	76
4.4	AVALIAÇÃO DA VISITA TÉCNICA.....	79
4.5	DISCUSSÕES.....	81
5	CONCLUSÃO	83
5.1	CONCLUSÕES	83
5.2	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
5.3	SUGESTÕES DE ESTUDOS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de obtenção de bioquerosene	29
Figura 2 - Diagrama de blocos do hidrocessamento.....	30
Figura 3 – Diagrama de blocos da conversão direta de açúcares em hidrocarbonetos.....	31
Figura 4 – (a) Número de patentes e artigos por derivado de farneseno (b) e áreas de aplicação em patentes (em cima) e em artigos (em baixo).	47
Figura 5 - Representação molecular da estrutura do β -Farneseno	31
Figura 6 - Árvore de Produtos do Farneseno	58
Figura 7 – Diagrama de blocos simplificado da produção de farneseno	59
Figura 8 – Escalas de produção existentes atualmente na AMYRIS BRASIL LTDA.....	61
Figura 9 – Matérias primas utilizadas na unidade piloto americana (AMYRIS, 2009).....	62
Figura 10 -Fluxograma em Gestão de Segurança de Processos.....	64
Figura 11 - Equipamento UHT (esquerda) e destilador (direita)	67
Figura 12 - Pictogramas da FISPQ do ácido fosfórico	68
Figura 13 - Pictogramas da FISPQ da amônia.....	69
Figura 14 - Pictogramas da FISPQ do farneseno	71
Figura 15 - Esboço da planta piloto	80
Figura 16 - Símbolo de Biossegurança	81
Figura 17 - Etapas químicas da obtenção de esqualano.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representatividade da Amyris, Inc. na literatura de patentes.....	48
Tabela 2 - Lista de utilidades da planta.....	63
Tabela 3 - Nível de ruído e tempo máximo diário permitido (minutos).....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo de pleitos da CTNBio em 2015	21
Quadro 2 - Classes de Risco dos Agentes Biológicos	39
Quadro 3 - Equipamentos de proteção individual e suas características	43
Quadro 4 - Matriz Escopo para Busca Patentária de Farneseno	46
Quadro 5 – Matriz Escopo para Busca de Artigos de Farneseno.....	46
Quadro 6 – Questionário tipo <i>checklist</i> para avaliação de Biossegurança.....	53
Quadro 7 - Definição do cenário a partir dos resultados do estudo de caso	65
Quadro 8 - Temperaturas limites para ambiente de trabalho por tipo de atividade	67

SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas ANBIO – Agência Nacional de Biossegurança

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CIBio – Comissão interna de Biossegurança

CIPA - Comissão Interna de Prevenção de Acidentes

CNBS - Conselho Nacional de Biossegurança

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQB - Certificado de Qualidade em Biossegurança

CSB – Cabine de Segurança Biológica

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECHA - European Chemical Agency

EPC – Equipamento de Proteção Coletiva

EPI – Equipamento de Proteção Individual

FT - Fischer Tropsch

FUNDACENTRO - Fundação de Segurança e Medicina do Trabalho

HEPA - High Efficiency Particulate Air

MCTIC - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

MGM – Microrganismo Geneticamente Modificado

MS – Ministério da Saúde

MTE – Ministério do Trabalho e Emprego

NB – Nível de Biossegurança

NIH – National Institutes of Health

NIOSH – Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional

NR - Norma Regulamentadora

OGM – Organismos Geneticamente Modificados

OMS – Organização Mundial de Saúde

OSHA - Occupational Safety and Health Administration

PRH41 – Programa de Recursos Humanos Nº41

PPRA - Programa de Prevenção de Riscos Ambientais

PVC - Cloreto de Polivinila

PtD – Prevenção mediante Projeto

RNA – Ácido ribonucleico

SKA - Querosene Parafínico Sintético com Aromáticos

SIP - Isoparafinas Sintetizadas

SMS – Segurança, Meio ambiente e Saúde

SPK - Querosene Parafínico Sintético

UHT – Ultra High Temperature

WHO – Organização Mundial da Saúde

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Uma breve análise da história da Biossegurança revela que o seu processo de construção e institucionalização estão amplamente associados ao uso da tecnologia do DNA/RNA recombinante na produção em laboratórios de OGM no início da década de 1970. Em 1974, iniciou-se debates entre cientistas para cessar pesquisas com a tecnologia de DNA recombinante até que se fosse entendido o risco potencial atrelado a tal.

Em fevereiro de 1975, a Conferência de Asilomar na Califórnia teve como proposta conscientizar os cientistas e as instituições sobre a adoção de medidas de segurança requeridas nos trabalhos dos laboratórios, que manipulavam o DNA recombinante. Foi colocado que, “... enquanto não fossem devidamente avaliados os riscos em potencial das moléculas de DNA recombinante, e até que pudessem ser criados métodos adequados para prevenir sua propagação, os cientistas de todo o mundo deviam voluntariamente abandonar alguns experimentos”. Segundo os cientistas participantes de Asilomar, “um dos maiores riscos biológicos é a falta de conhecimento” (RIZZO, 2009 apud BUSNARDO, 2011).

Como resultado da Convenção de Asilomar, foram esboçadas normas preliminares para a pesquisa com OGM, concretizadas e publicadas em 1976 pelo National Institutes of Health (NIH). Outras práticas são procedimentos comuns antecedentes à leis descritos em documentos denominados de boas práticas de fabricação (BPF) e de laboratório (BPL). O trabalho laboratorial exercido, por qualquer pessoa, de forma adequada e bem planejada, previne a exposição indevida a agentes causadores de riscos a saúde e evita acidentes, sendo, portanto, englobado pelas ações de Biossegurança.

Apesar de serem mais específicas do que as experiências de melhoramento genético convencional, as modificações de genes por recombinação requerem um número bastante alto de provas e tentativas de reprodução de indivíduos, microrganismos, insetos, plantas e animais. Essas práticas, ao contrário do que se divulga, não são intervenções absolutamente precisas para incorporação de genes quiméricos em organismos vivos; são tentativas mais dirigidas que o cruzamento convencional de plantas e animais podendo gerar indivíduos fenotipicamente normais, porém com funções fisiológicas alteradas. Isto explica os cuidados minuciosos que se deve ter com

o correto manuseio e destino dos resíduos, a fim de evitar acidentes de contaminação de pessoas e animais bem como desastres ecológicos.

Entre as décadas de 70 e 80 ocorreram formalizações da Biossegurança que incluíam: (RIZZO, 2009 apud BUSNARDO, 2011).

- ✓ Criação de responsabilidades legais voltadas para as instituições;
- ✓ Construção de políticas institucionais que primam pela segurança dos trabalhadores no seu ambiente de trabalho, enfatizando também a integridade e a qualidade ambiental, mediante a observância de normas;
- ✓ Reafirmação da Biossegurança como reguladora de práticas preventivas para o trabalho em contenção de risco em laboratórios que trabalhavam com agentes patogênicos para o homem (Organização Mundial de Saúde - OMS);
- ✓ Incorporação pela OMS da definição de Biossegurança aos chamados riscos periféricos presentes em ambientes laboratoriais que trabalham com agentes patogênicos para o homem, considerando também os riscos químicos, físicos, radioativos e ergonômicos (surgia a tríplice – Biossegurança, saúde do trabalhador e saúde ambiental).

A Biossegurança é uma medida introduzida no Brasil no século XX, voltada para o controle e a minimização de riscos advindos da prática de diferentes tecnologias, seja em laboratório ou quando aplicadas ao meio ambiente. O Brasil conta com uma legislação de biossegurança desde 1995, com a entrada em vigor da Lei 8.974/95, que estabeleceu normas de biossegurança para regular a manipulação e o uso de organismos geneticamente modificados (OGM) no país.

Dez anos depois, essa lei foi substituída por uma nova, a Lei de Biossegurança 11.105/05, que atualizou os termos da regulação de OGM no Brasil, incluindo pesquisa em contenção, experimentação em campo, transporte, importação, produção, armazenamento e comercialização. (BRASIL, 2005) Antes de ser sancionado, esse projeto de lei tramitou no Congresso Nacional por dois anos, sob o nº 2.401/03, e foi amplamente discutido por toda a sociedade civil, incluindo cientistas, membros de organizações não governamentais (ONG), do Governo Federal e do Ministério Público, entre outros. (CIB, 2016)

Ao longo desse processo, ocorreram várias audiências públicas, quando foram ouvidas as observações de todas as representações. Após o período de debates, em 2005, o projeto foi

convertido definitivamente na Lei de Biossegurança , que atualmente regula o uso da biotecnologia no país. Por conta de todos essas etapas e cuidados, o processo regulatório brasileiro é reconhecido internacionalmente como um dos mais rígidos e completos do mundo (CIB, 2016).

A Lei de Biossegurança regulamenta as diretrizes para o controle das atividades e produtos originados pela tecnologia do DNA recombinante. Estabelece ainda que compete aos órgãos de fiscalização do Ministério da Saúde, do Ministério da Agricultura e do Ministério do Meio Ambiente a fiscalização e a monitorização das atividades com OGM, bem como a emissão de registro de produtos contendo OGM ou derivados, a serem comercializados ou liberados no ambiente. Além, da criação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), integrante do Ministério da Ciência e Tecnologia, responsável por acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico nas áreas de Biossegurança, Biotecnologia e afins (BRASIL, 2005).

A legislação brasileira é densa para tratar do assunto de OGM. Além da lei 11.105/2005, é necessário o conhecimento dos documentos legais, que normatizam as atividades laboratoriais. Entre eles: Legislação geral, Normas Brasileiras (NBR), Normas Regulamentadoras de Segurança e Saúde no Trabalho (NR) e Legislação em Biossegurança específica para o trabalho com OGM (FIOCRUZ, 2010).

Empresas de capital privado da área de Biotecnologia de países como Europa e EUA, apoiadas com base em uma plataforma química e biotecnológica avançada, desenvolvem atividades com OGM no Brasil. O uso de OGM é uma área um tanto vital para o empreendimento dessas atividades, portanto o entendimento das leis que as regem tem sido uma demanda dos produtores. Desta forma, é importante que nas indústrias haja condições mínimas de segurança, visando garantir a saúde de seus funcionários. Ainda hoje a Biossegurança é bastante negligenciada, até mesmo pelos responsáveis técnicos de segurança, portanto é necessário que haja o conhecimento das suas normas e as medidas aplicáveis a cada tipo de ambiente de trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

- ✓ Avaliar as normas vigentes de Biossegurança em âmbito industrial;
- ✓ Aplicar normas de Biossegurança no processo produtivo de obtenção de farneseno usando levedura geneticamente modificada no caso específico de uma empresa.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar levantamento do arcabouço regulatório de Biossegurança do Brasil;
- ✓ Realizar estudo do processo industrial de produção de farneseno da empresa escolhida;
- ✓ Realizar avaliação in loco de uma planta industrial de farneseno da empresa escolhida;
- ✓ Realizar avaliação técnica por meio de questionário da gestão em biossegurança na empresa escolhida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOTECNOLOGIA

A Biotecnologia viveu três grandes gerações até a atualidade. Apesar de ser considerada uma “nova ciência”, a primeira geração tem seu início na Antiguidade, cerca de 2000 a.C., com o início de processos fermentativos tradicionais, e se estendeu até o final do século XIX. Essa geração é marcada pela arte de cruzar espécies de plantas e animais, uso de leveduras e técnicas de fermentação de pão e álcool (PEREIRA JR, ANTUNES, EBOLE, 2006).

Após Pasteur, foi possível conhecer a ação microbiana nas fermentações e selecionar aplicações úteis na produção de vacinas e antibióticos. A esse período, do fim do século XIX até o início do século XX, foi chamado de segunda geração, onde o grande marco foi a descoberta do DNA em 1944 por Macleod e McCarty, e posteriormente, a identificação da estrutura helicoidal do mesmo por Watson e Crick em 1953 (PEREIRA JR, ANTUNES, EBOLE, 2006).

A terceira geração, que começou em 1970 e se estende até hoje, contou com descobertas na área de Biologia Molecular. Bayer e Cohen descobriram a possibilidade de isolamento e inserção de um gene de um organismo no genoma de outro organismo, a base da tecnologia de DNA combinante. Nos anos seguintes, por intermédio dessa tecnologia, diversas combinações foram feitas em busca de reprogramar microrganismos, plantas e animais para fins de interesse das indústrias química, farmacêutica e de alimentos (PEREIRA JR, ANTUNES, EBOLE, 2006). A essa terceira geração se denomina Biotecnologia moderna que é considerada uma das “novas ciências”.

As tecnologias emergentes surgem das aplicações das “novas ciências”, como Tecnologia da Informação (TI), Nanotecnologia e Biotecnologia, por meio de P&D por profissionais e estudiosos das respectivas áreas. As empresas emergentes e com potencial de crescimento futuro dependem do entrosamento com pelo menos alguma dessas tendências. Por serem áreas de conhecimento pouco exploradas existem muitas oportunidades e possíveis inovações a serem descobertas, em especial a biotecnologia.

O termo Biotecnologia se refere à aplicação de organismos vivos e seus componentes celulares, subcelulares e moleculares para criar produtos e processos. (BRAUER *et al.*,1995), cabendo ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos os profissionais de Biotecnologia e aos processos biotecnológicos os profissionais de Engenharia de Bioprocessos. Outra possível definição

de Biotecnologia é a “aplicação de fundamentos científicos e princípios de engenharia para processamento de materiais por agentes biológicos, i.e., utilizar organismos vivos para manufaturar produtos de aplicação industrial.” (EUROPABIO, s.d.)

2.1.1 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGM)

Experimentos com fragmentos de DNA recombinados *in vitro* reintroduzidos em células foram realizados há 45 anos atrás (JACKSON *et al.*, 1972; COHEN *et al.*, 1973). Os resultados obtidos desses junto com diversas outras descobertas em ciências biológicas, ciências da computação, química e física permitiram o desenvolvimento da engenharia genética moderna. Tal área relaciona procedimentos de Biologia, Genética, Química, Bioquímica e Física para caracterizar, modificar, sintetizar e transferir material genético.

Inicialmente, a seleção das sementes era realizada apenas por meio de técnicas convencionais, como o cruzamento entre plantas. Com o passar dos anos, descobriu-se como as características são passadas de uma geração para outra e qual o papel da genética neste processo. As técnicas foram aprimoradas e as descobertas tornaram-se cada vez mais detalhadas. Os novos métodos utilizados permitiram que os genes fossem transferidos sem a reprodução sexual. A tecnologia que permitiu esse avanço ficou conhecida por Engenharia Genética.(BRONDANI, 2018)

Dessa maneira, um OGM pode ter (CIB, 2018):

- ✓ a adição de um gene proveniente de uma espécie não sexualmente compatível (transgênico);
- ✓ a adição de um gene de uma espécie com a qual poderia haver um cruzamento (cisgênico); e/ou
- ✓ um ou mais de seus genes deletados.

A legislação brasileira diz que, independentemente da origem do material genético, todo o organismo que tiver seu DNA modificado por meio de qualquer técnica de Engenharia Genética é considerado um OGM. Essa modificação pode ou não inserir um gene externo no DNA do organismo. A técnica contribui para desenvolver organismos com características de interesse específico a exemplo de cor, tamanho, velocidade de crescimento, etc (BRASIL, 2005).

Segundo relatório anual de 2015 da CTNBio, a grande maioria dos organismos geneticamente modificados que existem hoje são microrganismos, entretanto o foco dos estudos está nas plantas geneticamente modificadas, em maioria, transgênicas (CTNBio, 2015). Tal fato gera preocupação visto que há maior ocupação, exposição no meio ambiente e o uso para alimentação da população de plantas.

A Biotecnologia facilitou o manejo e aumentou a produtividade no campo. Grande parte do algodão, do milho e da soja brasileiros é geneticamente modificada e colabora para que o País fortaleça sua agricultura. As avaliações de segurança dos transgênicos seguem padrões internacionais definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/ONU), entidades que já manifestaram apoio aos alimentos derivados de OGM.

No Brasil o órgão responsável por avaliar OGM é a CTNBio, sendo um órgão colegiado de assessoramento do Governo Federal, com funções consultiva e deliberativa para assuntos que envolvam uso de tecnologias do DNA Recombinante definidas pela Lei de Biossegurança. Em 2015, foram submetidos 1150 requerimentos, como pode ser visto no Quadro 1 abaixo. Dentre esse total, parte se encontra em trâmites legais ou sob diligência para decisão da CTNBio. Dentre as ações tomadas pelo órgão estão deferimento, e indeferimento, remoção de pauta e arquivamento.

Quadro 1 - Resumo de pleitos da CTNBio em 2015

Pleitos	Deferido	Retirado de Pauta	Diligência	Arquivado	Indeferido	TOTAL
Liberação comercial	22	15	2	0	0	39
Plano de Monitoramento Pós-liberação Comercial	18	10	2	0	0	30
Relatório de Monitoramento Pós-liberação Comercial	1	10	1	0	0	12
Solicitação/Extensão/Cancelamento e Revisão de CQB	185	23	0	0	2	210
Alteração de CIBio	120	0	0	0	0	120
Projetos de Pesquisa Setorial Humana e Animal	72	13	2	0	0	87
Transporte de OGM	2	0	0	0	0	2
Importação/Exportação	4	2	0	0	0	6
Liberação Planejada no Meio Ambiente	103	40	1	0	2	146
Alteração de Processos de Liberação Planejada no Meio Ambiente	31	4	0	0	0	35
Relatório de Liberação Planejada no Meio Ambiente	94	127	0	0	0	221
Relatório Anual	203	38	0	0	1	242
TOTAL	856	282	8	0	5	1150

Fonte: CTNBIO, 2015

2.1.2 A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo comumente utilizado em panificação e fermentação de cerveja e vinho. No Brasil, a maior aplicação é no Setor Sucroalcooleiro. *S. cerevisiae* pertence a classe dos fungos, mais especificamente, fungos unicelulares. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro organismo utilizado pelo homem para processar alimentos e gerar comestíveis representando a Biotecnologia mais antiga, possuindo

aplicação conhecida desde a Antiguidade, havendo referências de seu uso já em EXODUS 12 e 13 (FLORES, *et al.*) e em sítio de uma aldeia neolítica chinesa, onde jarros com uma bebida fermentada de arroz, mel e frutas com 9.000 anos de idade foram encontrados. (MCGOVERN *et al.*, 2004).

Além do seu papel na produção de alimentos, esta levedura está sempre à nossa volta, presente em cascas de frutas e superfícies de grãos. Sua segurança e importância industrial é grande, já que é responsável pelos cinco (5) principais produtos industriais derivados de fermentação: cerveja, vinho, proteína celular, levedura de panificação e ácido cítrico. Seu efeito como probiótico na alimentação humana e animal foi comprovado em vários estudos (GAIOTO, 2005; CABALLERO-CORDOBA e SGARBIERI, 2000).

A levedura tem sido também muito usada na alimentação animal, como fonte de proteína e outros nutrientes. Na alimentação humana, a levedura tem sido utilizada na forma de derivados, como aromatizante, para realçar sabor e como complemento nutritivo, possuindo proteína de alta qualidade, rica em lisina, vitaminas do complexo B e minerais importantes como selênio e zinco além de fonte de fibras, representadas por mananas e glicanas da parede celular. Mesmo leveduras modificadas por engenharia genética já foram aprovadas para o consumo humano na produção de vinho nos EUA e Canadá e no Reino Unido para a produção de cerveja e pão (ALDHOUS, 1990; DEQUIN, 2001).

Como consequência de suas facilidades de cultivo e manipulação genética, tanto para genes nucleares como mitocondriais, a levedura *S. cerevisiae* tornou-se o organismo cientificamente mais bem estudado e caracterizado dentre todos os eucariotos, tendo sido o primeiro deles a ter seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU, 1996) e sendo considerado um eucarioto unicelular modelo para pesquisas. Há mais de dez anos temos disponível uma coleção de cepas de *S. cerevisiae*, cada uma delas contendo uma mutação específica em um de seus 6.000 genes, permitindo estudos de função gênica de grande interesse (BRACHMANN, 1998).

Sua patogenicidade era considerada nula até que casos muito raros de presença de *S. cerevisiae* foram descritos em isolados clínicos de indivíduos com extrema deficiência imunológica. Também há raros relatos de alergia principalmente em trabalhadores em panificação

2.1.3 A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada

A primeira técnica de transformação gênica em linhagens de cepa de *S. cerevisiae* a ser descrita na literatura foi mediante a produção de protoplastos com enzimas em meio contendo sorbitol (HINNEN *et al.*, 1978; BEGGS, 1978 apud BRAUER *et al.*,1995). Transformações sem fusão celular foram possíveis com tratamento celular por sais de lítio seguido da adição de polietilenoglicol (PEG) (ITO *et al.*, 1983 apud BRAUER *et al.*,1995).

No início da década de 90, métodos menos dispendiosos de tempo foram desenvolvidos. A partir de microesferas de vidro e agitação celular, foi possível obter um número pequeno de leveduras geneticamente modificadas (CONSTANZO e FOX, 1988 apud BRAUER *et al.*,1995). Já a eletroporação em leveduras (BECKER e GUARANTE, 1991 apud BRAUER *et al.*,1995) se mostrou um método mais conveniente por exibir a vantagem de cultivar os microrganismos na superfície da placa de ágar que também é usada para seleção de células hospedeiras.

A partir da virada do século, esta levedura já se tornara hospedeiro tradicional de diversas aplicações, dentre elas, proteínas recombinantes que exigem modificações pós-traducionais, tais como glicosilação. Tal processo é importante para validar biofármacos em biofuncionalidade e reduzir efeitos imunogênicos, entretanto é encontrado apenas em eucariotos superiores, como leveduras, sendo estas o ser de menor nível trófico possuidor das ferramentas genômicas de glicosilação.

Gietz e Schiestl (2008) relataram o processo de transformação gênica com tempos muito inferiores que na década de 80. Foi relatado a modificação genética completa em apenas 1,5 hora com o uso de carreador de fita simples de DNA de acetato de lítio em meio de PEG com alta eficiência de células transformadas. Menos de 10 anos depois, Liu *et al.* (2017) descreveu métodos de alta precisão por robótica, diminuindo assim o risco de erro humano, com resultados expressivos de 1200 cepas ao dia, permitindo completar a biblioteca genômica típica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em apenas 6 dias.

2.1.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS

Processos fermentativos datam desde a Antiguidade, são inúmeras as referências à fermentação em textos e gravuras ao longo da história da humanidade. Há registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos, assírios e babilônios. A produção

de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida antes do ano 6.000 a.C. (VILLEN, 2009).

Atribui-se que no século XIX, o cientista alemão Eduard Büchner a afirmação de que somente os líquidos açucarados são capazes de entrar em fermentação alcoólica. Ao contrário do que pensavam alguns pesquisadores que o antecederam, para Büchner, o álcool se formava durante o processo de fermentação, julgando erradamente, no entanto, a necessidade de ar para causar o fenômeno que ele considerava semelhante à combustão. Os primeiros estudos envolvendo o mecanismo da fermentação alcoólica relacionavam apenas à formação dos produtos iniciais e finais. Foi o médico inglês Dr. Joseph Black que primeiro postulou, no século XVIII, que o álcool etílico e gás carbônico eram os únicos produtos formados do açúcar durante a fermentação alcoólica (MENEZES, 1980).

Entretanto, o primeiro a efetuar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica foi provavelmente Lavoisier, em 1789. Coube a Pasteur, a partir de 1857, a explicação clara sobre a natureza da fermentação alcoólica, atribuindo-se a seres vivos, as leveduras, como agentes causais. Segundo ele, 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 partes de açúcar invertido, que, por sua vez, produzem 51,1 partes de etanol, 49,4 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7 parte de ácido succínico e uma parte de outras substâncias. As pesquisas subseqüentes no desvendamento das reações intermediárias receberam novo ímpeto com a constatação por Büchner, em 1897, que extratos livres de células de levedura possuíam a capacidade de provocar, a fermentação alcoólica.

Há várias maneiras de se conduzir a fermentações. O reator biológico pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do meio fermentado (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Na produção industrial de etanol em grande escala, os processos fermentativos se classificam em processos em batelada e contínuos.

Em nível industrial, os biorreatores, também denominados de dornas, que são reatores de aço do tipo tanque agitado, permanecem fechadas e mantidas a uma temperatura entre 33 e 35°C até o final do processo, quando a concentração de etanol se situa entre 7 e 12° GL. Nas dornas fechadas é usual a presença de um sistema de lavagem do gás de saída para recuperação do etanol evaporado (as perdas por evaporação correspondem a 1,5% de todo etanol gerado). No início da fermentação é

utilizada alta concentração celular inicial (nível de 1-10 milhões de células/mL) e ao fim da fermentação a concentração celular atinge valores 10 a 100 vezes maiores que o inicial (concentração final de 100 milhões de células/mL) (DUARTE, LOURENÇO e RIVEIRO, 2006).

2.2 BIOCOMBUSTÍVEIS

Biocombustíveis são por definição os combustíveis líquidos ou gasosos para o transporte, produzidos a partir da biomassa. Tais permitem a redução da emissão de poluentes atmosféricos por meio de veículos automotores, principalmente nas grandes cidades, e proporcionam uma alternativa para a redução do consumo de fontes não renováveis como um caminho para a ocorrência de um maior equilíbrio entre a produção e o consumo de dióxido de carbono (CO₂) na natureza. O acúmulo de CO₂ na atmosfera, devido ao grande consumo de combustíveis fósseis, tem sido apontado como um dos grandes responsáveis pelas mudanças climáticas. A substituição de combustíveis fósseis por oriundos de fontes renováveis é uma solução para reduzir a emissão de CO₂ em até 90% (BUCHSPIES et al., 2017).

Dentro de um contexto de desenvolvimento econômico, a sustentabilidade é um dos desafios da indústria e da agricultura, pois os processos de produção devem ser mais limpos. Idealmente, os produtos devem ser biodegradáveis, oriundos de fontes renováveis, obtido por processos limpos, e consumirem um baixo custo de energia, obedecendo os doze (12) princípios da Química Verde.

Com o crescimento dessa nova consciência global foi possível a descoberta de novas tecnologias, após longas pesquisas e estudos. Essas possibilitaram empregar diferentes fontes de matéria orgânica, e.g. vegetal, alternativas ao petróleo na obtenção de combustíveis e, sucessivamente, energia. Tal gama de novas possíveis fontes para geração de energia são conhecidas como biomassa, devido ao fato de que são encontradas em sua totalidade na biosfera e serem resultados de ciclos biológicos, diferentemente do petróleo, oriundo da geosfera e seus ciclos geológicos. Consequentemente, denomina-se biocombustíveis e bioenergia as etapas do uso de biomassa análogas as do petróleo.

A aplicação de uma variedade de biomassas já é conhecida e relatada na literatura (DUGAR, 2011), e se encontram bem estabelecidas nos últimos 20 anos, tais como cana-de-açúcar, milho, etc. Por questões de biodiversidade, cada região do mundo dispõe de diferentes fontes disponíveis para aplicação industrial, e por tal, possuem ou adaptam tecnologias e processos próprios aos recursos

oferecidos. Tendo em vista tal fato, estudos apontam as diferentes tecnologias enfatizando que não há uma que seja preferível, mas sim que satisfaça condições regionais de modo a produzir biocombustíveis com eficiência e qualidade padrão (COSTA, PEREIRA JR e ARANDA, 2010).

Os biocombustíveis convencionais e suas frações destiladas não podem ser misturados, mesmo em poucas porcentagens, com querosene fóssil. Devido aos altos padrões de exigência para o combustível e critérios muito rigorosos para a aplicação em motores de aeronaves, só há a possibilidade de adequação caso a conversão de biomassa produza hidrocarbonetos. Tais rotas tecnológicas estão progredindo nos últimos 10 anos (NEULING e KALTSCHMITT, 2014).

2.2.1 BIOQUEROSENE DE AVIAÇÃO

Dentre as modalidades de uso de energias ao longo dos últimos séculos, se destacam o uso em transportes. Ao longo do século XIX, novos meios de transporte surgiram, e a evolução não tem parado desde que a engenharia possibilitou o uso de motores mecânicos em troca do uso de tração animal. A partir de tal marco histórico a humanidade entra na era industrial, tendo como maior descoberta as máquinas a vapor, que por meio da queima de carvão mineral, fruto da mineração, possibilita o sistema ferroviário e naval se desenvolver e transportar pessoas e cargas com menor tempo e maior eficiência. Ao fim do século, uma descoberta na Pensilvânia, Estados Unidos, revelou ao mundo grandes reservas de óleo, com alta capacidade de combustão e em maior abundância à época frente ao carvão. No século XX, novos modelos de motor baseados na combustão surgem para ficar e favorecem a diminuição do tamanho dos veículos, possibilitando automóveis urbanos, e.g. carros, e de carga, e.g. caminhões, florescendo o sistema rodoviário.

A partir daí centros urbanos aumentaram e a população cresce em proporções nunca vistas. Um projeto audacioso, porém, nunca posto em prática até o século passado, era o do domínio dos céus. Alguns inventores fizeram vôos curtos no começo do século XX com máquinas mais pesadas que o ar, tais denominadas aviões.

Entretanto o combustível de aviação comercial, conhecido como "Jet-A", depende do refino de querosene de petróleo sendo uma atividade insustentável e suscetível a variações de preços, conforme o preço do barril sofre oscilações, seja devido a crises geopolíticas ou escassez de recursos. Alternativas estáveis e limpas ao Jet-A foram desenvolvidas no final do século XX e

início do século XXI. Novas tendências do produtor e o aumento da consciência dos consumidores, além da explosão de demanda, conforme a população aumenta nesse mundo moderno, além do fim das fronteiras com a globalização (CENTENNIAL, 2003).

No Brasil, o bioquerosene de aviação é definido na Lei nº 12.490/2011 e, também na resolução da ANP, nº 63 de 2014, como “substância derivada de biomassa renovável que pode ser usada em turborreatores e turbopropulsores aeronáuticos” ou, conforme regulamento, em outro tipo de aplicação que possa substituir parcial ou totalmente o combustível de origem fóssil (ANP, 2014).

O biocombustível referenciado tem a propriedade de ser uma novidade tecnológica de produção de combustível para aviação do tipo *drop-in*, que é definido como: “aquele que atende as especificações do combustível de aviação derivado de petróleo com o mesmo desempenho e performance.” (ANP, 2016). Assim, o uso de um combustível alternativo representaria nenhuma mudança ou desafio na estrutura da base aérea e da logística de suprimento para motores e aeronaves. Desse modo, o bioquerosene nível *drop-in* é um combustível que torna possível a mistura ao querosene fóssil, apesar de possuir propriedades físico-químicas diferentes do combustível tradicional. De modo a providenciar desempenho e segurança parecidos sem oscilações ou alterações no sistema das aeronaves, motores ou no suporte da estrutura de distribuição e armazenamento, tal mistura não deve alterar a propriedade final do combustível.

A relevância do aperfeiçoamento dos biocombustíveis *drop-in* para aviação encontra-se no fato de que as pessoas, e, principalmente, os produtos de grande valor agregado, passaram a usar com mais intensidade o modal aéreo. Apesar do transporte de produtos de alto valor agregado representar a taxa pouco expressiva de 0,5% do volume de artigos comercializados no mundo, essa categoria representa 35% do valor total comercializado devido ao alto preço da carga por peso (AVIATION, 2014).

Atualmente, várias opções para o fornecimento de bioquerosene são discutidas entretanto todos enfrentam etapas de pesquisa e desenvolvimento antes de chegar ao mercado. A tendência na atualidade, é produzir químicos a partir da modificação das moléculas orgânicas da matéria-prima, com a ajuda do calor, catálise química e / ou biológica.

Dependendo do material orgânico utilizado se tornam necessárias etapas de pré-tratamento diferentes para a matéria-prima desejada para o subsequente processamento. Esta matéria-prima

produzida / extraída da biomassa utilizada é convertida em produtos intermediários (e.g., etanol, gás de síntese, biopetróleo, entre outros tipos de hidrocarbonetos) por meio de uma primeira conversão principal baseada em uma etapa de tratamento induzida por calor ou bioquimicamente.

Esses intermediários são então convertidos em bioquerosene por uma segunda conversão principal. Um resumo das conversões existentes hoje na literatura se encontram na Figura 1 abaixo. Dependendo da rota de conversão, os produtos finais são geralmente classificados em querosene parafínico sintético (SPK), querosene parafínico sintético com aromáticos (SKA) e isoparafinas sintetizadas (SIP).

De acordo com o padrão ASTM D7566 para combustíveis sintéticos de SPK e SIP, o conteúdo aromático não deve exceder 0,5 % v/v para garantir uma certa pureza do combustível. Assim, uma baixa concentração dos aromáticos não devem causar problemas significativos ao motor do avião. Ao mesmo tempo, a falta de aromáticos pode levar a uma menor segurança em caso de vazamentos e piores características de lubricidade. Por estas razões, algumas das rotas de conversão visam fornecer um bioquerosene rico em aromáticos, sendo o objetivo produzir um combustível *drop-in*, i. e., totalmente substituível do tradicional.

Ambas as tecnologias caminham em paralelo, mas apenas os combustíveis SPK alcançaram a certificação ASTM até agora (ASTM, 2018). Isto é especialmente devido ao fato de que o bioquerosene será usado mais provavelmente como mistura em proporções de até 50%, enquanto para SIP é até 10% de acordo com ASTM D7566. Sob essas circunstâncias, as características da mistura de combustível de *Jet A1* derivado do petróleo com o derivado da biomassa, é fortemente dependente ainda do querosene do petróleo.

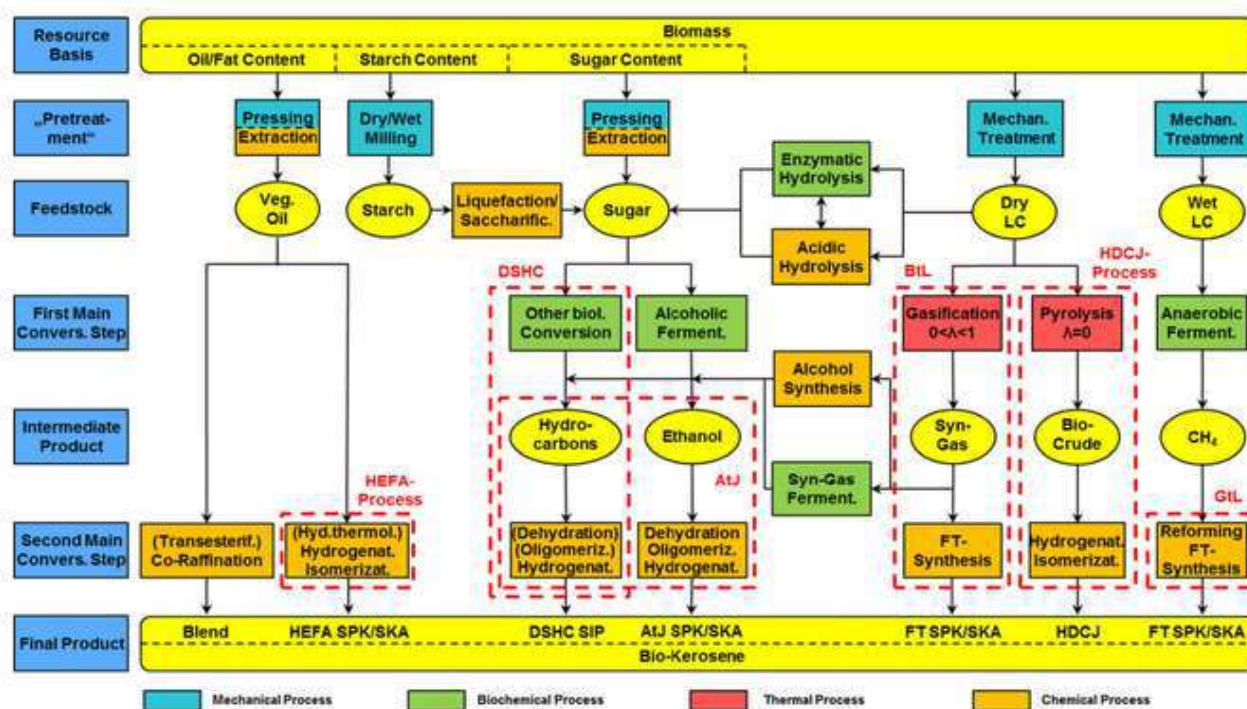


Figura 1 - Rotas de obtenção de bioquerosene

Fonte: NEULING e KALTSCHMITT, 2014

Devido à enorme variedade de diferentes abordagens em discussão e desenvolvimento anteriormente no presente trabalho, apenas uma quantidade selecionada de rotas de conversão para bioquerosene estão maduras e são vistas no mercado.

Uma das principais rotas é baseada em óleos vegetais e gorduras, assim, na matéria-prima, em geral sementes oleaginosas, algas ricas em lipídios, resíduos como óleo de cozinha usado, ou sebo animal ou mesmo coprodutos como *Crude Tall Oil*, que é um subproduto no processamento de polpa de coníferas resinosas para a produção do papel Kraft na fabricação de papel (CHIARAMONTI, 2014).

A esterificação não é uma opção viável para a produção de combustível de aviação: o chamado biodiesel, “é um combustível renovável obtido a partir de um processo químico denominado transesterificação. [...] e somente pode ser comercializado como biodiesel, após passar por processos de purificação para adequação à especificação da qualidade, sendo destinado principalmente à aplicação em motores de ignição por compressão (ciclo Diesel)” (ANP, 2016). Sua composição é uma mistura de ésteres metílicos de ácido graxo a ser usado em pequenas

porcentagens de mistura no transporte rodoviário, isto é, entre 5 a 7% atualmente (CHIARAMONTI, 2014).

Já o hidrotratamento de lipídios pode ser aplicado para produzir combustíveis de aviação, como já foi feito por várias empresas (por exemplo, Neste *Oil*, Petrobras, ENI / UOP, etc.) para um diesel derivado de biomassa de qualidade superior (em comparação com EMAG). O diagrama de blocos representando tal processo pode ser visto na Figura 2 abaixo. Atualmente Neste *Oil*, UOP, Anoltair e *Dynamic Fuels* estão explorando o processo de hidrotratamento de óleos vegetais para a produção de biocombustíveis de aviação na escala industrial (NEULING e KALTSCHMITT, 2014).

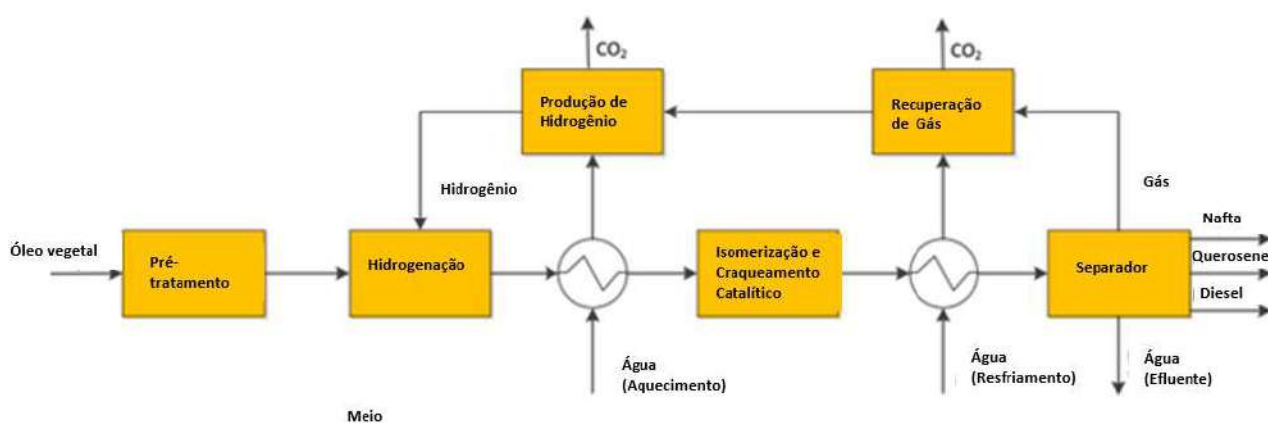


Figura 2 - Diagrama de blocos do hidroprocessamento

Fonte: NEULING e KALTSCHMITT, 2014

Os açúcares e os álcoois também podem ser um ponto de partida para os combustíveis parafínicos. A abordagem baseada em açúcar proposta pela Empresa Amyris, Inc. faz uso de microrganismos transgênicos para conversão dos açúcares em terpenos, mais especificamente isoprenóides, de onde derivam uma gama de produtos, em geral, querosene, combustíveis tipo diesel e produtos químicos. A conversão direta de açúcares para hidrocarbonetos combustíveis desenvolvidos pela Amyris, Inc. envolve a fermentação dos açúcares para produção de farneseno (NEULING e KALTSCHMITT, 2014).



Figura 3 – Diagrama de blocos da conversão direta de açúcares em hidrocarbonetos

Fonte: NEULING e KALTSCHMITT, 2014

O farneseno é o isoprenóide mais conhecido e explorado conhecido pelo homem. Sua molécula possui 15 carbonos e, quando hidrogenado, produz um diesel de alta qualidade. Na Figura 4 abaixo, sua estrutura química pode ser observada. É possível converter tal biomolécula em uma variedade de produtos como emolientes, surfactantes, lubrificantes industriais e biocombustíveis, incluindo bioquerosene de aviação, sendo denominado de molécula plataforma.

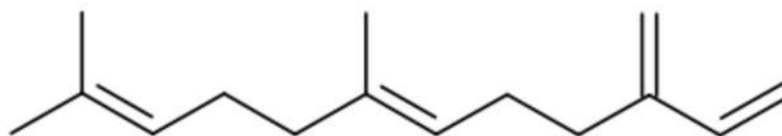


Figura 4 - Representação molecular da estrutura do β -Farneseno

Fonte: LEIMER, 2012 apud GRANDO, 2013

Outro caminho possível é cultivar microrganismos que acumulam lipídios em açúcares, e depois extrair e processar os lipídios como anteriormente descrito. A tecnologia desenvolvida pela empresa Solazyme, com base em microalgas heterotróficas modificadas para acumular mais de 80% de óleo, é um bom exemplo de avanço nessa área. Álcoois, especialmente álcoois superiores, também podem ser matéria-prima para a produção de biocombustíveis, por meio de desidratação, oligomerização e hidroprocessamento (CHIARAMONTI *et al.*, 2014).

Quanto à biomassa lignocelulósica, duas possíveis rotas de processo podem ser empregadas: a via bioquímica e a via termoquímica.

A via bioquímica começa com o pré-tratamento de biomassa, que visa abrir a estrutura da biomassa para permitir a enzima penetrar na matéria-prima e hidrolisar os polímeros de açúcar de celulose e hemicelulose. A severidade da etapa de pré-tratamento (em termos de temperatura e pressão) pode gerar inibidores de fermentação.

Portanto, sendo a celulose e a hemicelulose duas macromoléculas muito diferentes em termos de comportamento de degradação, várias empresas, como a, Biochemtex (na sua tecnologia de etanol lignocelulósico PROESA) desenvolveram um pré-tratamento com uma abordagem de duas etapas, onde primeiro se separa e se liquefaz a hemicelulose (C5) e depois se processa a celulose (C6) com maior severidade. Quando os açúcares monoméricos estão disponíveis, a fermentação ocorre à etanol, e outros produtos, por meio de leveduras. Depois a lignina é separada da corrente. Sendo a lignina uma matéria-prima rica em fenólicos e aromáticos, pode ser a base para processamento posterior em uma faixa de produtos, químicos ou combustíveis, incluindo o querosene de aviação (NEULING e KALTSCHMITT, 2018).

A via termoquímica é baseada na gaseificação com oxigênio quente, seguido pelo conhecido processo Fischer Tropsch (FT) (desenvolvido no início de 1900 na Alemanha). Produtos de FT já são distribuídos comercialmente por várias companhias de petróleo (como combustível premium), sendo que são feitos de gás ou carvão. Esses produtos de FT derivados de combustíveis fósseis podem ser misturados até 50% ao querosene de aviação (Jet-A1), uma vez que não possuem aromáticos necessários para a lubrificação e deve-se evitar vazamentos (“seal swelling”), sendo a única exceção o combustível de avião inteiramente sintético da SASOL.

Há a possibilidade de fermentar gás de síntese da conversão termoquímica, que está no momento em desenvolvimento por empresas como a Swedish Biofuels e LanzaTech (NEULING & KALTSCHMITT, 2018). Nesse processo, após etapa de gaseificação, o gás é fermentado à álcoois ou outros produtos de valor agregado, incluindo combustíveis parafínicos.

O uso de pirólise também é outra opção para produzir tais combustíveis. Entretanto, a partir de matéria lignocelulósica bruta ainda não é possível a produção de combustível, devido ao alto grau de oxigenação e acidez do produto final. Então se faz necessário outros processamentos antes do seu uso como combustível. Porém o processo fazendo uso de óleos vegetais, após estabilização e hidrotreatamento catalítico, se mostrou uma possibilidade para produzir combustível de aviação com

boas propriedades, devido ao seu alto teor em aromáticos e cicloparafinas, sendo um ótimo elemento de mistura com o querosene parafínico sintético por FT (NEULING e KALTSCHMITT, 2018).

2.3 BIOSSEGURANÇA

Segundo Valle e Teixeira (2010), Biossegurança são as “condições de segurança alcançadas por um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e ao meio ambiente” (TEIXEIRA e VALLE, 2010, p.87). O fundamento básico da Biossegurança é estudar, entender e tomar medidas para prevenir os efeitos adversos da Biotecnologia moderna e está relacionada com os agravos gerados pelos agentes químicos, físicos, biológicos, ergonômicos e psicossociais, em ambientes ocupacionais do campo da saúde e laboratorial em geral (COSTA e COSTA, 2006).

A definição etimológica do termo Biossegurança se refere à segurança das atividades que envolvem organismos vivos, visto que bio quer dizer vida. É uma junção da expressão “segurança biológica”, voltada para o controle e a minimização de riscos advindos da exposição, manipulação e uso de organismos vivos que podem causar efeitos adversos ao homem, animais e meio ambiente (EMBRAPA, 2016).

Com o contínuo crescimento dos processos biotecnológicos na Indústria Química, tanto no setor farmacêutico, como no Setor de Alimentos ou Energia, possuindo riscos emergentes diferenciados (CCPS, 2011), houve a necessidade de uma ciência que estudasse os impactos relacionados especialmente à exposição a agentes biológicos.

Sendo assim, a Biossegurança é uma ciência multidisciplinar que integra ações das áreas de saúde, de engenharia, de arquitetura ou administrativas que tem por fim prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos à vida na forma mais ampla, incluindo o meio ambiente em que vivemos. Neste contexto, a Biossegurança vem sendo abordada de forma mais ampla, e está diretamente relacionada ao controle e minimização de riscos advindos da prática de diferentes tecnologias.

Em suma, o termo define “segurança biológica” tangendo tanto a exposição, manipulação e efeitos adversos de OGM ao meio ambiente, como também incluindo os riscos tradicionais da área

de segurança que visam por afetar ao homem e vizinhanças. As práticas de Biossegurança se baseiam na necessidade de proteção ao operador, seus auxiliares e a comunidade local contra riscos que possam comprometer a saúde, assim como proteger o local de trabalho, os instrumentos de manipulação e o meio ambiente. (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Algumas destas práticas são regidas por leis federais, estaduais e/ou municipais, sendo principalmente as práticas relacionadas à OGM. Também se destacam atividades de manipulação de radioisótopos, agentes infecciosos de alta periculosidade, assim como agentes bioquímicos e químicos que são associados com terrorismo, sendo neste caso a preocupação não só de nível nacional, como internacional.

2.3.1 Conceitos e Aspectos Gerais

A base para os conceitos desenvolvidos em Biossegurança se encontra na tradicional área de Segurança de Processos e Prevenção de Perdas, cujo objetivo é a prevenção de acidentes pelo uso apropriado de tecnologias para identificar perigos em uma planta química e eliminar todos os eventuais riscos antes de ocorrer o acidente (CROWL e LOUVAR, 2011).

São conceitos da área de Segurança do Trabalho e, por consequência, de Biossegurança (CROWL E LOUVAR, 2011):

- ✓ Cenário: descrição dos eventos que resultam em um acidente ou incidente, deve conter informações relevantes para definir causas primárias;
- ✓ Perigo: condição química, física ou biológica que tem o potencial de causar dano as pessoas, propriedades ou meio ambiente;
- ✓ Risco: a probabilidade de ocorrer um evento resultando em feridos, danos ambientais e perdas econômicas em termos tanto do possível incidente e do nível de grandeza da perda ou dano;
- ✓ Acidente: ocorrência de uma sequência de eventos que produz feridos, morte ou dano/ perdas não-intencionais. É o evento, não o produto;
- ✓ Incidente: perda de quantidade de material ou energia, nem todo evento propaga em incidente e nem todo incidente propaga em acidentes;
- ✓ Identificação de Riscos: estimativa quantitativa do risco baseado na avaliação de engenharia e técnicas matemáticas para combinar consequência e frequência; e

- ✓ Análise de Riscos: uso dos resultados da identificação de riscos para decidir, por meio de um ranking, estratégias mitigadoras de risco;
- ✓ Classificação de Riscos (Ranking): organizar em ordem de gravidade e/ou frequência de eventos (matriz de risco);
- ✓ Gerenciamento de Riscos: sequência de ações referentes à minimização, substituição, moderação e simplificação dos riscos;
- ✓ Prevenção de riscos: Prevenir a concretização do risco gerenciado por meio de equipamentos de proteção coletiva, individual e estratégias preventivas; e
- ✓ Gestão SMS: Conjunto de ações em prol da segurança do trabalho, da saúde dos funcionários e da preservação das vizinhanças/ meio ambiente

2.3.2 Identificação de Riscos

Segundo a Portaria do Ministério do Trabalho (MTE), nº 3214, de 08/06/78, os riscos nos laboratórios podem ser classificados em físicos, químicos, biológicos, ergonômicos (incluindo os psicossociais) e de acidentes. A classificação dos riscos encontra-se na Norma Regulamentadora nº 5 (NR-5).

Esta classificação está relacionada ao agente causador do risco que é qualquer componente de natureza física, química, biológica que possa comprometer a saúde do homem, dos animais, do ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos (BRASIL, 2010)

2.3.2.1 Riscos Físicos:

Riscos físicos normalmente se referem aos riscos ocasionados por algum tipo de energia, quase sempre relacionados com equipamentos ou ambiente em que se encontra o laboratório. Alguns agentes físicos causadores são: calor, frio, ruído, vibrações, radiações (não ionizantes e ionizantes, raios X, gama e UV) e pressões anormais (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Dentre os equipamentos de laboratório que podem ocasionar riscos físicos, podem ser citados: estufas, autoclaves muflas, bicos de gás (bico de Bunsen), lâmpada de infravermelho, incubadoras elétricas, agitador magnético com manta de aquecimento, equipamentos de destilação, esterilizadores de alça ou agulha e autoclaves. Acidentes envolvendo riscos físicos podem ocasionar queimaduras, explosões e até incêndios (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Dessa forma, estes equipamentos devem ser cuidadosamente instalados em bancadas resistentes ou se for o caso em capelas de segurança química (Equipamento de Proteção Coletiva – EPC), em local ventilado, longe de material inflamável, volátil e de equipamentos termossensíveis. Além disso, ao operar os equipamentos geradores de calor os operadores devem usar equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas térmicas feitas de tecido resistentes ou revestidas com material isolante ao calor e avental (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Em equipamentos que geram baixas temperaturas, como *freezers*, câmaras frias, congeladores de baixa temperatura (- 70°C), refrigeração com nitrogênio (- 160°C) também é necessária a utilização de EPI para proteção adequada como o uso de agasalhos térmicos com capuz, máscaras, sapatos de borracha de cano alto com isolamento térmico e luvas térmicas (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Em relação ao uso de radiação, todo laboratório ou local que opera com material radioativo deve ser construído conforme as diretrizes básicas de radioproteção da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), que estabelece as normas referentes ao tempo de exposição permitido, à construção do local, às medidas preventivas a serem tomadas em relação aos operadores (uso de EPI como óculos de proteção, uso de medidores de radiação e realização de exames hematológicos periódicos para o controle de exposição ocupacional e bem estar de tais profissionais) (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

No tocante aos agentes de riscos físicos que emitem ruídos, como trituradores, ultra centrífugas, bombas, ultrassom e autoclaves, é necessário, e muitas vezes exigido, o uso de protetores auriculares. Existem legislações específicas que regulamentam e determinam os limites permissíveis em unidade de decibéis. A norma NBR no. 10152/ABNT estabelece limite de 60 decibéis para condição adequada de trabalho (50 a 60 decibéis voz humana e 110 decibéis buzina de carro) (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

2.3.2.2 Riscos Químicos:

Normalmente são relacionados à manipulação de substâncias químicas, (gasosas, líquidas ou sólidas). Podem ser substâncias simples, compostas ou produtos que possam atingir o organismo pela via respiratória, nas formas de poeiras, fumos, névoas, neblinas, gases ou vapores ou, ainda, por via cutânea, mediante contato direto (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Estas substâncias podem ter características combustíveis, explosivas, irritantes, voláteis, cáusticas, corrosivas ou tóxicas (CARVALHO, 2013). Cada uma destas substâncias deve ser manipulada adequadamente em locais que permitam ao operador segurança pessoal e do meio ambiente.

Além disso, cuidados devem ser tomados quanto ao descarte destas substâncias. Este é um grupo de risco importante, pois acidentes de laboratório com substâncias químicas são os mais comuns e bastante perigosos, já que produtos químicos podem causar danos à saúde, ao meio ambiente, incêndios e explosões.

Dentre os agentes que podem gerar riscos químicos se destacam: (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017):

- ✓ Contaminantes do ar (poeiras, fumaças, aerossóis gerados por: centrifugas, quando abertas em funcionamento, incubadoras orbitais, liofilizadores, evaporadores, homogeneizadores, misturadores, moedores substâncias sólidas, líquidos e gases comprimidos e perigosos);
- ✓ Substâncias tóxicas e altamente tóxicas, como por exemplo, as que causam alterações genéticas, como brometo de etídeo usado manipulação com ácidos nucleicos;
- ✓ Substâncias explosivas, como nitroglicerina e ácidos perclórico e nítrico, que são produtos controlados pelo Exército Brasileiro e requerem autorização especial para sua compra ou obtenção;
- ✓ Substâncias irritantes e nocivas (amônia, por exemplo);
- ✓ Substâncias corrosivas (ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico, por exemplo);
- ✓ Líquidos voláteis, como no caso de ácidos clorídrico e nítrico,
- ✓ Substâncias inflamáveis, tais como éter, metanol, clorofórmio, acetona dentre outras substâncias inflamáveis e extremamente voláteis.

A maioria dessas substâncias devem ser manipuladas em capela de segurança química com ventilação, no caso das substâncias inflamáveis, com lâmpadas lacradas anti-explosão e com interruptor externo. O operador deverá estar munido do EPI adequado como, por exemplo: óculos de proteção, máscara facial, avental entre outros.

2.3.2.3 Riscos Biológicos:

Definido como a probabilidade de ocorrência de um resultado desfavorável, de um dano ou de um fenômeno indesejável a saúde humana, animal e ao ambiente em um dado tempo, em decorrência da manipulação de agentes ou materiais biológicos infectados, sejam estes OGM ou organismos comuns (BRASIL, 2010).

Os materiais biológicos são constituídos por amostras provenientes de seres vivos como plantas, animais, bactérias, leveduras, fungos, parasitas e amostras biológicas provenientes de animais (sangue, urina, secreções, peças cirúrgicas). Incluem também organismos geneticamente modificados onde os cuidados são mais relevantes por estarem manipulando genes com características diferenciadas.

Outras publicações precederam a de NIH (1976), como as normas de comprometimento internacional com segurança da *World Health Organization* (WHO, 1982/ 1984) e o relatório internacional de avaliação e gerenciamento de riscos da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 1986).

A partir desse último, se estabeleceram dois princípios sobre o uso de organismos de DNA-recombinante na indústria (BRAUER *et al.*, 1995): classificação dos experimentos em quatro classes de acordo com o potencial risco; e considerar a experiência existente em Microbiologia Médica na classificação dos quatro níveis.

Todo ensaio deve ser precedido de uma avaliação de risco biológico, onde deve ser definido o nível de contenção adequado para se manejar as amostras a serem testadas. Neste caso, níveis de segurança são correspondentes às atividades desenvolvidas. Devem ser adotadas medidas de segurança a fim de prover os usuários dos meios necessários ao bom desenvolvimento de suas atividades.

Os agentes de risco biológico podem ser distribuídos em quatro classes de risco, de 1 a 4, por ordem crescente de risco, em função de sua patogenicidade e outras características. Assim o grau de risco de um organismo está relacionado à sua patogenicidade e também será influenciado por outros fatores como (BRASIL, 2010):

✓ Virulência: é a capacidade que um agente biológico tem de causar doença, medida pela mortalidade que ele produz e/ou por seu poder de invadir tecidos do hospedeiro. Podemos

mensurá-la por meio dos coeficientes de letalidade e de gravidade;

✓ Formas de transmissão: é o caminho percorrido pelo agente biológico da fonte de exposição até o hospedeiro. O conhecimento do modo de transmissão é fundamental para aplicar medidas que evitem a sua disseminação;

✓ Estabilidade: é a capacidade de o agente sobreviver no meio ambiente;

✓ Concentração e volume: é o número de agentes biológicos patogênicos por unidade de volume. Assim, é comum afirmar que, quanto maior a sua concentração, maior o seu risco. Além da concentração o volume também é responsável pelo aumento do risco;

✓ Origem do agente biológico: está associada à origem do hospedeiro do agente biológico e também à sua localização demográfica (áreas endêmicas);

✓ Disponibilidade de medidas profiláticas eficazes: disponibilidade de compostos imunoprofiláticos. Quando estes estão disponíveis o risco é reduzido drasticamente;

✓ Presença de um tratamento eficaz: refere-se à existência de um tratamento eficaz capaz de proporcionar cura ou mesmo a contenção do agravamento da doença caso ocorra contato com o agente;

✓ Dose infectante: refere-se ao número mínimo de agentes patogênicos necessários para causar doença;

✓ Tipo de ensaio: o tipo de ensaio pode potencializar o risco. Ensaio como a amplificação, centrifugação, inoculação em animais e sonificações, por exemplo, são responsáveis por aumentar o risco biológico;

✓ Fatores referentes ao trabalhador: são aqueles fatores pessoais como: idade, sexo, fatores genéticos, susceptibilidade individual, estado imunológico, exposição prévia, gravidez, consumo de álcool, uso de EPI, qualificação, treinamento e experiência

Quadro 2 abaixo mostra as classes de risco, de acordo com os organismos biológicos manipulados que afetam o homem, os animais e as plantas.

Quadro 2 - Classes de Risco dos Agentes Biológicos

Classe	Definição	Exemplos
Classe de Risco 1	Agentes sem histórico de causar doenças. Baixo risco individual e coletivo.	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Bacillus subtilis.</i>

Classe de Risco 2	Agentes com possibilidade de provocar doenças no usuário com medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Risco individual moderado e baixo. risco coletivo.	<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Tripanossoma cruzi</i> .
Classe de Risco 3	Agentes patogênicos com transmissão aérea, potencialmente letais, existem medidas terapêuticas e profiláticas sem alta eficácia. Risco individual alto e baixo risco coletivo.	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> .
Classe de Risco 4	Agentes altamente infecciosos com fácil propagação, alto risco de fatalidade, sem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Alto risco individual e coletivo	Vírus Ebola, Varíola major, Herpesvírus do macaco.

Fonte: BRASIL, 2010

2.3.2.4 Riscos Ergonômicos:

São riscos associados a aspectos pouco considerados e observados no ambiente de trabalho, como distâncias em relação às alturas dos balcões, prateleiras, gaveteiros, capelas, circulação, obstrução de áreas de trabalho entre outros. (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Normalmente riscos ergonômicos estão relacionados às lesões decorrentes de esforços repetitivos, que atualmente se denominam DORT, doenças osteomusculares relacionadas com o trabalho (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017). Incluem o esforço físico, levantamento de peso, postura inadequada, controle rígido de produtividade, situação de estresse, trabalhos em período noturno, jornada de trabalho prolongada, monotonia e repetitividade, imposição de rotina intensa (FIOCRUZ, 2010). É comum atualmente a ocorrência de acidentes ergonômicos oriundos de lesões por movimentos repetitivos, má postura pelo uso de teclados para digitação (tendinites, hérnias de disco) que muitas vezes precisam ser corrigidos por intervenção cirúrgica (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

2.3.2.5 Riscos de Acidentes:

São riscos associados a arranjo físico deficiente, máquinas e equipamentos sem proteção, ferramentas inadequadas ou defeituosas, eletricidade, incêndio ou explosão, animais peçonhentos e armazenamento inadequado (FIOCRUZ, 2010). Em laboratórios, normalmente estes riscos estão relacionados a manuseio de equipamentos e instrumentos de vidro, perfurocortantes, gases comprimidos inertes, combustíveis e de ultrassom (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

No caso dos equipamentos de vidro, deve se observar a resistência mecânica (espessura do vidro), resistência química e ao calor. O material de vidro utilizado deve ser adequado para a aplicação desejada, não deve estar trincados, rachado ou fraturado, e seu descarte quando inutilizado, deve ser realizado de forma adequada em caixas de papelão ou plástico (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

Materiais perfurocortantes, como furadores de rolhas, agulhas e tesouras exigem que as mãos sejam protegidas com luvas adequadas e que sejam tomados os cuidados devidos, nunca voltando o instrumento contra o próprio corpo. No caso das agulhas, em especial as que manipulam fluidos corporais, cuidados em relação às normas de Biossegurança devem ser observados de modo a ser adequado seu descarte e manuseio (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

2.3.3 Gerenciamento de Riscos

O risco percebido quase sempre diverge do risco mensurado ou avaliado. Enquanto o primeiro é temporal, dependente de variáveis na maioria das vezes não controladas e de natureza subjetiva, o risco mensurado (ou risco real) é função do somatório de possibilidades dentro do cenário de resultados científicos obtidos. Enquanto o risco percebido pode ser distinto até mesmo entre pessoas diferentes e/ou momentos temporais diferentes, o valor do risco avaliado só é alterado quando da introdução de novos parâmetros científicos que alteram situações e padrões descritos previamente pela metodologia científica aplicada (ODA, 1998; ODA e SOARES, 2000).

2.3.3.1 Medidas de Biossegurança

Como visto, a segurança das atividades laboratoriais envolve medidas de controle e proteção contra os riscos ambientais, como proteção coletiva, individual, organização do trabalho, higiene e conforto. As medidas de proteção coletiva são as mais importantes, pois garantem a proteção de todo grupo envolvido no trabalho. De acordo com a natureza do risco, estas medidas podem ser: (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

- ✓ substituição de matérias-primas e insumos por produtos menos prejudiciais à saúde;
- ✓ alteração no processo de trabalho empregando novas tecnologias que minimizem as situações de risco;
- ✓ isolamento da fonte de risco, como isolamento acústico de equipamentos geradores de ruído;
- ✓ instalação de sistemas de ventilação, exaustão ou insuflamento, que evitam a dispersão de

contaminantes no ambiente, diluem as concentrações de poluentes e oferecem conforto térmico

Uma das medidas de Biossegurança a ser adotada é a identificação correta, que é uma forma importante de prevenir a manipulação inadequada de agentes infecciosos, substâncias químicas e OGM. Existem normas de rotulagem, transporte e armazenamento para todas as substâncias e agentes infecciosos (FLEMING, 1995). Porém, o risco biológico a qual estão sujeitos os pesquisadores ou profissionais que atuam em laboratórios ou em ambientes onde estão presentes microrganismos é apenas um dos segmentos de atuação da Biossegurança como disciplina científica (BINSFELD, 2004).

A prática de leitura do rótulo de todo material de trabalho, assim como o uso constante de equipamentos de proteção individual e coletiva adequados para cada procedimento, são algumas das principais formas de prevenir acidentes e de se proteger (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017).

O correto armazenamento de solventes, reagentes, vidrarias, usando locais definidos e adequadamente identificados com a simbologia adequada minimiza os riscos de acidentes de trabalho (TEIXEIRA e VALLE, 2010).

Outro aspecto importante é o descarte de produtos considerados agressores ao meio ambiente que deve ser cuidadosamente monitorado visando preservá-lo. Práticas voltadas para a coleta seletiva e possível reaproveitamento de materiais por meio de reciclagem podem possibilitar economia e proteção ambiental para o bem-estar da população (TORREIRA, 1999).

2.3.3.2 Medidas de Higiene Ocupacional

As medidas de proteção individual pelo emprego de EPI são controles possíveis da exposição a agentes ambientais que, se adequadamente utilizados, protegem a saúde e integridade física do trabalhador. A Norma Regulamentadora nº6 do Ministério do Trabalho e Emprego (NR6) determina o cumprimento das exigências legais para uso de EPI. As medidas de proteção individual também são indicadas em casos específicos como: (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017)

As medidas de proteção individual somente devem ser empregadas somente quando (a) medidas de proteção coletiva forem inviáveis ou não ofereçam completa proteção contra os riscos de acidentes de trabalho, ou doenças ocupacionais; (b) enquanto as medidas de proteção coletiva

estiverem sendo providenciadas e implantadas; (c) em situações de emergência; e (d) Em trabalhos de curta duração (CAMPOS, 2000).

A capacitação profissional em segurança é um aspecto importante da prevenção de riscos nas atividades de pesquisa e ensino, pois muitos acidentes são causados pela falta de experiência e treinamento específico. No caso dos laboratórios de ensino, como os alunos, ao contrário dos funcionários, não costumam receber treinamento prévio voltado à segurança no laboratório, é necessário conscientizá-los a respeito dos riscos existentes, assim como das medidas a serem adotadas para garantir a redução destes riscos aos níveis mínimos, como: uso de adequados EPI e EPC, procedimentos de manipulação de substâncias químicas e biológicas, observações quanto ao comportamento nos ambientes de trabalho que possam interferir na atenção durante a realização do trabalho ou que não sejam adequadas ao local (HIRATA e MANCINI FILHO, 2017). Abaixo estão listados na Quadro 3 alguns EPI e seus meios de proteção desejados.

Quadro 3 - Equipamentos de proteção individual e suas características

Tipo de EPI	Risco Evitado	Características de Proteção
Jalecos e aventais de pano	Contaminação do vestuário	Cobrem o vestuário pessoal
Aventais plásticos	Contaminação do vestuário	Impermeáveis
Calçado	Impactos e salpicos	Fechados à frente
Óculos de proteção	Impactos e salpicos	- Lentes resistentes a impactos - Proteções laterais
Óculos de segurança	Impactos	- Lentes resistentes a impactos - Proteções laterais - Proteção total da face
Viseira de proteção facial	Impactos e salpicos	Fácil de tirar em caso de acidente
Viseira de proteção facial	Inalação de aerossóis	Há diversos modelos: descartável, completa ou meia máscara purificadora de ar, de capuz com ar filtrado à pressão e com abastecimento de ar.
Aparelhos e máscaras de respiração	Contato direto com microrganismos e cortes	- Em látex, vinil ou nitrílico microbiologicamente aprovados e descartáveis - Malha de aço

Fonte: Penna *et al.*, 2010

A manipulação de materiais sem a observância das normas de segurança é uma das causas que contribui substancialmente para o acontecimento dos acidentes (CARVALHO, 2013). Antes de qualquer trabalho o operador deve estar informado sobre os riscos dos produtos químicos ou

bioquímicos e dos equipamentos a utilizar, bem como conhecer as precauções de segurança e os procedimentos de emergência a ter em caso de acidente, para se proteger dos possíveis riscos. O operador deve ter por hábito planejar o trabalho que vai realizar, pois só assim o poderá executar com segurança.

3 METODOLOGIAS

3.1 ESTUDO DE CASO DA PRODUÇÃO DE FARNESENO

De acordo com Yin (2001), estudo de caso pode ser entendido como: uma inquirição empírica que investiga um fenômeno contemporâneo dentro de seu contexto da vida real, especialmente quando os limites entre o fenômeno e o contexto não estão claramente definidos (YIN, 2001, p. 23).

Baseando neste método, de caráter qualitativo, torna-se possível a observação de fenômenos contemporâneos, procurando interpretá-los de forma a criar mecanismos que facilitem seu entendimento, mensuração e comparação. Isso é feito, por meio da identificação de elementos ou fatores passíveis de classificação e categorização (YIN, 2001).

Assim o primeiro passo na realização do trabalho consistiu em buscar conceitos e normas na área de Biossegurança a nível nacional e internacional. A partir do conhecimento prévio de tal, foi possível seguir fazendo a análise qualitativa do objeto de estudo a ser escolhido.

Como visto na revisão bibliográfica, são conhecidos processos estabelecidos de produção de biocombustíveis com uso de tecnologias de transgênicos. A fim de obter dados para a realização do trabalho, o segundo passo a ser tomado foi escolher dentro do cenário levantado na revisão uma amostra de relevância local para ser feita tal análise.

Com as informações obtidas foi possível obter detalhes do processo industrial, agente fermentativo, reagentes, matérias-primas, resíduos e efluentes. De acordo com GRANDO (2013), projetos de *startups* na área de biocombustíveis, por rotas que fazem uso de microrganismos transgênicos, incluem as companhias norte-americanas de Biotecnologia Amyris, Inc. e TerraVia Holdings, Inc. (também conhecida como Solazyme). Entretanto no contexto atual a Amyris Brasil Ltda possui maior inserção e significância econômica no mercado brasileiro que a Solazyme Bunge Produtos Renováveis Ltda, assim sendo escolhido como empresa-alvo para análise da produção de farneseno. O Estudo de caso constou das seguintes etapas, detalhadas nos itens subsequentes.

3.1.1 Seleção da empresa-alvo do estudo

Diferentes empresas podem ser associadas à produção de farneseno. Uma busca de artigos e patentes foi realizada para definir os principais *players* desse setor. Foi usado o Scopus como base de busca de produção científica e o Espacenet como base de busca de documentos patente. Para avaliar taxa de ocupação de cada empresa, foi feita a metodologia ESCOPO conforme ilustrado nos Quadro 4 abaixo.

Quadro 4 - Matriz Escopo para Busca Patentária de Farneseno

		Patent search	Tentativas												
			#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11*	#12*	#13**
Palavras-chave	Componentes	farnesene	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		farnesane		X									X		X
		squal?ne			X								X		X
		derivative				X							X		X
	Aplicações	cosmetic?					X							X	X
		food						X						X	X
		flavor							X					X	X
		sweet?								X				X	X
		plastic?									X			X	X
		fuel										X		X	X
Total		96	5	9	3	11	3	6	3	6	3	16	27	4	
Saturação (%)		-	34,0	61,1	20,4	74,7	20,4	40,8	20,4	40,8	20,4	-	-	-	
		*FARNESENE AND (" " OR ... OR " ")						**FARNESENE AND (" " OR ... " ") AND (" " OR ... " ")							

Quadro 5 – Matriz Escopo para Busca de Artigos de Farneseno

		Patent search	Tentativas												
			#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11*	#12*	#13**
Palavras-chave	Componentes	farnesene	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		farnesane		X									X		X
		squal?ne			X								X		X
		derivative				X							X		X
	Aplicações	cosmetic?					X							X	X
		food						X						X	X
		flavor							X					X	X
		sweet?								X				X	X
		plastic?									X			X	X
		fuel										X		X	X
Total		2202	8	28	417	18	162	85	47	13	25	444	252	64	
Saturação (%)		-	84,3	29,5	43,9	0,3	3,0	1,6	0,9	0,2	0,5	-	-	-	
		*FARNESENE AND (" " OR ... OR " ")						**FARNESENE AND (" " OR ... " ") AND (" " OR ... " ")							

O método ESCOPO consiste de sortear combinações em pares de palavras tendo uma referência fixa para prospectar o volume de documentos em cada área de conhecimento relacionado

ao produto/ invenção. O total resultante de cada busca é anotado e as buscas são feitas exaustivamente até acabar as combinações possíveis e iniciar as pesquisas por grupo/ categoria, e.g. aplicação e/ou componente. Tal método permite estudos mais elaborados de correlação entre a situação tecnológica e a econômica em estudos aplicados (DAIHA *et al.*, 2016).

Foram escolhidas 10 palavras-chaves em inglês que é o máximo permitido pelos bancos de dados, sendo 1 palavra fixa (*farnesene*) e 9 variantes, onde 3 refletem componentes derivados de farneseno e, portanto, relacionado a tal, e 6 referentes às aplicações possíveis do farneseno e seus subprodutos. Os resultados das buscas, tanto de artigos como de patentes foram exportados por meio de arquivo “.csv” (*comma-separated values*). Após terminadas ambas as buscas por patentes e artigos, calcula-se a saturação de cada área de conhecimento tanto no mercado (patentes) como na academia (artigos) e plotam-se gráficos no Microsoft Excel vistos na Figura 5 abaixo.

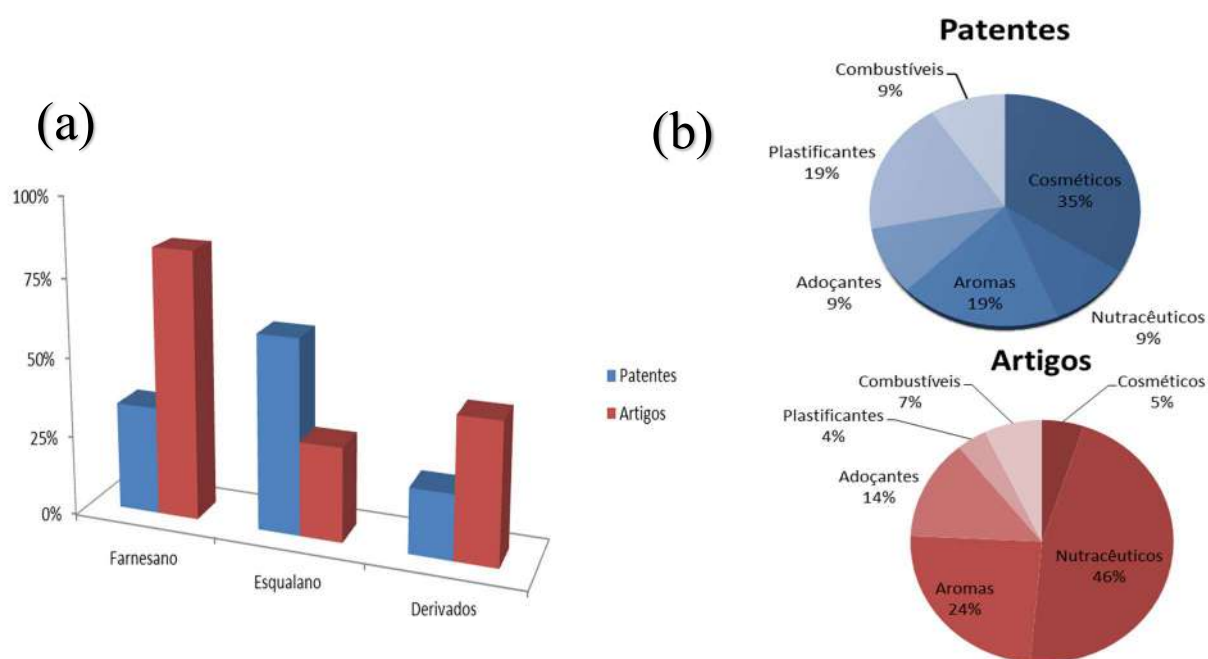


Figura 5 – (a) Número de patentes e artigos por derivado de farneseno (b) e áreas de aplicação em patentes (em cima) e em artigos (em baixo).

Fonte: Elaboração pelo próprio autor

A busca retornou a maioria de artigos sobre farnesano (C15), o bioquerosene. Este resultado é natural tendo em vista que é uma molécula plataforma muito explorada em pesquisa aplicada. Para patentes a parcela mais explorada está no derivado de esqualano, produto de maior receita atualmente (AMYRIS, 2017). Dentre as aplicações do farneseno, aparece o mercado de

Nutracêuticos na literatura científica, e o mercado de Cosméticos na literatura de patentes, apontando novamente o produto final esqualano como rota de conversão do farnesano atualmente.

Conforme a base de patentes ESPACENET permite a busca por requerente, é feito a busca simples dentre o total de patentes pertencentes à Amyris, Inc./ Amyris, Biotechnologies, Inc. Foi feita a Tabela 1, conforme abaixo, com os dados coletados.

Tabela 1 - Representatividade da Amyris, Inc. na literatura de patentes

	Amyris	Total
Farneseno	194 (41,9 %)	463
Farnesano	8 (72,7 %)	11
Farneseno & Farnesano	3 (60 %)	5

Ref.	Amyris	Solazyme	Neste Oil	Virents	LanzaTech	Gevo
CTNBIO, 2017	X	X				
BOMTEMPO, 2016	X	X			X	X
NEULING, 2014	X		X	X	X	X
CHIAROMONTI, 2014	X	X	X	X	X	
GRANDO, 2013	X	X				

Por fim, considerando tanto fatores econômicos, tecnológicos, científicos e geográficos a Amyris Brasil Ltda possui maior domínio da tecnologia e por isso é escolhida como objeto de estudo de caso. Não bastando representar a maioria das patentes nos dois casos acima, ter planta localizada no Brasil, possuir saúde financeira e representatividade científica e tecnológica. Além que as patentes de farneseno por si só, apesar de não serem maioria, são as mais antigas, indicando a vanguarda de atuação da Amyris Brasil Ltda nessa área e, por tal, possui tecnologias melhores estabelecidas. Contato e agendamento de visita técnica

3.1.2 Comunicação com a Empresa

A partir da escolha com base nos critérios supracitados e com base em referências da literatura (GRANDO, 2013; NEULING e KALTSCHMITT, 2014) procurou-se o contato de um

profissional responsável pela área de Biossegurança da Amyris Brasil Ltda a ser descrito ao longo desse estudo de caso.

O contato com a empresa Amyris Brasil Ltda foi feito via e-mail pelo Professor Orientador responsável. Houve o retorno da funcionária-responsável por Aspectos Regulatórios em Biossegurança e membro-integrante da Comissão Interna de Biosegurança (CIBio), Biol^a. Kelly Seligman. Foi agendado o horário e dia de conveniência para ambos os lados e chegando próximo da data foi confirmado mais uma vez antes de ser feita a viagem.

3.1.3 Elaboração de Questionário

De acordo com BORTOLOSSO *et al.* (2017), dentre os métodos de auditoria em gestão de segurança frequentemente usados, o uso de questionários do tipo *checklist* são os mais simples e nos permitem uma visão geral do conhecimento por parte dos funcionários e gestores das medidas preventivas e de gerenciamento de riscos que são adotadas no ambiente de trabalho, assim como revelar aspectos culturais e de valores da empresa.

Para responder às perguntas dos checklists têm sido utilizadas duas abordagens diferentes: entrevista direta e a entrevista indireta. A liderança exercida pela alta administração influencia os comportamentos dos membros da empresa. Ela consiste na interação profunda entre empregados, trabalhadores, executivos e gerentes (Saracino *et al.*, 2015 apud BORTOLOSSO *et al.*, 2017)

Foi feito a busca por questionários realizados em indústrias de Biotecnologia a partir do documento *Guidelines for Process Safety in Bioprocess Manufacturing Facilities* produzido pelo *Center for Chemical Process Safety* (CCPS), 2011. Dentre os questionários disponíveis no documento, foi orientado o uso daqueles que contivessem respostas objetivas (SIM/NÃO) e fosse adaptado conforme a necessidade do presente estudo em particular.

Dentre os disponíveis o mais próximo desse modelo era o presente no Apêndice G - *Bioprocess Facility Audit Checklist*. A confiabilidade do questionário é satisfatória vista que aborda diferentes temas de Biossegurança e ser confeccionado por profissionais da área ao longo da experiência nesses assuntos.

Após a seleção e tradução ficou um total de 66 perguntas conforme visto no Quadro 6 no fim deste capítulo. O documento foi impresso e levado ao escritório da empresa Amyris Brasil Ltda

situado no Technopark em Campinas, estado de São Paulo, Brasil. As perguntas foram respondidas e quando necessário comentadas de maneira a esclarecer dúvidas.

3.1.4 Realização de visita técnica

Após chegar no Technopark em Campinas no dia 21 de Julho de 2018 às 09:30, a primeira tarefa foi a realização de cadastramento na cabine de segurança da entrada do parque tecnológico. Depois de receber orientações de se apresentar na portaria do prédio, foi feito o contato com a funcionária-responsável pela visita que guiou até as instalações administrativas da AMYRIS BRASIL LTDA.

A visita técnica se dividiu em duas partes com cerca de 90 minutos cada. Primeiramente, no escritório da Biol^a. Kelly Seligman onde foi feita apresentação sobre a empresa, sobre aspectos regulatórios e biossegurança. Ao fim da apresentação, foi possível realizar o questionário por completo dentro do tempo estimado sem grandes divergências com a situação real.

Posteriormente, apresentou-se as instalações da planta piloto que fica em outro prédio afastado em cerca de 200m do escritório. Na unidade produtiva a visita foi guiada pela Biol^a. Bianca Curzio, profissional especialista em assuntos regulatórios e avaliação de risco de OGM. Antes de iniciar, foi feita a vestimenta de EPI apropriado com orientação profissional de um higienista e indicações importantes sobre a planta. Percorreu-se todas instalações *in-door*, incluindo 5 laboratórios, sala do biorreator piloto, do destilador, piso, sobrepiso e intermediações.

Ao final, todo EPI foi devolvido para a equipe, foram feitas considerações finais e arguição com corpo técnico que estava no local no momento. Com o fim das perguntas, foram liberados os funcionários para suas atividades laborais às 12:30 do dia 21 de Junho de 2018.

3.2 ANÁLISE DO ESTUDO DE CASO

Para fins contextualização, o estudo de caso teve início pela compreensão da trajetória da empresa. Para tal, artigos voltados para o mercado de trabalho que abordassem a empresa pela sua administração (GRANDO, 2014) além de fontes públicas da empresa, como o website (AMYRIS, 2017).

Para o estudo do processo produtivo uma fonte bibliográfica maior estava disponível tanto pelos relatórios técnicos da própria companhia (AMYRIS, 2009), como por artigos de periódicos e resumos (NEULING e KALTSCHMITT, 2014), até mesmo por políticas públicas de incentivo ao bioquerosene (EUROPEAN COMISSION, 2013).

O estudo do agente fermentativo foi conduzido através de artigos e resumos do estado da arte que relatassem vantagens e desvantagens do emprego da *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. As principais fontes foram o livro-texto Brauer (-in: REHN e REED, 1995). e os artigos de Brachmann (1998), Caballero-Córdoba e Garbieri (2000).

Já a parte de resíduos e efluentes, reagente e matérias-primas só foi possível encontrar em relatórios técnicos da própria empresa.

3.2.1 Avaliação da resposta ao questionário

As respostas colhidas no dia 21 de Julho de 2018 foram colocadas em planilha para fins de aferição e contagem. As respostas foram respondidas com SIM ou NÃO pela Biol^a Kelly Seligman, entretanto para obter um indicador de eficiência de gestão em Segurança, foram contados os valores de respostas favoráveis, em que há adequação com normas, e os desfavoráveis, em que a ausência daquele recurso pode implicar na ausência ou precarização da adequação perante o arcabouço legal.

É usado como indicador (a) a proporção de respostas positivas para a adequação em relação com as negativas e (b) a porcentagem das últimas em relação ao total de perguntas, desconsiderando as que foram respondidas com “não se aplica” (NA).

3.3 VISITA TÉCNICA EM UNIDADE PRODUTIVA DE FARNESENO

De acordo com LORENA (2016), a visita técnica, ou pesquisa exploratória, tem como objetivo coletar informações sobre o objeto de estudo de modo a providenciar maior conhecimento do processo real, do espaço físico em que ocorre e das operações não explícitas na teoria.

Assim parte deste trabalho envolveu a visita a Amyris Brasil Ltda na cidade de Campinas, o que permitiu maior conhecimento a cerca da empresa e do processo produtivo do farneseno com OGM, estudo de caso deste trabalho.

3.3.1 Anotações

Foram feitas anotações ao longo da visita, realizado arguição com o corpo técnico presente e esclarecido dúvidas. Todas respostas foram anotadas em papel para avaliação posterior.

Quadro 6 – Questionário tipo *checklist* para avaliação de Biossegurança

Checklist de Biossegurança AMYRIS BRASIL LTDA	Sim	Não	NA
Vizinhanças			
Existem vizinhos que não sejam indústrias e comércio?			
É próximo de rodovia, ferrovia, rios, lagos?			
Existem utilidades providenciadas por fontes privadas?			
Existem vizinhos que façam uso de químicos perigosos?			
Recursos humanos			
Existe documento organizando responsabilidades de cada departamento?			
Existe material de treinamento para novos funcionários?			
Existe documentação de treinamento para cada funcionário?			
Existem funcionários terceirizados / temporários?			
Meio ambiente			
Existem metas para prevenção de poluição e minimização de resíduo?			
Aconteceram liberações acidentais de biológicos/ químicos?			
Existe monitoramento de águas subterrâneas?			
Existe equipamento para controle de poluição?			
É realizado algum tipo de emissão aérea?			
É feito tratamento, armazenamento ou liberação de efluente?			
Algum dos acima cria desafios legais (acima de limites estabelecidos na lei)?			
Houve algum relatório de não-acordo feito por qualquer agência do governo?			
Houve algum tipo de inspeção nos últimos anos de agências regulatórias?			
A fábrica possui seguro com cobertura para catástrofes ambientais?			
O processo biológico requer processo de inativação e infraestrutura especiais?			
Manutenção			
A fábrica possui programa de manutenção preventiva para minimizar baixa de equipamentos?			
Algum equipamento usado em produção tem mais de 10 anos de uso?			
Existe um programa de inspeção para tanques?			
Existe um programa de inspeção para vasos pressurizados?			

Checklist de Biossegurança AMYRIS BRASIL LTDA	Sim	Não	NA
Existe um programa de teste de válvulas de segurança e similares?			
A manutenção é terceirizada?			
Existe(m) funcionário(s) responsável(is) por engenharia de confiabilidade?			
Segurança			
A fábrica possui perímetro de segurança?			
A fábrica possui controle de acesso?			
A fábrica possui serviço de vigilância?			
A fábrica possui outros monitoramentos especiais?			
Existe acordo de confidencialidade com os funcionários?			
Armazenamento			
O inventário material é realizado periodicamente?			
Gases comprimidos são armazenados na fábrica?			
Existem tanques de armazenamento subterrâneos?			
Os tanques acima estão sob sistema de contenção?			
Prevenção e Resposta à Emergências			
Houveram casos de incêndio?			
Existe sistema de sprinkler?			
Existem hidrantes?			
Existem extintores de incêndio adequados?			
Existem botões de alarme de incêndio?			
Existe brigada de incêndio local?			
Existe outro sistema contra incêndio especial?			
Possui trabalho com chamas?			
Há treinamento de emergência (uso de extintor)?			
Há simulações de incêndio?			
Existe comunicação entre a fábrica e a comunidade local?			
Existem procedimentos de emergência para apagões?			
Saúde e Segurança			
Existe programa de saúde e segurança documentado?			
Existe programa de gerenciamento de Biossegurança e funcionário			

Checklist de Biossegurança AMYRIS BRASIL LTDA	Sim	Não	NA
responsável?			
Existem matérias primas ou produtos acabados perigosos?			
Existe programa de investigação de incidentes e ações corretivas?			
Houveram afastamentos por lesão recentemente?			
Alguma vez houve fatalidade?			
Alguma agência de saúde e segurança visitou a planta?			
Existem lava-olhos e chuveiro de emergências dispostos?			
Existem recomendações explicadas de uso de EPI?			
Existe análise de riscos de processos documentadas?			
Existe conformidade de área elétrica apropriada?			
Caso exista uso de pós, foi feita avaliação do risco de explosão?			
É exigido aos funcionários tomar ducha antes de terminar o expediente?			
Exposição Ocupacional			
É feito o uso de EPI/ EPC para prevenir exposição de funcionários?			
Existe um higienista industrial da empresa ou terceirizado?			
Existe um profissional de Biossegurança no caso de cultivo em larga escala de OGM?			
É feito o uso de monitoramento de ar em funcionários para limites de exposição?			
É disponível e de fácil acesso os EPI?			
Existe contenção de vazamentos em unidades produtivas?			

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

4.1.1 Histórico da Amyris Brasil Ltda

A Amyris Brasil Ltda possui razão social estrangeira como Amyris, Inc., também conhecida como Amyris Biotechnologies, Inc. A empresa foi fundada em 2003, na cidade de Emeryville, Califórnia, Estados Unidos. Surgiu do meio acadêmico a partir de um grupo de cientistas e pesquisadores da Universidade de Berkeley. Com o conhecimento avançado de Biotecnologia e com o objetivo inicial em produção de compostos químicos sintéticos obtidos por rota biotecnológica seus primeiros projetos eram voltados para indústria farmacêutica (GRANDO, 2013).

A partir do ano de 2005, a companhia ganhou reconhecimento no mercado, após receber uma doação da fundação Bill e Melinda Gates, instituição sem fins lucrativos, no valor de US\$ 42,6 milhões para incentivar as pesquisas do princípio ativo do medicamento terapêutico para pacientes da malária, a partir da produção sintética da artemisina. Originalmente extraído de plantas do gênero *Artemisia*, (nome científico: *Artemisia annua*), este composto se torna excessivamente caro devido ao processo de extração exigente em altas quantidades do vegetal e por seus processos de purificação de alta especificidade.

Utilizando conceitos avançados de Biologia Molecular e engenharia genética, os pesquisadores utilizaram a bactéria *Escherichia coli* como vetor para produção e, a partir daí, sintetizaram quimicamente a artemisina, reduzindo o custo de produção. Por tal feito em manipular o material genético da planta supracitada, foi possível ganhar importância e reconhecimento no setor de Biotecnologia em um curto espaço de tempo.

Em 2008 houve um novo aporte de investimento por parte da Votorantim Novos Negócios (VNN), filial do Grupo Votorantim responsável por negócios em venture capital. Esta se associou à empresa norte-americana Amyris, Inc. para desenvolver um projeto de produção de diesel de cana-de-açúcar. O foco principal passou a ser o desenvolvimento e a produção de isoprenóides (e.g. farneseno), fazendo uso da mesma base de conhecimento, adquirida em experiência anterior, a empresa foi capaz de desenvolver um processo fermentativo inovador que transforma açúcares de origem de matérias-primas sacaríneas em produtos químicos com uma gama extensa de aplicações,

inclusive combustíveis (GRANDO, 2013). Além disso, a Amyris, Inc. tem parcerias importantes de venture capital, como a Total, isso mostra um modus diversificado no que concerne à captação de recursos e que favorece a pesquisa na área de biocombustíveis.

Para atender esta nova demanda, que surgiu com os novos investimentos, a Amyris, Inc. direcionou suas pesquisas na área de manipulação gênica especialmente para microrganismos que fossem mais robustos e eficientes na produção de bicompostíveis do que a bactéria *Escherichia coli* usada a priori na produção de artemisina. Foi escolhido uma cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que sofreu alterações no metabolismo para produção de hidrocarbonetos, por meio da ativação de enzimas da rota do mevalonato na produção de isoprenóides, principalmente o farneseno.

Os investimentos provenientes do período de 2006 a 2008 propiciaram que uma subsidiária no Brasil fosse criada, a AMYRIS BRASIL LTDA, que existe desde 2008 na cidade de Campinas, interior do estado de São Paulo. Sua subsidiária Amyris do Brasil Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis Ltda iniciou suas atividades no Brasil, mediante a formação de uma joint venture com a empresa Crystalsev, em 2008 (GUAZZELLI e PEREZ, 2010). Este acordo será mais bem detalhado em uma seção específica.

A AMYRIS BRASIL LTDA tem a função de desenvolver processos em escala industrial e estabelecer parcerias para produção e comercialização de bioprodutos, especialmente commodities como o diesel. Tem como objetivo o suprimento de matéria-prima e desenvolvimento de produtos para atender mercados específicos, como é o caso do esqualeno, um isoprenóide, desenvolvido para indústria cosmética.

A criação da subsidiária brasileira estava associada à intenção da companhia em proporcionar uma vasta gama de alternativas renováveis para alguns produtos usualmente utilizados, que são em sua grande maioria, oriundos de fontes fósseis. A Amyris Brasil Ltda pretende comercializar estes produtos renováveis em seis mercados consumidores alvo: Cosméticos, Lubrificantes, Fragrâncias e Sabores, Polímeros e Aditivos Plásticos, Produtos de Cuidado Pessoal e com a Saúde e Combustíveis, conforme esquematizado na Figura 6.

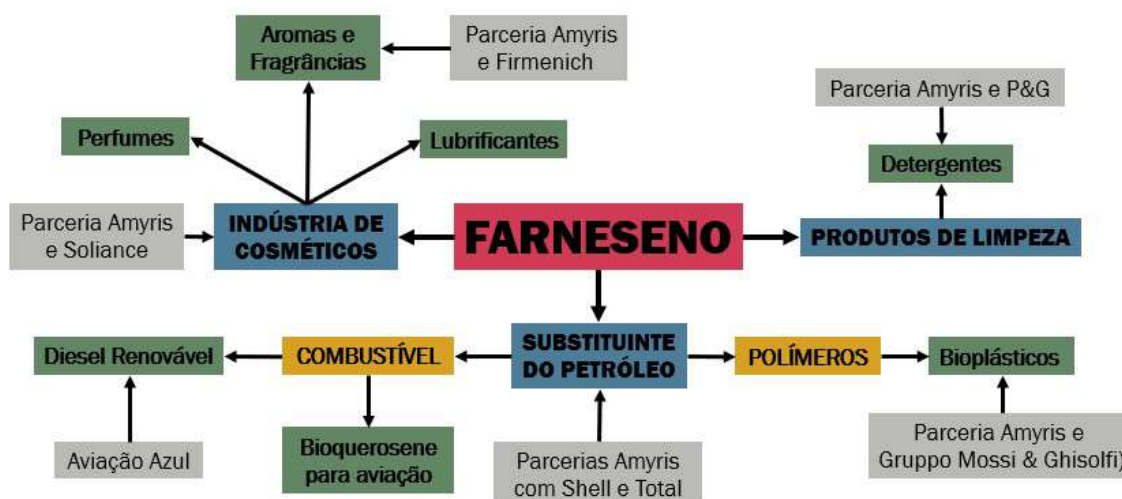


Figura 6 - Árvore de Produtos do Farneseno

Fonte: Elaboração pelo próprio autor

A Amyris Brasil Ltda foi a primeira de uma série de empresas a vir ao Brasil trazendo tecnologia promissora para desenvolver bioprodutos e agregar valor às tradicionais usinas de etanol aqui existentes. Um centro de pesquisa foi construído na região de Campinas. A escolha desta cidade não foi aleatória. O local foi estrategicamente definido por estar próximo da Universidade de Campinas (Unicamp) e também da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) e do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), ambos em Piracicaba (GRUSHKIN, 2013).

4.1.2 Processo produtivo

A Amyris, Inc. tem disponibilizado abertamente seus dados de produção no website por ser uma empresa de capital aberto. De acordo com AMYRIS (2009), o processo de produção pode ser simplificado conforme a Figura 7. Tal processo é conhecido no estado da arte como conversão direta de açúcar para hidrocarbonetos (DSHC), onde a molécula de açúcar fornecida pela natureza é modificada por biocatalisadores a isoprenos da função orgânica dos alquenos.

O processo produtivo tem seu início na obtenção do caldo açucarado – oriundo do sorgo sacarino nos EUA e de cana-de-açúcar no Brasil – que passa por um pré-tratamento. O pré-tratamento inclui a adição de amônia, ou hidróxido de amônio, e ácido fosfórico para essa etapa ajuste de pH e enriquecimento do meio em micro- e macronutrientes, sucessivos de aquecimento para evaporação de água.

Essa etapa não só tem função de adição de reagentes como também tem a função de separação de compostos que precipitem durante a mudança de pH da mistura de caldo açucarado. Dessa forma obtêm-se o meio de caldo de cana que é usado para inoculação, propagação e fermentação. São preparados 250 galões por semana de meio.

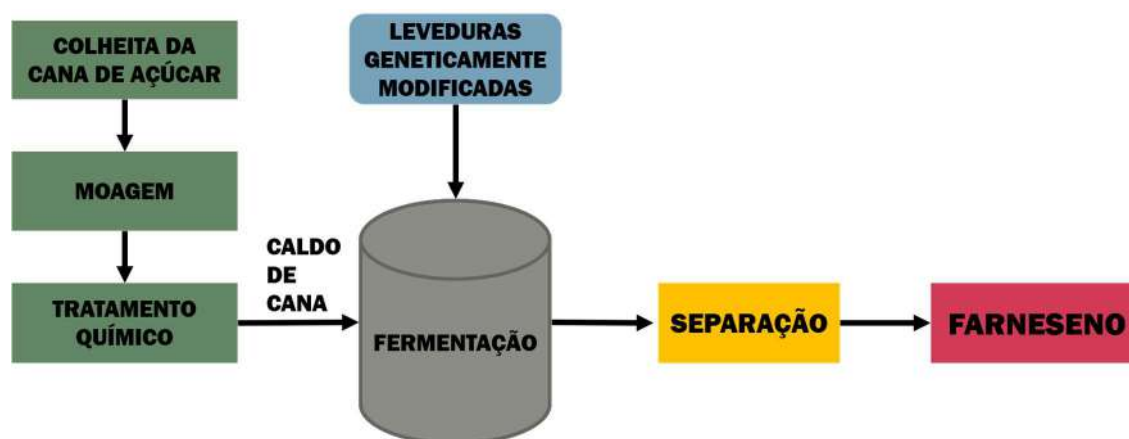


Figura 7 – Diagrama de blocos simplificado da produção de farneseno

Fonte: Elaboração pelo próprio autor

Durante a fermentação aeróbica avançada incluída dentro do processo DSHC da AMYRIS BRASIL LTDA, microrganismos especiais, baseados em leveduras geneticamente manipuladas, convertem moléculas de açúcar em alquenos C15, chamados de farneseno, além de outros produtos secundários, inclusive etanol e glicerol.

Se o querosene for produzido por meio do processo DSHC da AMYRIS BRASIL LTDA, rendimentos de aproximadamente 97% da molécula C15 de farnesano são possíveis, em relação ao carbono da corrente de alimentação. Além desses processos mais industriais, o último relatório de pesquisa exigido para a certificação ASTM de querosene produzido por conversão direta de açúcares foi submetido em fevereiro de 2014 pela Amyris Brasil Ltda e Total Lubrificantes Do Brasil Ltda, no Laboratório de Pesquisa da Força Aérea dos Estados Unidos. A aprovação final na norma ASTM D7566 Apêndice 3 seguiu em junho de 2014. Para o processo de certificação, a Amyris Brasil Ltda opera uma planta de demonstração produzindo aproximadamente 24,000 t / ano de farneseno em Brotas, Brasil.

A complexidade do processo é elevada, devido aos requisitos especiais de fermentação anaeróbica com enzimas especiais dentro da via AMYRIS BRASIL LTDA, principalmente a existência de sistema de patentes para regular o microrganismo transgênico essencial ao processo. Por outro lado, a eficiência de produção de querosene é uma vantagem, em vista da fração obtida de número de carbonos ser equivalente ao querosene, sem ser muito ampla, aumento o rendimento dos processos DSHC.

Semelhante à eficiência da produção de querosene, a eficiência global do processo DSHC avaliado mostra resultados positivos. Entretanto, devido ao estado atual da comercialização em comparação com o processo HEFA, os custos de produção devem ser classificados como um fator negativo e a maturidade do mercado é incompleta em vista de pequenas plantas de pequenas escalas para a produção em operação no Brasil e nos Estados Unidos, conforme visto abaixo na Figura 8 Mas pelo fato de que o combustível ser certificado pela ASTM e ter os contratos de compra, está em progresso com alto potencial para atingir maturidade tecnológica.

Em vista de desenvolvimento potencial, uma vez que apenas duas plantas estão operando com potencial de matéria-prima ainda restrito, atualmente é visto que maiores variedades das mesmas podem ser testadas e implementadas havendo um potencial de desenvolvimento vasto.



Figura 8 – Escalas de produção existentes atualmente na AMYRIS BRASIL LTDA

Fonte: AMYRIS (2009)

4.1.3 Agente Fermentativo

A cepa Y1979 é derivada da linhagem PE-2, oriunda da Usina da Pedra, isolada e identificada em 1994. É utilizada na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil em cerca de 30% das usinas do país sendo responsável, portanto, por 10% do etanol produzido no mundo. A importância econômica desta linhagem estimulou sua caracterização genética completa sendo seu genoma recentemente sequenciado (Argueso *et al.*, 2009).

4.1.4 Reagentes e matéria-primas

Em questão de matéria-prima necessária, os processos atualmente desenvolvidos geralmente utilizam matéria-prima contendo amido e açúcar, sendo restritos, pois tais são facilmente transformados em açúcar e são de uso em alimentação. Mas em teoria, se a tecnologia estiver disponível em larga escala, a biomassa lignocelulósica também pode ser processada. Volume de matérias-primas utilizadas atualmente pela empresa por tipo de biomassa estão ilustrados abaixo na Figura 9. O açúcar é uma molécula comumente disponível na natureza. O caminho mais fácil e mais comum é por meio da extração de açúcar de culturas energéticas como cana-de-açúcar ou beterraba.

Com rendimentos médios da cana-de-açúcar de aproximadamente 80 t / (ha.ano) representando que cerca de 11 t / (ha.ano) de açúcar de cana podem ser obtidos. Com um rendimento médio de trigo de 8 t / (ha.ano) na Alemanha, aproximadamente 1,3 t / (ha.ano) o açúcar pode ser produzido por liquefação de amido por sacarificação. Em 2011, o preço médio da cana-de-açúcar foi de 2,9 US\$ / GJ, 9,7 US\$ / GJ para trigo, enquanto que o açúcar foi negociado por um preço médio de 15,6US\$ / GJ em 2011 (UNICA, 2015).

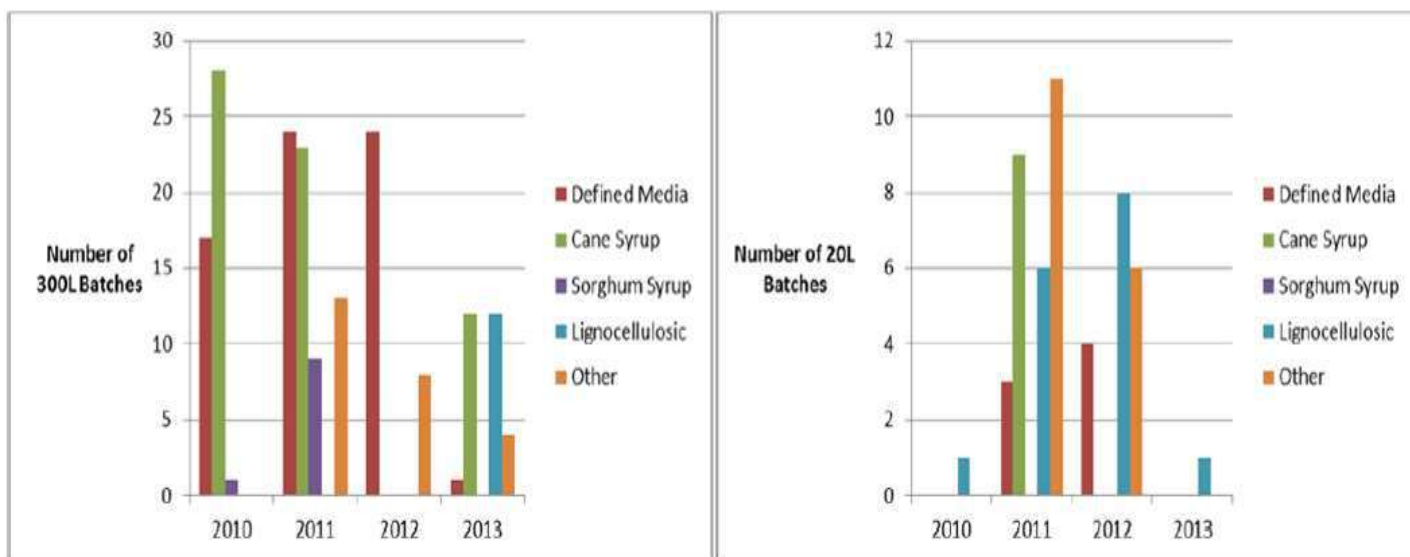


Figura 9 – Matérias primas utilizadas na unidade piloto americana

Fonte: AMYRIS (2009)

Além das matérias primas, intermediários e produtos, se fazem necessários outros suprimentos básicos para funcionamento e operação da planta. De acordo com Amyris (2009), as

utilidades da planta de produção de farneseno e suas respectivas especificações de uso estão listadas abaixo na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista de utilidades da planta.

Utilidades da planta	Especificações
Água de Processo	Processada em sala das máquinas a 75000 BTU/h (80 MJ/h)
Água de Sanitários e Ventilação	N/A
Água deionizada	N/A
Água Encanada	N/A
Água resfriada	10-12 °C processada por trocador de calor tipo <i>chiller</i>
Ar Comprimido	15,5 ft ³ /min (7,3 L/s)
Energia	N/A
Gás Hidrogênio	0,01 ft ³ /min (0,5L/s)
Gás Natural	2 psig (0,14 atm)
Gás Nitrogênio	725 psig (50 atm) ou 90 psig (6 atm)
Vácuo	45 ft ³ /min (21 L/s) a 0,9 atm
Vapor	60-85 psig (4 - 6 atm) produzido por aquecedor (9,5 BPH / 71 kW)
Vapor estéril	400 lbs/h (3,0 kg/min) a 40 psig (2,5 atm)
Vapor para esterilização	100 – 110 psig (6,5 – 7,5 atm) a 310 lbs/h (140 kg/h) sem tratamento químico

Fonte: Adaptado de AMYRIS (2009)

4.1.5 Resíduos e efluentes

Todos líquidos drenados são destinados ao tratamento. Vapores produzidos de autoclaves, fermentadores e equipamentos do processo são condensados e então drenados. Todos geradores de vapor não funcionam em ciclo fechado para evitar contaminação dos aquecedores responsáveis pelo fornecimento de vapor estéril.

O tratamento consiste em neutralizar o efluente total ao pH superior a 6,0 e inferior a 9,0. Após isso, a inativação dos microrganismos viáveis ocorre pelo aquecimento precedendo o descarte por uma companhia licenciada. Além disso, todo ar que sai do reator é filtrado em filtros submicron com diâmetro de poro nominal de 1,2 μm (AMYRIS, 2009).

4.2 AVALIAÇÃO TÉCNICA DA EMPRESA

Foram obtidas informações a partir do relatório técnico Amyris (2009), na visita técnica e questionário adaptado de CCPS (2011). De forma a organizar a informações e analisar em sequência lógica, foi realizado a avaliação conforme sequências de ações da Figura 10 abaixo que foi elaborada pelo próprio autor. Os dados obtidos em pesquisa e em campo foram de uso apenas para identificar riscos e inferir medidas de Biossegurança e higiene ocupacional para gerenciamento e prevenção de riscos.



Figura 10 -Fluxograma em Gestão de Segurança de Processos

Fonte: Elaboração pelo próprio autor

Para fins do presente trabalho, não serão realizados métodos quantitativos e qualitativos de análise de risco visto que o mesmo exigiria dados de frequência de acidentes ou incidentes que não foram fornecidos.

4.2.1 Definição do Cenário

O cenário se refere a descrição dos eventos que resultam em um acidente ou incidente. Deve conter informação relevante para definir causas principais (CROWL, 2002). Foram estabelecidos na metodologia por meio de estudo de caso, visita técnica e questionário as variáveis envolvidas no processo. A fim de resumir as três metodologias foi feita a listagem de pontos a serem abordados da planta no Quadro 7.

O cenário definido visa incluir a cadeia de processo produtivo que existe atualmente na planta piloto da Amyris Brasil Ltda e as variáveis consideradas relevantes para a maioria dos dados coletados pelas metodologias realizadas e explicadas no capítulo anterior. A relevância foi definida como elemento presente simultaneamente no relatório técnico, na área de visitação e nas respostas do questionário.

Desse modo elementos técnicos do processo não presentes na visitação ou que não se apliquem ao questionário não serão levados em consideração de modo a focar nos elementos que estão de fato na presença dos operadores e do gerenciamento dos representantes da Comissão Interna de Biossegurança.

Quadro 7 - Definição do cenário a partir dos resultados do estudo de caso

		Cenário do Estudo de Caso Da AMYRIS BRASIL LTDA			
		E.C	V.T.	Q	OK?
Todas Variáveis Do Processo Produtivo	Ácido fosfórico	Presente	Presente	Ausente	<u>Sim</u>
	Amônia	Presente	Presente	Ausente	<u>Sim</u>
	“Bottom”	Ausente	Ausente	Presente	Não
	Caldo de cana	Presente	Presente	Presente	<u>Sim</u>
	Caldo de sorgo	Presente	Ausente	Ausente	Não
	Farneseno	Presente	Presente	Presente	<u>Sim</u>
	Levedura GM	Presente	Presente	Presente	<u>Sim</u>
	Gás Hidrogênio	Presente	Ausente	Presente	Não*
	Gás Nitrogênio	Presente	Ausente	Presente	Não*
	Etanol	Presente	Ausente	Ausente	Não
	Vinhaça	Presente	Presente	Presente	<u>Sim</u>
	E.C = Estudo de Caso V.T. = Visita Técnica Q = Questionário *Variáveis de processo localizadas fora da planta				

Fonte: Elaboração pelo próprio autor

Como era esperado, o processo relatado por Amyris (2009) diferencia do processo observado devido às diferenças no processo. Também salienta-se que algumas variáveis apesar de presentes fisicamente não foram visitadas, como é o caso do armazenamento de gases hidrogênio e nitrogênio.

4.2.2 Identificação de Riscos

A partir do processo descrito no capítulo anterior, são averiguados os riscos conforme classificação descrita na revisão bibliográfica.

4.2.2.1 Riscos Físicos

De acordo com o equipamento descrito por Amyris (2009), foram descritas as etapas de risco físico identificadas. Um dos principais riscos físicos em meio industrial é o ruído. A permanência em um lugar com altos níveis de exposição ao ruído pode gerar consequências auditivas como deficiências, ou até perda de audição.

A principal fonte de ruído encontrada no processo é a centrífuga utilizada em duas etapas, primeiramente na separação líquido-líquido, onde a fase oleosa rica em farneseno que se encontra na superfície é separada. E posteriormente na separação sólido-líquido para fins de separação de microrganismos como principal elemento do corpo de fundo.

De acordo com WHO (n.d.), o motor de uma centrífuga de potência 1000 kW operando em 3600 min⁻¹ é capaz de gerar o equivalente a 106 dB sem contenção. Felizmente os equipamentos modernos são projetados para isolar acusticamente em algum nível o motor elétrico do aparelho. No pior dos casos, funcionando no máximo de produção de ruído, o tempo máximo de exposição diária de um funcionário seria de 3,75 minutos (FUNDACENTRO, n.d.). Entretanto para a jornada média de 8 horas diárias, o ruído deve se adequar a 85 dB, ou menos, como pode ser visto na Tabela 3 abaixo.

Outro risco físico significativo é o calor gerado de equipamentos como autoclave, para esterilização de meio, equipamento UHT, para esterilização de efluentes, e destilador, para purificação do farneseno. Imagens de ambos equipamentos estão na Figura 11 abaixo. De acordo com Amyris (2009), as temperaturas de operação desses equipamentos são respectivamente 130 a

135 °C (UHT/HTST), aproximadamente 120 °C (vapor saturado da autoclave em 40 psig) e 100 a 140 °C (destilador).



Figura 11 - Equipamento UHT (esquerda) e destilador (direita)

Fonte: AMYRIS (2009)

De acordo com as temperaturas de operação, uma carga muito alta de calor é emanada para o ambiente de trabalho. A temperatura do ambiente no pior dos casos não deve ultrapassar a faixa entre 27,5 a 32,5 °C como pode ser visto no Quadro 8.

Quadro 8 - Temperaturas limites para ambiente de trabalho por tipo de atividade

Taxa de atividade	Carga de trabalho			
	Leve	Moderada	Pesada	Muito Pesada
75 a 100%	31,0 °C	28,0 °C	N/A	N/A
50 a 75%	31,0 °C	29,0 °C	27,5 °C	N/A
25 a 50%	32,0 °C	30,0 °C	29,0 °C	28,0 °C
0 a 25%	32,5 °C	31,5 °C	30,5 °C	30,0 °C

Fonte: OSHA (n.d.)

Com a observação de que os limites estabelecidos nesta norma são válidos apenas para trabalhadores saudáveis, com reposição de água e sais perdidos durante sua atividade.

4.2.2.2 Riscos Químicos

Para fins de obter informações sobre os produtos químicos conhecidos de uso padrão foram usados os capítulos 2, referente a Identificação de Perigos, das Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) conforme vistas abaixo.

4.2.2.2.1 Ácido Fosfórico

O ácido fosfórico possui grau de toxicidade e de corrosão/irritação à pele significativos. Dentre tais, a categoria com maior gravidade é a toxicidade aguda dérmica. Conforme a Norma ABNT-NBR 14725-2 (2009), o contato à pele com 350 g de ácido fosfórico expostos à pele levam a morte de 1 a cada 2 trabalhadores (ABNT, 2009).

Segundo Wallau e Santos (2009), oferece perigo se ingerido, se em contato com a pele provocando queimadura severa e dano aos olhos, podendo também provocar irritação das vias respiratórias. É orientado evitar inalar os vapores oriundos do reagente. Os pictogramas do ácido fosfórico são conforme a Figura 12 abaixo.



Figura 12 - Pictogramas da FISPQ do ácido fosfórico

Fonte: ICL BRASIL LTDA, 2013

O pictograma à esquerda da Figura 12 indica que a substância é corrosiva e que pode provocar queimaduras graves na pele e danos nos olhos. Também é corrosiva para metais. O pictograma à direita da Figura 12 significa uma ou mais das seguintes características: (a) Extremamente tóxico (nocivo); (b) Provoca a sensibilização cutânea e irritação cutânea e ocular; (c) Irritante para as vias respiratórias; (d) Narcótico, provoca sonolência ou tonturas; e/ou (e) Perigoso para a camada de ozônio (ECHA, n.d.).

4.2.2.2.2 Amônia

A amônia possui grau de toxicidade, corrosão/irritação à pele, sensibilização respiratória e perigo ao ambiente. Dentre tais, a toxicidade aguda oral é a de maior gravidade. Segundo a norma, a ingestão de 140 g de solução de hidróxido de amônia no estado gasoso é o suficiente para levar à óbito 1 em cada 2 operadores expostos (ABNT, 2009).

Além disso, provoca queimadura severa à pele e dano aos olhos, danos ao sistemas respiratório causando sintomas alérgicos, de asma, ou dificuldades respiratórias. Quando liberado ao meio ambiente é muito tóxico para os organismos aquáticos, com efeitos prolongados (WALLAU e SANTOS, 2009).

Os pictogramas indicados para o hidróxido de amônio também tornam a atenção à corrosividade e toxicidade com o acréscimo do perigo ao meio ambiente devido ao alto potencial de mortalidade para a vida aquática quando liberado no meio ambiente (ECHA, n.d.). Os pictogramas da amônia são conforme a Figura 13 abaixo.



Figura 13 - Pictogramas da FISPQ da amônia

Fonte: QUIMIDROL, 2015

4.2.2.2.3 Caldo de cana-de-açúcar

O produto não possui FISPQ e possui componente principal a sacarose, que de acordo com a FISPQ encontrada, não é classificada como perigosa pela ONU e nem pela CE. Quando em pó, em caso de vazamento pode causar irritação nas mucosas nasais. O produto não é inflamável, combustível, ou explosivo e tem baixa toxicidade oral e dérmica. É pobremente absorvido pela pele, não ocasionando problemas no contato.

Por ser de origem natural e de uso padrão em indústria alimentícia, conclui-se que o caldo de cana-de-açúcar não oferece riscos aos operadores ao meio ambiente como produto in natura, i.e., sem a adição dos outros reagentes.

4.2.2.2.4 Farneseno

O farneseno, composto natural da classe dos sesquiterpenos, é um produto amplamente disseminado na natureza. Em dose elevadas pode ser tóxico. O laboratório independente *MB Research* foi contratado para avaliar aspectos de segurança relacionados ao farneseno resultante da fermentação realizada pela cepa de levedura GM.

O farneseno é uma substância combustível com propriedades irritantes. O risco biológico da cepa geneticamente modificada é classe I, i.e., não apresenta risco à saúde humana nem ao meio ambiente. Entretanto o volume aplicado eleva o Nível de Contenção de Biossegurança para grau 2. Ambos apresentam baixa toxicidade como descoberto por testes da Amyris.

Foram avaliados a toxicidade oral aguda, toxicidade dérmica aguda, irritação aguda ocular, sensibilização dos linfonodos e mutagenicidade. Em todos os casos, os resultados sugeriram que o farneseno é, em geral, bem tolerado e não é mutagênico. A dose letal média (DL50) do farneseno em ratos foi determinada como sendo superior a 5000 mg/Kg de peso. A aplicação desta dose na pele foi feita em coelhos e não houve reação dérmica em 24 horas, com pequena resposta no sétimo dia e mais fraca ainda após 15 dias. Assim, quanto à substância pura farneseno e prevendo possíveis exposições acidentais, foram avaliados aspectos relacionados aos itens 7 (análise imunológica e histológica), 8 (possível efeito tóxico) e 9 (avaliação toxicológica).

O perigo maior consta na sua ingestão. Possíveis efeitos irritantes em pele como coceira, entretanto não possui testes completos. Baixos perigos de inalação e sem solubilidade em ambientes aquáticos não havendo nenhuma toxicidade aguda registrada em níveis superiores ou iguais à sua solubilidade na água (ABNT, 2009).

O pictograma presente na FISPQ do farneseno está ilustrado na Figura 14 abaixo. Esse indica que a substância tem as possíveis propriedades: (a) cancerígena; (b) afeta a fertilidade; (c) mutagênica; (d) tóxica para órgãos específicos (ECHA, n.d.).



Figura 14 - Pictogramas da FISPQ do farneseno

Fonte: AMYRIS, 2013

4.2.2.2.5 Vinhaça

A “vinhaça” é o termo jargão da indústria sucroalcooleira para efluentes líquidos oriundos da separação líquido-líquido após a etapa de fermentação. No caso da Amyris Brasil Ltda todos os efluentes após fermentação são misturados e designados como vinhaça. Portanto, os perigos são os mesmos que oferecidos pelos componentes anteriores só que mais diluídos.

4.2.2.3 Riscos biológicos

Diversos trabalhos realizados na área de segurança de processos existem para indústrias químicas tradicionais, como petróleo, gás natural e produção de plásticos, entretanto outras indústrias têm surgido, e.g. biofarmacêutica, trazendo cenários diferente e por consequência novos riscos a serem identificados saindo da zona de conhecimento bem estabelecida e exigindo maior multidisciplinaridade por parte dos profissionais de segurança.

A Diretiva Européia 2000/54/CE (EUROPEAN PARLIAMENT, 2000) tem por objetivo a proteção dos trabalhadores de riscos à segurança e saúde dos mesmos pela exposição a agentes biológicos no ambiente de trabalho. Tal diretiva se aplica a indústria de alimentos, agrícola, saúde, laboratórios, tratamento de resíduos e efluentes.

4.2.2.3.1 Levedura GM

O organismo biológico utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. O órgão norte americano NIH considera este microrganismo tão seguro que dispensa certos procedimentos de avaliação de risco. Sua patogenicidade era considerada nula até que casos muito raros de presença de *S. cerevisiae* foram descritos em isolados clínicos de indivíduos com

extrema deficiência imunológica. Também há raros relatos de alergia principalmente em trabalhadores em panificação.

Este organismo é um representante clássico da categoria GRAS (“generally recognized as safe”) sem restrição para o consumo humano, segundo o FDA, presente na produção de bebidas e pão. A confiança em sua segurança levou também o NIH a liberar experimentos com a levedura da maior parte de suas restrições, e a EPA a isentar a *S. cerevisiae* da maior parte das cláusulas previstas no *Toxic Substance Control Act* (legislação americana que regula a introdução de novos produtos químicos no mercado).

Entretanto por se tratar de um organismo geneticamente modificado, os riscos da exposição humana são em parte desconhecidos, ou no mínimo, passível de reações imunológicas adversas. Uma série de experimentos se fizeram necessários para examinar possíveis efeitos adversos face á possível exposição acidental de trabalhadores. A *CanTox*® do Canadá foi contratada pela Amyris Brasil Ltda para um estudo dos genes expressos nesta levedura e do gene heterólogo, buscando sua possível semelhança com alérgenos e toxinas conhecidas (BRASIL, 2010). Não se encontrou qualquer indicação na literatura que sugira a associação entre a expressão dos genes da via do mevalonato e um aumento de patogenicidade ou/e virulência ou alergenicidade da levedura notadamente.

Os estudos da *CanTox*® demonstraram não haver base biológica para efeitos no sistema imunológico ou toxicidade além do organismo não se destinar ao consumo como alimento. Por esta levedura ou o biodiesel resultante da fermentação industrial não se destinarem ao consumo humano ou animal os estudos de ingestão não se fizeram necessários. Portanto as recomendações estudos de desempenho nutricional, digestibilidade e estabilidade das proteínas expressas, e potencial teratogênico, não se aplicam ao agente fermentativo em questão.

4.2.3 Medidas de Biossegurança

Visando gerenciar os riscos químicos, físicos e biológicos, foram englobados um compilado de ações para minimizar os riscos adventícios do processo relatado.

4.2.3.1 Riscos Físicos

Em relação à exposição ao calor, o funcionário deve ser acompanhado mediante orientação e controle médico, além de fornecer uniforme adequado, com o uso de vestimentas tradicionais, compostas por calça e camisa de manga longa ou macacão de tecido simples, que permitam a circulação de ar junto à superfície do corpo e viabilizem a troca de calor com o ambiente pelos mecanismos da convecção e evaporação do suor.

O ambiente deve possuir ventilação adequada para troca térmica e minimização do acúmulo de calor no ambiente. Caso possível ser feita a instalação de ar condicionado com termostato para maior controle. Dispôr de bebedouros e área aberta para intervalos regulares do trabalhador evitando assim hipertermia.

Quanto ao ruído se faz necessário protetor auditivo tipo concha ou similar com fator de proteção adequado ao nível de ruído a que está exposto o trabalhador.

4.2.3.2 Riscos Químicos

Como medida de proteção coletiva, na utilização dos produtos químicos deve-se promover a ventilação mecânica e sistema de exaustão direta para o meio exterior. Estas medidas auxiliam na redução da exposição ao produto e manter as concentrações atmosféricas, dos constituintes do produto, abaixo dos limites de exposição ocupacional.

Nos locais onde se manipulam produtos químicos deverá ser realizado o monitoramento da exposição dos trabalhadores, conforme PPRA (Programa de Prevenção de Riscos Ambientais) da NR-9. O local deverá dispôr de chuveiro de emergência e lava-olhos.

Os EPI necessários são (QUIMIDROL, 2015; ICL BRASIL LTDA, 2013; AMYRIS, 2013):

- ✓ Vestuário protetor completo resistente a ácidos. O material de proteção da pele deve ser suficientemente impermeável e resistente a produtos corrosivos (ácido fosfórico e hidróxido de amônio);
- ✓ Equipamentos de proteção respiratória com filtro contra vapores/névoas. Máscara panorama com filtro contra gases ácidos ou multi-uso. Em grandes concentrações utilize máscara autônoma. O seguinte filtro é recomendado: filtro de partículas P2 ou P3;
- ✓ Óculo de proteção com abas laterais, óculos de proteção aderentes ou face completa caso necessário;

✓ Luvas de proteção (Permeação tempo > 8 horas): borracha natural/látex natural (0,5 mm) (uso não em pó e produtos livres de alérgenos); policloropreno (0,5 mm); borracha nitrílica/nitrilo látex (0,35 mm); borracha butílica (0,5 mm); fluoro carbono borracha (0,4 mm); ou policloreto de vinila (0,5 mm).

4.2.3.3 Riscos Biológicos

A CTNBio regulamenta o trabalho em grande escala por instruções normativas, sendo a mais recente a Resolução Normativa Nº 18, de 23 de março de 2018. Conforme Art 3º, parágrafo XI, se enquadram em Grande Escala todo cultivo e/ou manipulação de OGM em contenção cujo volume de cultivo, no caso de microrganismos, seja superior a 100 litros para OGM pertencente a Classe de Risco 1, e 10 litros para OGM pertencente às Classes de Risco 2, 3 e 4.

No caso da AMYRIS BRASIL LTDA, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui classe de risco 1 e o volume da planta piloto é de 300 litros, o maior dos biorreatores. Sendo assim, as medidas de contenção da presente Resolução Normativa se aplicam a tal, em particular, o nível de Biossegurança em grande escala 1 (NBGE-1) deve ser adotado.

De acordo com o capítulo VI de CTNBio (2018), atividades e projetos em contenção envolvendo cultivo ou manipulação de OGM em grande escala devem seguir as normas de Biossegurança. São atividades citadas do Artigo 11 a 15 (NBGE-1):

- ✓ manter um programa de vigilância da saúde de todos os trabalhadores que atuam nas instalações que mantêm atividades com OGM;
- ✓ realizar exames clínicos com periodicidade anual;
- ✓ incluir indicadores para monitoramento de longo prazo, tais como a constituição de banco de sorologia com marcadores específicos, quando disponíveis, para fins de vigilância epidemiológica;
- ✓ providenciar manual de procedimentos e treinamento da equipe técnica e de apoio para assegurar que o OGM seja manipulado com segurança e que a área de trabalho seja mantida limpa e organizada;
- ✓ estabelecer um plano de contingência, incluindo medidas adequadas para conter e neutralizar derramamentos;
- ✓ manipular OGM em sistema fechado ou em instalação de contenção;

- ✓ conduzir toda adição de material a um sistema, a coleta de amostras e a transferência de líquido de cultura dentro de sistemas ou entre eles de forma a minimizar a formação de aerossol ou a contaminação de superfícies expostas no ambiente de trabalho;
- ✓ filtrar em filtro HEPA gases de exaustão removidos do sistema fechado ou de equipamentos de contenção ou por um procedimento equivalente.
- ✓ abrir qualquer sistema fechado ou equipamento de contenção, que contiver OGM viável, somente após esterilização adequada
- ✓ traçar planos de emergência incluindo métodos e procedimentos adequados para eventuais derramamentos, acidentes e perdas de cultura de OGM;
- ✓ afixar o símbolo universal de risco biológico nos sistemas fechados e em equipamentos de contenção, quando utilizado para a contenção de OGM; e
- ✓ comunicar qualquer derramamento ou acidente que resulte na exposição ao OGM ao Técnico Principal, à CIBio, à CTNBio e às autoridades competentes.

Segundo o relatório técnico da AMYRIS BRASIL LTDA, o biorreator é equipado com condensadores e filtros HEPA para conter componentes voláteis e OGM. O meio de materiais inflamáveis, combustíveis e corrosivos necessários para o processo são armazenado em um armazém classe 1 divisão 2 com paredes de contenção de fogo tipo 2-horas (CTNBio, 2010).

O processo produtivo, desde a alimentação do pré-fermentador (que é o tanque para multiplicação e preparo do inóculo), passando pela alimentação das dornas de fermentação, até as centrífugas de separação, é feito em sistema absolutamente fechado, cujo fluxo se dá por tubulações e bombas de alimentação. As leveduras oriundas do processo fermentativo são recicladas e retroalimentam as dornas (CTNBio, 2010).

4.2.4 Resíduos e efluentes

Conforme instruído no parecer da CTNBIO (2010), a fermentação se procede em sistema de reatores fechados, cujo objetivo é minimizar o risco ambiental. A biomassa produzida durante esse processo é inativada antes de ser descartada. A Amyris Brasil Ltda produz o farneseno em unidades próprias e atualmente licencia a tecnologia para terceiros.

Durante o processo fermentativo na indústria se leva em consideração os riscos de escape da levedura GM ao ambiente. As células se multiplicam vegetativamente nos fermentadores e a

empresa adota um protocolo no qual a linhagem GM é inativada por calor, gerado por vapor a altas temperaturas, após a fermentação. Isto visa minimizar a liberação de células vivas no ambiente industrial.

De acordo com o Art 13, parágrafo único (CTNBio, 2018):

Antes de qualquer descarte, o OGM, seus derivados e os efluentes sólidos e líquidos devem ser inativados para impedir sua replicação ou multiplicação e potenciais efeitos adversos à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Parágrafo único: A inativação deve ter sua eficácia comprovada. A comprovação deverá ser periódica através de amostragens, cujos resultados devem ser apresentados no relatório anual. O período entre as amostragens dependerá do intervalo entre os descartes e deverá ser autorizado pela CIBio, no caso de OGM da classe de risco 1, e pela CTNBio no caso das demais classes de risco. (CTNBIO, 2018)

A Amyris Brasil Ltda adotou a inativação após a fermentação pelo uso de vapor superaquecido gerado com facilidade em sua planta em unidade UHT. Este equipamento efetivamente mata as leveduras e não deixa resíduos ambientalmente agressivos. A cepa transgênica deixa de se multiplicar quando aquecida a 66°C por 120 s, independente se suspensas em água ou em vinhaça. Na produção a Amyris Brasil Ltda faz uso temperaturas bem superiores garantindo completa segurança de inativação uma vez que o calor gerado no processo industrial é da ordem de 120°C, isto garante, na prática, a morte de 100% das células (BRASIL, 2010).

As células excedentes e todo o efluente de fermentação (que é conhecido por vinhaça) após inativadas por calor são conduzidos para fora da fábrica para disposição final. Atualmente a aplicação mais comum da vinhaça pós-tratamento térmico é na fertirrigação na área agrícola de Brotas, São Paulo. Outra alternativa é o uso da levedura GM após inativação na ração animal.

4.3 AVALIAÇÃO DO QUESTIONÁRIO

Houve 4 vezes mais respostas positivas para a adequação frente às respostas negativas, que se refere a 80% das perguntas aplicáveis ao caso.

4.3.1 Vizinhanças

A Amyris Brasil Ltda começou sua obra em um terreno afastado de rios e lagos de vizinhos que não fossem indústrias e comércio, porém a quase de 1 km da rodovia SP-197 (Rod. Dr.

Américo Piva). A sua localização é estratégica devido ao uso de utilidades fornecidas por fontes privadas localizadas nas vizinhanças, entretanto nenhuma dessas fontes faz uso de químicos perigosos.

4.3.2 Recursos Humanos

A companhia faz arquivos de todos treinamentos realizados com os funcionários desde o seu início no Brasil além de possuir material de elaboração própria. Outro documento importante que a empresa dispõe é a relação de organização interna que distribui as responsabilidades por departamento. Existem funcionários terceirizados na planta que estão sobre a mesma gestão dos funcionários da empresa.

4.3.3 Meio Ambiente

A Amyris Brasil Ltda trabalha com metas para prevenção de poluição e minimização de resíduos, inclusive fazendo uso de equipamentos para controle de poluição, e.g. filtros nas saídas de vapores e lavador de gases, havendo emissões aéreas limpas e não possuindo antecedentes em grandes liberações acidentais de biológicos e/ou químicos ao meio ambiente. Quanto aos processos biológicos, estes recebem infraestrutura especial para realização de inativação.

Existem efluentes sendo produzido na planta porém são armazenados e tratados no local. Dentre eles nenhum cria desafios legais por estar acima dos limites estabelecidos pela lei e, por tal, nunca houve quaisquer relatórios de não-adequação realizado por agências do governo. Anualmente a planta recebe a inspeção de agências regulatórias distintas representando o Ministério do Trabalho, o Ministério do Meio Ambiente e o Ministério da Saúde. A planta está coberta por seguradora(s) em caso de catástrofes ambientais.

4.3.4 Manutenção

A fábrica possui programa de manutenção preventiva para minimizar a baixa de equipamentos, não possuindo equipamentos com mais de 10 anos de uso. A equipe de manutenção é composta de funcionários da própria empresa e conta com especialistas em confiabilidade técnica. Existe um programa de inspeção de tanques, vasos pressurizados, válvulas de segurança e similares realizado periodicamente. É importante apontar que em toda troca de campanha, e.g. mudar a produção de *Biofene*TM para *Biossance*TM, é feito a avaliação dos equipamentos operacionais.

4.3.5 Segurança

Toda a unidade produtiva está sob um perímetro de segurança com acesso controlado e serviço de vigilância. Há acordo de confidencialidade com os funcionários e terceirizados. Outros tipos de monitoramento também são realizados.

4.3.6 Armazenamento

O inventário de material é realizado periodicamente. Tanques de armazenamento de gases comprimidos são dispostos do lado de fora da fábrica estando todos sob sistema de contenção.

4.3.7 Prevenção e Resposta à Emergências

Nunca ocorreram incêndios nas instalações e não fazem uso de trabalhos com chamas. Sistemas antichamas, geradores para queda de energia, alarmes de incêndio estão instalados, hidrantes disponíveis e extintores de incêndio estrategicamente dispostos e adequados ao seu uso.

Há uma brigada de incêndio local composta dos funcionários que realizam simulações de emergência que inclui tempo de evacuação do prédio e treinamento sobre uso dos extintores. No caso de ocorrer um evento emergencial, há uma linha de comunicação com a comunidade local.

4.3.8 Saúde e Segurança

Existe o programa de saúde e segurança *SAFE START* documentado na empresa, assim como a organização da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) que fica responsável pelo gerenciamento em Biossegurança e comunicação com a CTNBio. Não foram relatados nenhuma matéria-prima ou produto acabados com periculosidade significativa, entretanto investigações seguem sendo feitas.

O programa inclui mapear incidentes e tomar ações corretivas. Não houveram afastamentos por lesão recentes nem fatalidades desde a instalação. Diversas vezes houve a visita de agências de saúde. Possuem à disposição equipamentos de proteção coletiva, como lava-olhos, chuveiro, etc, e equipamentos de proteção individual, como capacetes, protetores auriculares, etc. Todos EPI/EPC estão anexos às recomendações de uso.

Outros documentos como análise de riscos e mapa de riscos estão expostos ao público. As instalações elétricas estão em conformidade e é feita análise de explosividade. Não é exigido ducha após o expediente.

4.3.9 Exposição Ocupacional

Há um funcionário especialista em Higiene Ocupacional, os EPI/EPC são regulados por tal profissional que os disponibiliza e estão de fácil acesso. Também há um funcionário especialista em Biossegurança para validação com a CTNBio das instalações laboratoriais e produtivas com OGM. É feito monitoramento do ar com placas para verificar se há crescimento dos microrganismos GM. Por fim, a unidade produtiva possui contenção para caso de vazamentos.

4.4 AVALIAÇÃO DA VISITA TÉCNICA

Na entrada da visita há uma placa indicando número de dias sem acidentes que constava em 714 dias sem acidente (21 de Junho de 2018). A técnica me confirmou o acidente sendo de natureza mecânica, algum funcionário teria prendido a mão na porta ficando poucos dias afastado.

Espaço físico: Em relação a instalações laboratoriais, a planta consiste de 5 unidades separadas por paredes dry-wall parcialmente em material vítreo transparente para permitir visibilidade pelo lado externo e com entrada de porta simples. Um esboço ilustrativo foi feito abaixo na Figura 15. As unidades produtivas fazem uso de todo o pé-direito da instalação, tendo maior altura do que os laboratórios. Algumas possíveis irregularidades foram observadas, como: ralos abertos - risco de Acidentes (Mecânico ou entrada animais); espaços apertados – Risco de Acidentes e Risco ergonômico (Mecânico); andar elevado – Risco de Acidentes (Mecânico);

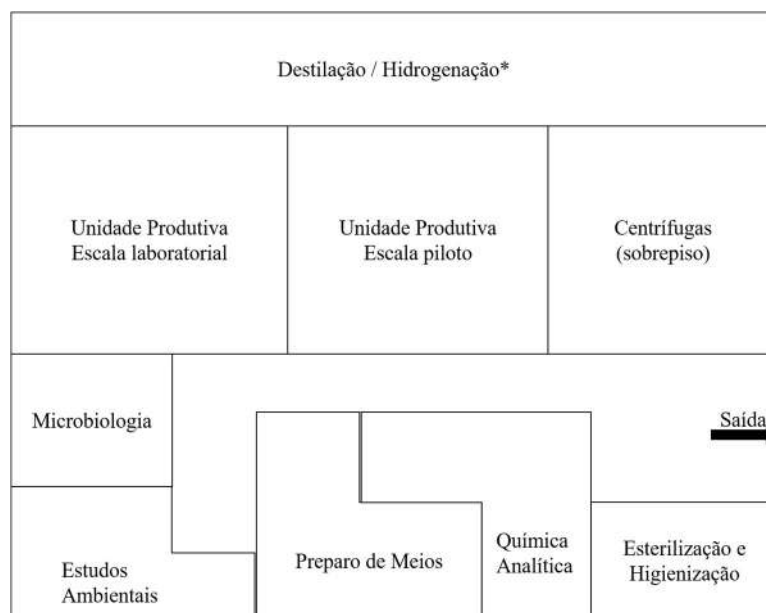


Figura 15 - Esboço da planta piloto

Fonte: Elaboração pelo próprio autor

Sinalizações: As saídas de emergência possuem portas duplas e estão devidamente sinalizadas com setas no sentido de fuga. O chão está sinalizado com faixas coloridas indicando locais de extintor de incêndio, dentre outros significados. Os lixos dentro da fábrica estão identificados. Foi observado o Mapa de Risco bem visível e nítido. O quadro de força está indicado com aviso de alta tensão.

Recursos Humanos: O higienista, responsável pelos EPI, a técnica especialista em Biossegurança e o técnico de manutenção estavam no momento da visita. Cada pessoa recebe o treinamento de acordo com a demanda e área por qual é responsável. Uma possível irregularidade observada foi o trâmite de parte da equipe para a unidade de Brotas indicando a rotatividade dos funcionários e chance de perda de informação para os que forem substituir.

Emergências: As instalações fazem uso de sensores e alarmes de incêndio espalhados ao longo da planta. Os técnicos de plantão dizem receber treinamento recorrente nos quesitos de uso de extintor e simulações de incêndio, além de cursos de CPR (ressuscitação cardiopulmonar).

Manutenção e Limpeza: Após cada uso da centrífuga de tambores é aberto o sistema e feito tanto limpeza como um tempo ocioso para evitar desgaste do equipamento. É retirado um tipo de

material argiloso. A limpeza é realizada no próprio local do tipo CIP (*Clean In Place*). O local de limpeza é cercado até o ambiente estar seco e liberado. Os tanques maiores também recebem manutenção, para isso os responsáveis recebem treinamento adequado às tarefas realizadas. Tanto é que o reator estava muito limpo por dentro. O destilador após limpo é retirado um resíduo denominado “bottom” em pequenas quantidades (fundo em inglês).

Biossegurança: Há símbolos de Biossegurança como o da Figura 16 abaixo em todas portas que são realizados trabalhos com OGM. Nesses ambientes, o manuseio do OGM ocorre em câmara de contenção biológica com exaustão para o lado de fora do laboratório. Toda a planta é certificada com CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança) pela CTNBio. Não há uso de chamas nos laboratórios, os bancos celulares são mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ com luvas de frio disponíveis. Uma provável irregularidade é a cor do jaleco azul escuro, sendo o branco o ideal para mais fácil averiguação de manchas de risco químico e biológico.



Figura 16 - Símbolo de Biossegurança

Fonte: BUSNARDO (2011)

Efluentes: Todo os efluentes líquidos são estocados em um tanque pulmão de onde seguem para o UHT antes de serem enviados para fora. A destinação final é no campo como fertirrigação. Até os efluentes com pouco ou quase nada de OGM são esterilizados no UHT.

4.5 DISCUSSÕES

A excelência a nível de Segurança das instalações se deve provavelmente por suas unidades produtivas da Amyris Brasil Ltda terem sido construídas nos últimos 10 anos em terreno plano livre de obstruções – inclusive a planta industrial em Brotas (SP). Por tal motivo os engenheiros e projetistas envolvidos devem ter vivenciado ao longo da formação, ou na vida profissional, o crescimento de preocupações em Segurança de Processos, e mais especialmente, em Biossegurança visto que o Marco Regulatório no Brasil data do ano 1995. Consequentemente, as exigências no

momento da elaboração e na execução da obra foram fundamentais no estabelecimento de um ambiente mitigado de riscos tornando o projeto uma barreira de contenção secundária visto que mitiga riscos de escape de agentes físicos, químicos e biológicos para o meio ambiente e contribuem para a proteção da equipe do estabelecimento.

Agravante ao visto acima, mesmo sendo concluído pela afirmação de que a cepa de levedura geneticamente modificada não oferece riscos e é segura, i.e., classe de risco 1, a indústria está em constante trabalho para manter sua adequação perante o que manda o nível de biossegurança 1, relativo ao seu agente biológico.

A CTNBio decretou em 06 de Junho de 1997 por meio de Instrução Normativa N°7, e ratificou ao longo dos anos por novas publicações, culminando na vigente Resolução Normativa N° 18, de 23 de Maio de 2018, a excepcionalidade do processo industrial, conforme abaixo (CTNBIO, 1997):

Trabalhos envolvendo OGM em laboratório ou linha de produção usando volumes superiores a 10 litros devem (i) ter supervisão e medidas de confinamento adicionais [...] (ii) devem ser considerados, também, os riscos relacionados com o cultivo de organismos em grande escala (p. ex. toxicidade de produtos, aspectos físicos, mecânicos e químicos de processamento do OGM).

A Amyris Brasil Ltda cumpre com rigor à Instrução Normativa que, devido à utilização de OGM e devido ao fato de que o volume do biorreator piloto é de 300,0 litros, se torna um tarefa exaustiva e bilateral que necessita de maior número de funcionários qualificados tecnicamente, maior conhecimento de legislação, alto nível de monitoramento do espaço físico. Dos bens e pessoas que ali circulam, além das medidas de biossegurança e de higiene ocupacional comuns a um laboratório que faça uso do mesmo agente biológico geneticamente modificado, porém em uma escala de até 10,0 litros.

5 CONCLUSÃO

5.1 CONCLUSÕES

A metodologia de estudo de caso foi aplicada. Foi possível obter dados teóricos referentes a diversas unidades produtivas na Amyris Brasil Ltda no Brasil e no exterior e dados empíricos obtidos na unidade produtiva em escala piloto. A partir da observação, e de posse de conhecimentos acumulados na área de Biossegurança, foi possível identificar e avaliar riscos referentes ao processo de produção de farneseno.

Quanto as normas de Biossegurança no âmbito industrial:

✓ Do ponto de vista do arcabouço regulatório de Biossegurança, foi possível observar a existência de (a) medidas básicas de biossegurança – i.e., barreiras de contenção primárias (e.g., higiene pessoal, luvas) - inerentes a qualquer cenário, necessárias tanto em ambientes como laboratórios de graduação, até em laboratórios de Nível de Biossegurança 4 (e.g., institutos que estudem o vírus da Ebola); e (b) medidas de contenção mitigadoras adequadas à gravidade de um risco diferenciado inerente ao tipo de substâncias e/ou processo empregados - i.e., barreiras de contenção secundárias (e.g., arquitetura, instalações prediais) . Esse último conjunto de medidas é elaborado pelos especialistas da CTNBio e emitidos como Instruções Normativas. São documentos fruto de incessante pesquisa teórica e empírica por parte da experiência acumulada pelos órgãos fiscalizadores, Comissões Internas de Biossegurança e comunidade científica; e

✓ Pelo estudo do processo industrial a partir de de relatórios técnicos públicos, somado à literatura de artigos e patentes, foi possível identificar, ao longo do trabalho, os perigos existentes no processo serem, parcialmente, desmitificados quando não oferecem riscos nas condições operacionais, e mitigados, e/ou até neutralizados quando existe riscos por menores que sejam. O gerenciamento de riscos está a nível de projeto, como estabelece o programa *Prevention through Design* (PtD) do Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH) através da missão “tirar do projeto antes da sua materialização fontes de riscos e exposição ocupacional” (adaptado de NIOSH, 2011).

A conclusão dos dois pontos apresentados acima, é que a Amyris Brasil Ltda apresenta em seu projeto ambos níveis de barreiras de contenção – primário e secundário – e trabalha na análise

de riscos, e.g., HAZOP, que de fato é realizado periodicamente, previamente o início da operação a nível teórico, prevenindo riscos e mitigando perigos intrínsecos à natureza da planta produtiva.

Quanto à aplicação das normas de Biossegurança:

✓ Pela avaliação in loco foi nítido a preocupação em nível visual da fábrica por meio de alertas e sinais visuais, demarcações e avisos, pictogramas e símbolos de Biossegurança, mapas de risco e monitoramento de acidentes, manutenção e limpeza periódicas. Foi averiguado as condições de biossegurança conforme o texto da lei, principalmente no quesito de risco biológico originado da manipulação de OGM e derivados. Outras características não citadas aqui não tiveram tanto destaque;

✓ Pela avaliação técnica por meio de questionário foi possível interpretar a Gestão em Biossegurança visto que quem respondeu está em cargo de gestor, além de ser membro integrante da CIBio. Em resumo, a avaliação foi bem compreendida pela profissional, a Biol^a. Kelly Seligman, indicando familiaridade com medidas preventivas, respostas à emergência, gestão em saúde e segurança, exposição ocupacional, impacto ambiental, confiabilidade técnica dentre outros requisitos de um profissional habilitado à cargo de gestão em SMS.

A conclusão dos dois pontos apresentados acima, nos permitiu ver que a visão de segurança pelos operadores da planta, por meio de visita técnica, e do gestores, por meio de questionário estão alinhadas. Tal ponto fica claro por ambas terem sido feitas subsequentes e pelo alto nível de similaridade de informação obtida em cada etapa. Tanto o questionário apresentou verossimilhança com o observado na visita, como a planta está de acordo com o discutido no escritório.

5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo salienta às conclusões apresentadas o fato que o arcabouço legal de Biossegurança apresenta medidas mais que suficientes para lidar com os riscos inerentes ao tipo de atividade no escopo do presente trabalho – produção de farneseno para bioquerosene de aviação (farnesano) – da planta da AMYRIS BRASIL LTDA, que está classificada como Nível de Biossegurança em Grande Escala 1 (NBGE-1) pela Resolução N°18 (CTNBio, 2018).

No quesito avaliação do arcabouço legal e sistema produtivo, apesar de perceber que a Amyris Brasil Ltda está provida de barreiras de contenção primárias e secundárias, dentre as mais

eficientes a nível nacional, e com todo o investimento e infra-estrutura, a planta piloto ainda está longe de estar em uma situação de conformidade estável. Tal fato é claro quando observado o quadro de funcionários e a rotina exaustiva de trabalho dos profissionais responsáveis por regulação e mediação com órgãos de fiscalização. O conjunto de normas frequentemente alteradas e instruções legais transitórias na área de Biossegurança excede o rigor necessário para a presente atividade, sendo de alto nível a exigência, equivalente às áreas da saúde, não sendo adequado às empresas de biocombustíveis.

Por fim, as expectativas em relação à planta foram superadas visto que os níveis de segurança são acima de qualquer outra empresa do conhecimento do autor. Adicionalmente foi possível conhecer um centro de desenvolvimento em bioprocessos, área profissional do meu curso de graduação enriquecendo.

São possíveis melhorias observáveis no escopo do questionário/visita:

- ✓ a curto prazo (até 2 anos): realizar os testes restantes com o farneseno, como risco de explosividade e produtos de combustão, incluir sinalização e/ou proteção de ralos e bueiros internos à fábrica, o uso de piso rígido no segundo nível e a designação de funcionários responsáveis fixos na planta além do quadro rotativo entre outras unidades produtivas;
- ✓ a médio prazo (até 5 anos): incluir monitoramento de ar para produtos químicos, realizar a troca de equipamentos existentes desde o início da produção e realizar monitoramento ambiental em águas subterrâneas; e
- ✓ a longo prazo (após 5 anos): expansão de corredores e portas de entrada visto a circulação de produtos/ pessoas, realizar armazenamento subterrâneo de tanques e construir toda unidade produtiva em um único nível sem a necessidade de sobrepiso.

5.3 SUGESTÕES DE ESTUDOS FUTUROS

O escopo do presente trabalho “produção de farneseno para bioquerosene de aviação (farnesano)”- reflete uma demanda ultrapassada desalinhada com as atuais tendências da empresa. Visto o atual portfólio disponível no website da Amyris Brasil Ltda é evidente a mudança de rumo. Conforme visto no capítulo 3, a empresa se destaca financeiramente nos tempos recentes devido à conversão de farneseno à esqualano, um esmoliente comercializado para indústria de cosméticos por meio da marca *Biossance*TM conforme visto na Figura 17 abaixo.

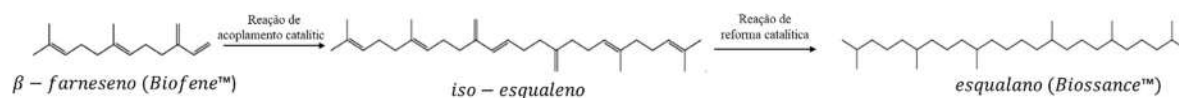


Figura 17 - Etapas químicas da obtenção de esqualano

Fonte: FISHER *et al.*, 2011

É de interesse para a empresa e órgãos fiscalizadores competentes - CTNBio, MAPA, ANVISA - a avaliação de riscos inerentes à conversão de farneseno à esqualano envolvendo novas etapas, novos reagentes químicos e “novos riscos”.

REFERÊNCIAS

ALDHOUS, P. **Genetic engineering: Modified yeast fine for food**. Nature. p.344-186, 1990.

ANP. **Combustíveis de aviação**. Disponível em < <http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1856-combustiveis-de-aviacao>> Acesso em 1 de Ago. de 2018

ANP. **Resolução ANP N° 63 DE 05/12/2014**. 2014. Disponível em <<http://legislacao.anp.gov.br>> Acesso em 28 de Jul. de 2018.

ANP **Biodiesel**. 2016. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>> Aceso em 22 de Jul. de 2018.

ABNT. **Produtos químicos — Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente** Parte 2: Sistema de classificação de perigo. NBR 14725-2, 2009.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. **Equipamentos de Biossegurança**. In: Manual de Biossegurança. São Paulo: FCF/USP, 2000.

AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC. Darek K. Mcphee, Neil Stephen Renninger. **Composição de combustível, métodos para fabricar uma composição de combustível, e um combustível, combustível, veículo, e, método para energizar um motor**. PI 0719659-8., 10 out. 2006, 21 nov. 2006, 10 out. 2007. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/>>. Acesso em: 08 de ago. de 2018.

FISHER *et al.*, 2011. Karl Fisher, Susan Jessica Schofer, David B. Kanne. **Squalane and isosqualane compositions and methods for preparing the same**. US 2011/0287988, 24 nov. 2011. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com/>> . Acesso em 09 de ago. de 2018

AMYRIS. **Integrated Biorefinery Project Summary**. Amyris, Inc. Emeryville, 2009.

AMYRIS. **Amyris More Than Doubles Revenues Over 2015 And Provides Strong Growth Outlook**. 2017. Disponível em: < <http://investors.amyris.com/news-releases/news-release-details/amyris-more-doubles-revenues-over-2015-and-provides-strong>> Acesso em 8 de Ago. de 2018.

AMYRIS. **Safety data sheet | Farnesene**. 2013. Disponível em: <<https://farnesene.net/wp-content/uploads/2014/03/amyris-safety-data-sheet.pdf>>. Acesso em: 2 Ago. de 2018.

ANIDROL. **Ficha de informação de segurança de produto químico | SACAROSE PA**. Disponível em: <<http://www.anidrol.com.br/fispq/SACAROSE%20PA%20%20-A-2376.pdf>>. Acesso em: 2 Ago. de 2018.

ASTM. **D7566-18: Standard Specification for Aviation Turbine Fuel Containing Synthesized Hydrocarbons**. ASTM International, West Conshohocken: 2018. Disponível em <<https://www.astm.org/Standards/D7566.htm>>>

AVIATION Economics. **The Commercial Use of Biofuels in Aviation**. 2014. Disponível em <<http://www.aviationeconomics.com/NewsItem.aspx?title=The-Commercial-Use-of-Biofuels-in-Aviation>>. Acesso em 14 de Jul. e 2018.

BERMES, E. W.; YOUNG, D. S. **General Laboratory Techniques and Procedures**. In: Burtis, C. A.; Ashwood, E. S. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2ª Ed. Philadelphia, W. B: Saunders Company, 1994.

BINSFELD, P. C. **Biossegurança em Biotecnologia**. Interciência, Rio de Janeiro, 2004, 367p.

BIOTÉCNICA. **Procedimento Operacional Padrão: Biossegurança**. Disponível em <www.biotecnica.ind.br> Acesso em 2 de Ago. de 2018.

BORTOLOSSO, H. *et al.* **Métodos de auditoria de sistemas de gestão de segurança e saúde no trabalho : uma revisão sistemática da literatura**. Ingeniería Industrial. Actualidad y Nuevas Tendencias, v. 5, n. 18, pp. 45-58, 2017.

BRACHMANN C.B. *et al.* **Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications**. Yeast. V.14, p.115-132, 1998.

BRASIL. **Lei Federal nº 11.105**, de 24 de mar. de 2005. Brasília: MCT, 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm>. Acesso em: 14 Abr. 2018.

BRASIL. **Classificação de Risco dos Agentes Biológicos**. 2 Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/classificacao_risco_agentes_biologicos_2ed.pdf>. Acesso em: 24 Jun. 2018.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **NRs : normas regulamentadoras de segurança e saúde no trabalho**. Disponível em: <http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_06_.pdf>. Acesso em: 3 Ago. 2018.

BRAUER, D. *et al.* Biosafety in rDNA Research and Production. In: REHN, H.J.; REED, G. **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise**. 2. ed. Weinheim: VCH, 1995.

BRONDANI, A.. **OGM e Transgênicos: você sabe a diferença?** CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Disponível em: <<https://cib.org.br/faq/ogm-e-transgenicos/>> Acesso em 5 de Jun. de 2018.

BUSCHPIES, B.; KALTSCHMITT, M. Sustainability Aspects of Biokerosene In: KALTSCHMITT, M.; NEULING, U. **Biokerosene: Status and prospects**. 1.ed. Hamburgo: Springer, 2018. cap.15, p. 325-373.

BUSNARDO, R. G. **Análise sistemática da Biossegurança no âmbito acadêmico nacional e estudo de caso na Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Tese (Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – UFRJ. Rio de Janeiro, 2015.

BUSNARDO, R. G. **Biossegurança: abordagem e ensino no contexto acadêmico**. Dissertação (Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – UFRJ. Rio de Janeiro, 2011.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M. e GARBIERI V.C.S. **Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate.** Journal of the Science of Food and Agriculture., v. 80, p.341-351, 2000.

CAMPOS, A. A. M. CIPA - **Comissão Interna de Prevenção de Acidentes: Uma Nova Abordagem.** 24. ed. São Paulo: SENAC, 2016, 408p.

CARVALHO, P. R. **Boas Práticas Químicas em Biossegurança.** 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2013, 732p.

CASSON MORENO, V.; COZZANI, V. **Integrated hazard identification within the risk management of industrial biological processes.** Safety Science, v. 103, , p. 340–351, 2018.

CIB. **Quando e como foi criada a Lei de Biossegurança no Brasil?** Disponível em <www.cib.org.br/faq/quando-e-como-foi-criada-a-lei-de-biosseguranca-no-brasil/> Acesso em 04 de Ago. de 2018.

CCPS. **Process Safety in Bioprocess Manufacturing Facilities.** Center for Chemical Process Safety. New York, 2011, 225p.

CENTENNIAL of flight day. December 17, 2003. Disponível em: <https://www.centennialofflight.net/essay/Evolution_of_Technology/fuel/Tech21.htm>. Acesso em: 27 nov. 2017.

CHIARAMONTI, D. *et al.* Sustainable bio kerosene: **Process routes and industrial demonstration activities in aviation biofuels.** Applied Energy, v. 136, p. 767–774, 2014.

CHIARAMONTI, D., PRUSSI, M., BUFFI, M.; TACCONI, D. **Sustainable bio kerosene: Process routes and industrial demonstration activities in aviation biofuels.** Applied Energy, 136, pp.767-774, 2014.

CTNBIO. **Resolução Normativa N° 7**, de 06 de jun. de 1997. Disponível em <www.ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas> Acesso em 5 de Ago. de 2018

CTNBIO. **Extrato de parecer técnico N° 2281/2010.** MCTI. Brasília, 2010.

CTNBIO. **Extrato de parecer técnico n° 3287/2012.** MCTI. Brasília, 2012.

CTBIO. **Relatório Anual 2015.** Disponível em <www.ctnbio.mcti.gov.br/relatorios-anuais> Acesso em 8 de Ago. de 2018.

CTNBIO. **Resolução Normativa N° 18**, de 23 de mar. de 2018. Disponível em <www.ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas> Acesso em 2 de Ago. de 2018

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. **Entendendo a Biossegurança: Epistemologia e Competências para a Área da Saúde.** 1. ed. Rio de Janeiro: Publit, 2006, 212p.

CROWL, D. A.; LOUVAR, J. F. **Chemical process safety: fundamentals with applications**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011, 752p.

COSTA, A. C. A.; PEREIRA JR, N.; ARANDA, D. A. G. **The situation of biofuels in Brazil: New generation technologies**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, n. 9, p. 3041–3049, 2010.

DAIHA, K. G. *et al.* **Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community**. Brazilian Journal of Science and Technology, v. 3, n. 1, p. 17, 2016.

DEQUIN, S. **The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts**. Appl Microbiol Biotechnol v. 56, p.577-588, 2001.

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production**. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006

DUGAR, D.; STEPHANOPOULOS, G. **Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products**. Nature Biotechnology, v. 29, n. 12, p. 1074-1078, 2011.

ECHA. **Perigo: químicos! – Explicação dos pictogramas de perigo**. Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho. Disponível em: <https://echa.europa.eu/documents/10162/2621167/eu-osha_chemical_hazard_pictograms_leaflet_pt.pdf>. Acesso em: 2 Ago. de 2018.

EMBRAPA. **Manual de Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente**, 2016. Disponível em <ainfo.cnptia.embrapa.br> Acesso em 3 de Ago. de 2018.

EUROPABIO. **What is biotechnology?** <<http://www.europabio.org/biotech-benefits/what-is-biotechnology>> Acesso em 8 de Ago. de 2018

EUROPEAN COMMISSION. **2 million tons per year: A performing biofuels supply chain for EU aviation**. 2013. Disponível em: <https://ec.europa.eu/energy/sites/ener/files/20130911_a_performing_biofuels_supply_chain.pdf>. Acesso em 30 de jul. 2018.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell *et al.* **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 223-246, 2001.

FIOCRUZ. **Fiocruz**, 2010. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/>>. Acesso em: 02 Ago. de 2018.

FIOCRUZ. **Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC)**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/virtual%20tour/hipertextos/up1/epc.html>>. Acesso em: 4 de ago. de 20018.

FLEMING, D.; RICHAARDSON, J. H.; TULLIS, J. J.; VESLEY, D. **Laboratory Safety: Principles and Practices**. 2a Ed. Washington, DC: ASM Press, 1995, 406p.

FLORES, C. L. *et al.* **Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts.** FEMS microbiology reviews, v. 24, n. 4, p. 507–529, 2000.

FUNDACENTRO. **Normas de Higiene Ocupacional.** <www.fundacentro.gov.br/biblioteca/normas-de-higiene-ocupacional> Acesso em 2 de Ago. de 2018

GAIOTTO, J.R. **Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*),** In Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia 2005, Universidade de São Paulo: Pirassununga, SP. p. 87, 2005

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. **Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method.** Methods in Molecular Biology, v. 1163, n. 1, p. 33–44, 2014.

GRANDO, R. L. **Startups e Modelos de Negócio em Bioeconomia : As Trajetórias de Amyris e Solazyme.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

GUAZZELLI, M. J.; PEREZ, J. **Biologia Sintética - Fabricando novas formas de vida.** Disponível em <http://www.centroecologico.org.br/novastecnologias/novastecnologias_2.pdf>. Acesso 30 de jul. 2018.

HIRATA, M. H.; MANCINI, J. **Manual de Biossegurança.** 3.ed. São Paulo: Manole, 2017, 496p.

ICL BRASIL LTDA. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos | Ácido Fosfórico.** 2013. Disponível em: <<http://www.fosbrasil.com/media/pt/fispq.pdf>>. Acesso em: 2 Ago. 2018.

KIMMAN, T. G.; SMIT, E.; KLEIN, M. R. **Evidence-based biosafety: A review of the principles and effectiveness of microbiological containment measures.** Clinical Microbiology Reviews, v. 21, n. 3, p. 403–425, 2008.

LIU, G. *et al.* **High-throughput transformation of *Saccharomyces cerevisiae* using liquid handling robots.** PLoS ONE, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

LORENA, E. M. G. *et al.* **Gestão de resíduos industriais do Setor Sucroalcooleiro : estudo de caso de Pernambuco , Brasil.** Revista Gestão Industrial, v. 13, p. 182–197, 2017.

MCGOVERN, P. E. *et al.* **Fermented beverages of pre- and proto-historic China.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 101, 17593-17598, 2004.

NEULING, U.; KALTSCHMITT, M.. **Conversion routes for production of biokerosene—status and assessment.** Biomass Conversion and Biorefinery, v. 5, n. 4, p. 367-385, 2014.

NIOSH. **Prevention through Design Program.** 2011 <<https://www.cdc.gov/niosh/programs/ptdesign/>> Acesso em 8 de Ago. de 2018.

OSHA. **Heat Stress** <https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_iii/otm_iii_4.html#wbgt> Acesso em 2 de Ago. de 2018

PENNA, *et al.* **Biossegurança: Uma Revisão**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 77, n. 3, p.465-555, 2010.

PEREIRA JR, N.; ANTUNES, A.; EBOLE, M. F. **Gestão em Biotecnologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2006, p. 17-42.

QUÍMICA MODERNA. **Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico: Hidróxido De Amonio**. 2012. Disponível em: <<http://www.br.com.br/>>. Acesso em: 2 Ago. . 2018.

THIEMANN, J. E. Construção de Equipamentos de Fermentação. In: SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial – Vol. 2: Engenharia Bioquímica**. 1.ed. São Paulo: Edgar Blücher, p. 470 - 480, 2001

YILMAZ, N.; ATMANLI, A. **Sustainable alternative fuels in aviation**. Energy, v. 140, p. 1378–1386, 2017.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: Uma Abordagem Multidisciplinar**. 2.ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010, 442p.

TORREIRA, R. P. **Manual de Segurança Industrial**. São Paulo: Margus Publicações, 1999, 1062p.

UNICA; 2015. Disponível em <www.unica.com.br> acesso em 12 de Março de 2018.

VILLEN, R. A. **Mauá: Biotecnologia – Histórico e Tendências**. Escola de Engenharia de Mauá. Apostila, 2009

WALLAU, W. M.; SANTOS, A. J. R. W. A. **Produtos químicos perigosos utilizados em laboratórios de ensino – proposta e exemplos para indicação de seus perigos no rótulo**. Química Nova, v. 32, n. 8, p. 2094–2097, 2009.

WHO. **Noise Sources** Disponível em <www.who.int/occupational_health/publications/noise5.pdf> Acesso em 2 de Agosto de 2018

YIN, R. K. **Estudo de caso: planejamento e métodos**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2015, 320p.