

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**Documento de Orientação para
discussão a respeito das Especificações de
Ingredientes Alimentares**

SUMÁRIO

1	ESCOPO	5
2	INTRODUÇÃO	6
3	BASE LEGAL	7
3.1	Referências Reconhecidas	8
4	PROCEDIMENTOS PARA O ESTABELECIMENTO DE ESPECIFICAÇÕES QUE NÃO ESTEJAM INCLUÍDAS EM REFERÊNCIAS RECONHECIDAS PELA ANVISA	11
5	ESPECIFICAÇÕES	14
6	PROCESSO DE OBTENÇÃO	15
7	MÉTODOS ANALÍTICOS	16
8	PADRÕES PARA A IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	17
8.1	Ensaio para a identificação	17
8.2	Marcadores	18
8.3	Caracterização	18
8.3.1	Compostos Químicos Isolados	18
8.3.2	Ingredientes Processados	19
8.3.3	Extratos Vegetais	19
8.3.3.1	Fatores que afetam o perfil fitoquímico dos extratos vegetais	20
8.3.3.1.1	Ingrediente botânico	20
8.3.3.1.2	Processo de Extração	20
8.3.3.1.3	Solvente de Extração	21
8.3.3.1.4	Proporção de extração (relação matéria-prima/extrato vegetal nativo)	22
8.3.3.2	Técnicas para identificação de espécies botânicas	23
8.3.3.3	Cromatografia	24
8.3.3.3.1	Perfil cromatográfico	24
8.3.3.3.2	Desenvolvimento de perfil cromatográfico	25
8.3.3.3.3	Interpretação do Cromatograma do Perfil	26
8.3.3.4	Especificações de extratos vegetais	28
8.3.4	Identificação adequada de ingredientes contendo enzimas	28
8.3.4.1	Enzimas como compostos ativos	29

8.3.4.1.1	<i>Propriedades relacionadas à função das enzimas</i>	30
8.3.4.1.2	<i>Da estrutura à função - investigando enzimas "semelhantes"</i>	33
8.3.4.1.2.1	Relação estrutura-função.....	33
8.3.4.1.2.2	Homologia e Similaridade	35
8.3.4.1.2.3	Conclusões.....	37
8.3.4.2	Concentrados de enzimas e preparações enzimáticas	38
8.3.4.2.1	<i>Concentrados enzimáticos</i>	38
8.3.4.2.1.1	Conclusão	40
8.3.4.2.2	<i>Preparação enzimática</i>	41
8.3.5	Identificação adequada de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia	41
8.3.6	Identificação adequada de ingredientes contendo microrganismos (probióticos) ..	42
8.3.7	Identificação adequada de ingredientes específicos	42
8.4	Quantificação	42
8.4.1	Quantificação por ensaio	43
9	PADRÕES DE PUREZA	45
9.1	Contaminantes microbiológicos	45
9.2	Contaminantes inorgânicos	46
9.3	Outras impurezas	46
9.3.1	Micotoxinas (ex.: aflatoxina)	46
9.3.2	Resíduos de solventes	47
9.3.3	Preparações Enzimáticas	47
9.3.4	Impurezas incidentais, substâncias relacionadas e impurezas do processo	47
9.3.5	Ingredientes irradiados	48
9.3.6	Estabilidade oxidativa em óleos	48
9.3.7	Adulterantes potenciais	49
9.3.8	Ingredientes provenientes de tecidos suscetíveis à encefalopatia espongiforme transmissível e à encefalopatia espongiforme bovina.	49
10	ANÁLISES E CRITÉRIOS ADICIONAIS	50
10.1	Indicadores gerais de qualidade	50
10.1.1	Matérias estranhas	50
10.1.2	Determinação de cinzas	50

10.1.3	Conteúdo de água	50
10.2	Ensaio e requisitos analíticos para apoiar as alegações, advertências e informações nutricionais complementares – INC veiculadas no rótulo de alimentos.....	50
11	ANEXOS	52
	ANEXO I – MODELO DE ESPECIFICAÇÃO GERAL PARA INGREDIENTES ALIMENTARES, EXCETO PROBIÓTICOS E ENZIMAS	52
	ANEXO II – MODELO DE ESPECIFICAÇÃO GERAL PARA INGREDIENTES CONTENDO MICRORGANISMOS VIVOS (PROBIÓTICOS)	54
	ANEXO III – MODELO DE ESPECIFICAÇÃO GERAL PARA ENZIMAS	58
	ANEXO IV – MODELOS DE ESPECIFICAÇÕES COMPLEMENTARES PARA ALIMENTOS E INGREDIENTES ESPECÍFICOS	60
12	GLOSSÁRIO	66
13	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 ESCOPO

Este documento foi desenvolvido pela equipe da Gerência Geral de Alimentos da Anvisa e apresenta critérios para orientar quanto ao estabelecimento de especificações de novos ingredientes, probióticos, enzimas, aditivos alimentares, inclusive aditivos aromatizantes de extratos vegetais e coadjuvantes de tecnologia, compostos fonte de nutrientes, de substâncias bioativas e constituintes de alimentos em geral que não possuem especificações em referências reconhecidas pela Agência ou que possuem especificações diferentes daquelas constantes nestas referências.

Com intuito de simplificar a redação, para efeito desse documento, será adotado o termo ingredientes alimentares para representar esse conjunto de constituintes usados em alimentos e que requerem estabelecimento de especificação para fins de avaliação de segurança e ou eficácia.

Os princípios básicos descritos neste documento são aplicáveis aos ingredientes alimentares, no âmbito de competência da Anvisa, e não isentam o setor do cumprimento de regras estabelecidas por outros entes reguladores, como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.

Abordagens alternativas aos princípios e práticas descritas neste documento serão aceitáveis se se apoiarem em metodologias equivalentes, resultando em ingredientes alimentares seguros e de alta qualidade.

2 INTRODUÇÃO

Especificações são padrões técnicos estabelecidos e se referem a um conjunto de requisitos documentados a serem atendidos por um material, projeto, produto ou serviço. Especificar, no âmbito de aplicação dos ingredientes alimentares, é o ato de descrever as características, qualitativa e/ou quantitativamente, estabelecer a variabilidade aceitável, os métodos analíticos que permitam aferir estas características, requisitos de pureza, entre outros parâmetros, com vistas a permitir a padronização e identificação inequívoca destes produtos.

Para a elaboração deste documento foram utilizados como referências o documento [“Quality of Natural Health Products Guide”](#), publicado pelo Health Canada; o documento [“Guideline for the Admission of Dietary Supplement Ingredients to the USP–NF Monograph Development Process”](#), publicado pela United States Pharmacopeia – USP; o documento [“Guidance on safety evaluation of sources of nutrients and bioavailability of nutrient from the sources”](#), publicado pela European Food Safety Authority – EFSA; o documento [“Guidance on equivalence of herbal extracts in Complementary Medicines”](#), publicado pela Therapeutic Goods Administration – Austrália; o documento [“Collection of information on enzymes”](#), publicado pela Comunidade Europeia; o documento [“Guidance document for WHO monographers and reviewers evaluating food additives”](#), publicado pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e os Guias de Avaliação de Segurança e Eficácia já publicados pela Anvisa.

Abordagens alternativas aos princípios e práticas descritas neste documento, ou quaisquer outras abordagens para atender às expectativas descritas neste guia, podem ser aceitáveis desde que resultem em especificações equivalentes e que permitam padronizar a segurança e a qualidade dos ingredientes alimentares. Espera-se que os ingredientes alimentares, quando autorizados, cumpram com as especificações das referências adotadas ou que sejam aprovadas e publicadas pela Anvisa.

3 BASE LEGAL

Os alimentos e ingredientes vendidos no Brasil devem atender aos requisitos estabelecidos em Lei, nos regulamentos técnicos editados pela Anvisa ou por outros agentes públicos reguladores.

O Decreto-Lei n. 986, de 21 de outubro de 1969, que institui normas básicas sobre alimentos, estabelece, no Capítulo V, diretrizes a serem observadas nos Padrões de Identidade e Qualidade por tipo ou espécie de alimento. Ademais, o Art. 48 do mesmo Decreto-Lei determina que somente poderão ser expostos à venda, alimentos, matérias-primas alimentares, alimentos in natura, aditivos para alimentos, materiais, artigos e utensílios destinados a entrar em contato com alimentos, matérias-primas alimentares e alimentos in natura que obedeçam, na sua composição, às especificações do respectivo padrão de identidade e qualidade, quando se tratar de alimento padronizado ou àquelas que tenham sido declaradas no momento do respectivo registro, quando se tratar de alimento de fantasia ou artificial, ou ainda não padronizado.

Decreto-Lei n. 986, de 21 de outubro de 1969:

Art 28. Será aprovado para cada tipo ou espécie de alimento um padrão de identidade e qualidade dispondo sobre:

I - Denominação, definição e composição, compreendendo a descrição do alimento, citando o nome científico quando houver e os requisitos que permitam fixar um critério de qualidade;

II - Requisitos de higiene, compreendendo medidas sanitárias concretas e demais disposições necessárias à obtenção de um alimento puro, comestível e de qualidade comercial;

III - Aditivos intencionais que podem ser empregados, abrangendo a finalidade do emprego e o limite de adição;

IV - Requisitos aplicáveis a peso e medida;

V - Requisitos relativos à rotulagem e apresentação do produto;

VI - Métodos de colheita de amostra, ensaio e análise do alimento;

§ 1º - Os requisitos de higiene abrangerão também o padrão microbiológico do alimento e o limite residual de pesticidas e contaminantes tolerados.

§ 2º Os padrões de identidade e qualidade poderão ser revistos pelo órgão competente do Ministério da Saúde, por iniciativa própria ou a requerimento da parte interessada, devidamente fundamentado.

§ 3º Poderão ser aprovados subpadrões de identidade e qualidade devendo os alimentos por ele abrangidos serem embalados e rotulados de forma a distingui-los do alimento padronizado correspondente.

(...)

Art 48. Somente poderão ser expostos à venda, alimentos, matérias-primas alimentares, alimentos *in natura*, aditivos para alimentos, materiais, artigos e utensílios destinados a entrar em contato com alimentos matérias-primas alimentares e alimentos *in natura*, que:

(...)

IV - Obedeçam, na sua composição, às especificações do respectivo padrão de identidade e qualidade, quando se tratar de alimento padronizado ou àquelas que tenham sido declaradas no momento do respectivo registro, quando se tratar de alimento de fantasia ou artificial, ou ainda não padronizado.

3.1 Referências Reconhecidas

A Anvisa reconheceu por meio da RDC n. 37/09 as monografias oficiais, última edição, dos seguintes compêndios internacionais:

- I - Farmacopeia Alemã;
- II - Farmacopeia Americana;
- III - Farmacopeia Argentina;
- IV - Farmacopeia Britânica;
- V - Farmacopeia Europeia;
- VI - Farmacopeia Francesa;
- VII - Farmacopeia Internacional (OMS);
- VIII - Farmacopeia Japonesa;
- IX - Farmacopeia Mexicana;
- X - Farmacopeia Portuguesa.

Para algumas categorias de alimento ou ingrediente, estas referências são listadas nos regulamentos técnicos específicos destes alimentos ou ingredientes.

No caso dos suplementos alimentares, por exemplo, o Art. 8º da Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 243, de 26 de julho de 2018, define as referências para especificações de ingredientes fontes de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas para constituintes utilizados na composição de suplementos alimentares.

Para aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em geral, a Portaria SVS/MS n. 540/1997 estabelece como referências para especificações o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Especificamente para aditivos e coadjuvantes de tecnologia para suplementos alimentares, a RDC n. 239/2018 admite adicionalmente as especificações da Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos (EFSA) e, para a categoria de vinhos, a RDC n. 123/2016 reconhece adicionalmente as especificações do Codex Enológico Internacional da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV).

Já para os aditivos aromatizantes, o item 5.1.2 da Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 2, de 15 de janeiro de 2007, estabelece as referências que podem ser seguidas para os requisitos de identidade e pureza destas substâncias.

Em relação às enzimas usadas como coadjuvantes de tecnologia, a RDC n. 54/2014 estabelece as seguintes referências para especificações destas substâncias: JECFA, FCC ou U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 243, de 26 de julho de 2018:

(...)

Art. 8º Os ingredientes fontes de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas de que trata o art. 4º desta Resolução devem atender integralmente às especificações de identidade, pureza e composição estabelecidas em, pelo menos, uma das seguintes referências:

I - Farmacopeia Brasileira;

II - Farmacopeias oficialmente reconhecidas, conforme Resolução - RDC nº 37, de 6 de julho de 2009, que trata da admissibilidade das farmacopeias estrangeiras, e suas atualizações;

III - Código Alimentar (Codex Alimentarius);

IV - Comitê Conjunto de Especialistas da FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA);

V - Código de Produtos Químicos Alimentares (Food Chemicals Codex - FCC);

VI - Compêndio de Suplementos Alimentares da USP (USP Dietary Supplement Compendium - DSC); ou

VII - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority - EFSA).

Parágrafo único. Excetuam-se do disposto no caput os ingredientes cujas especificações sejam aprovadas pela Anvisa.

(...)

Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 2, de 15 de janeiro de 2007:

(...)

5.1.2 Bibliografia reconhecida: os aromatizantes autorizados e as substâncias permitidas que se utilizem em sua elaboração devem responder, pelo menos, aos requisitos de identidade e pureza e às demais especificações que se determinem em relação aos alimentos em geral e ou aromatizantes em particular, sendo reconhecidas como fontes bibliográficas:

CAS - "Chemical Abstracts Service", American Chemical Society, Washington, D.C.
EFSA - European Food Safety Authority
FAO/WHO Codex Alimentarius Standards
Farmacopeia Nacional dos Estados Partes
FCC - "Food Chemical Codex", National Academy Press, Washington, D.C.
FEMA - Flavor and Extract Manufacturers Association of America Expert Panel, Washington D.C.
FENAROLI. "Handbook of Flavor Ingredients", CRC Publishing Co., Boca Raton, FL.
IOFI - International Organization of the Flavor Industry, "Code of Practice of the Flavor Industry"
JECFA. Summary of Evaluations Performed by Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Steffen Arctander. "Perfume and Flavor Chemicals", 1994, Allured Publishing. Co, USA
Steffen Arctander. "Perfume and Flavor Materials Natural Origin", 1994, Allured Publishing. Co, USA
The Merck Index
TNO - Nutrition and Food Research Institute, The Netherlands, Volatile Compounds in Food Qualitative and Quantitative - Data.
USA Code of Federal Regulation - CFR/ Food and Drug Administration – FDA
(...)

4 PROCEDIMENTOS PARA O ESTABELECIMENTO DE ESPECIFICAÇÕES QUE NÃO ESTEJAM INCLUÍDAS EM REFERÊNCIAS RECONHECIDAS PELA ANVISA

Para os ingredientes alimentares definidos no escopo deste documento é necessário definir e validar especificações para que sejam incluídas na Farmacopeia Brasileira ou em outra referência reconhecida pela Anvisa. Para tanto, é necessário que os interessados (fabricante, distribuidor, representante comercial, importador etc) aportem os dados necessários em procedimento a ser definido pela Anvisa.

Um dos requisitos para que se possa avaliar a segurança e eficácia de qualquer ingrediente alimentar é o de que este possua especificações relacionadas à segurança e/ou eficácia (marcadores de interesse em saúde), a depender do caso, padronizadas e validadas. Os estudos que demonstram a segurança e/ou eficácia de ingredientes alimentares devem ser conduzidos com amostras que atendam minimamente a estas especificações. Portanto, para que se possa avaliar um ingrediente ou coadjuvante de tecnologia, via de regra, não é necessário que todos os parâmetros necessários para a completa caracterização e padronização do ingrediente estejam especificados, mas somente aqueles relacionados à segurança e/ou eficácia. No entanto, sem que todos os parâmetros relevantes para a identificação e a caracterização destes produtos sejam especificados, com o estabelecimento de suas variabilidades, métodos analíticos, padrões de pureza, entre outros parâmetros descritos neste Guia, não é possível garantir a padronização e a qualidade do ingrediente.

Em alguns casos, estas especificações completas já foram publicadas em monografias de referências reconhecidas pela Anvisa. Para estes casos basta que as amostras utilizadas nos estudos atendam a estas especificações de referência para que se possa estabelecer uma relação de causa-efeito entre o consumo de um produto e um desfecho de interesse em saúde (segurança e/ou eficácia). O atendimento a estas especificações deve ser demonstrado mediante laudos analíticos.

Já para os casos que não existem especificações, padronizadas e validadas, publicadas em referências reconhecidas pela Anvisa, é necessário estabelecer estas especificações para que elas sejam incluídas à Farmacopeia Brasileira ou outra referência reconhecida. Para isto, é necessário que os interessados forneçam dados e informações sobre o ingrediente, conforme este Guia, ou metodologias equivalentes tecnicamente, em procedimento a ser definido pela Anvisa.

O deferimento da petição de Avaliação de Segurança e Eficácia não garante a inclusão das especificações do alimento ou ingrediente na Farmacopeia Brasileira ou em outra referência reconhecida. A inclusão das especificações à farmacopeia depende

da disponibilidade dos dados necessários à elaboração da monografia, alinhada com as diretrizes deste Guia ou metodologias adotadas pelos compêndios oficiais. A intenção é que não serão incluídas especificações à Farmacopeia Brasileira de ingredientes considerados inseguros e/ou ineficazes pela Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia – GEARE/GGALI/ANVISA.

Por outro lado, a existência de uma monografia de um determinado ingrediente na Farmacopeia Brasileira não é suficiente para que este possa ser utilizado de maneira geral e indiscriminada. Isto porque as especificações são usadas para identificação, caracterização e quantificação do ingrediente, não significando, necessariamente, que este é seguro e/ou eficaz para consumo humano em quaisquer limites e condições. As condições de uso de ingredientes são definidas na conclusão da análise dos processos de Avaliação de Segurança e/ou Eficácia de Alimentos e serão disponibilizadas no portal da Anvisa para conhecimento ou em forma de atualização de atos normativos.

Espera-se que, se uma monografia for publicada em uma dessas referências, as especificações desta monografia devem ser consideradas como especificações mínimas usadas para o teste do alimento ou ingrediente. Se as especificações do produto não incluem testes e limites de tolerância de acordo com a monografia, deve haver justificativa do motivo pelo qual o teste não é necessário. A versão oficial atual destas referências deve ser usada em todos os casos. Não é aceitável aplicar requisitos de diferentes monografias, a menos que as monografias sejam harmonizadas ou haja uma justificativa adequada para a mistura de padrões.

Se os peticionantes atestarem que os ingredientes sob análise atendem a uma destas referências, esta deve ser claramente identificada. Qualquer teste adicional que deva ser realizado deve ser esclarecido ou a justificativa científica de por que o teste adicional não é necessário deve ser documentada. Ao propor limites menos rigorosos do que os especificados neste guia, eles devem ser cientificamente precisos e justificáveis. Quando métodos alternativos são usados para testes para atender as especificações de uma determinada referência, esta deve ser consultada para obter informações sobre se os métodos alternativos são ou não considerados adequados.

É recomendável que todos os parâmetros necessários para garantir a identidade, as características, as quantidades, a padronização e a qualidade de ingredientes e coadjuvantes de tecnologia constem nas monografias de especificações. As especificações destes produtos relacionadas à segurança e/ou eficácia (marcadores de interesse em saúde) não podem ser suprimidas da monografia sob a alegação de sigilo, visto que sem estes parâmetros não é possível concluir se o ingrediente é seguro e/ou eficaz.

Se o interessado solicitar que a descrição detalhada do processo de fabricação seja tratada de forma sigilosa, deve também ser fornecida uma descrição não confidencial do processo de fabricação, juntamente com uma justificativa das alegações de sigilo feitas. Em todos os casos deve ser fornecida a referência legal que respalde a solicitação de sigilo e a motivação.

A química e as especificações da substância (ou mistura de substâncias), em termos de estrutura química e propriedades físico-químicas, são informações críticas requeridas para avaliação de segurança e posterior gerenciamento de risco. A pureza de uma única substância precisa ser definida por especificações, e a caracterização química adequada de misturas simples precisa ser realizada. Nem sempre será possível caracterizar completamente misturas mais complexas, como no caso dos extratos vegetais, mas o maior número de informações possível é recomendável para entender a extensão na qual a variabilidade da composição é controlada durante a fabricação.

Substâncias perigosas que necessitam ser controladas no ingrediente precisam ser identificadas e especificadas (ex.: metais pesados). Informações sobre métodos analíticos, que variam a depender da matriz, são essenciais para detectar e mensurar o perigo. A identificação de produtos de degradação pode desencadear a avaliação toxicológica em um ou mais produtos de degradação para caracterizar qualquer perigo e risco adicional. Quando são utilizados métodos de ensaios laboratoriais, critérios de validação para técnicas analíticas e/ou métodos para demonstrar sua sensibilidade, especificidade e incerteza associada devem ser fornecidos.

5 ESPECIFICAÇÕES

Uma especificação é definida como uma lista de testes, referências a procedimentos analíticos ou físicos e limites de tolerância, intervalos ou outros critérios apropriados para os testes descritos. Estabelece o conjunto de critérios aos quais um alimento ou ingrediente deve obedecer para ser considerado aceitável para o uso pretendido. Especificações são padrões de qualidade críticos que são fornecidos nas petições de avaliação de segurança e/ou eficácia de ingredientes alimentares como parte das condições de autorização de mercado. A conformidade dos lotes de produtos com essas especificações deve ser avaliada pela pessoa responsável pela garantia de qualidade, que assina e data a liberação do lote.

As especificações devem conter testes descrevendo a identidade e quantidade de cada parâmetro considerado importante para se garantir a segurança e/ou eficácia do ingrediente, como a pureza, bem como a tolerância associada aos limites para cada teste. As seções seguintes deste documento descrevem os parâmetros de teste, procedimentos analíticos e limites de tolerância que as especificações de determinados ingredientes devem conter para atender a um nível aceitável de conformidade com os requisitos de especificações, ou seja, os padrões de identidade e qualidade que estes ingredientes devem atender.

As especificações químicas ou microbiológicas dos ingredientes devem ser apresentadas em um formato modelado de acordo com os formulários estabelecidos nos anexos deste Guia ou especificações recentes publicadas na Farmacopeia Brasileira ou outras referências reconhecidas. A depender das condições estabelecidas na conclusão da análise das petições de avaliação de segurança e/ou eficácia, pode ser necessário especificar um ou mais parâmetros não constantes nos modelos (Gerais e Específicos) dos anexos deste guia. Ademais, pode ser necessário especificar marcadores analíticos específicos, a fim de garantir a padronização destes ingredientes. Em todos os casos devem ser providenciadas justificativas técnicas para a inclusão ou subtração de parâmetros não constantes nos modelos dos anexos.

A fim de assegurar que as especificações são representativas do ingrediente, os dados analíticos que apoiam as especificações também devem ser obtidos de pelo menos 3 lotes (Inter laboratorial). Uma justificativa para as especificações propostas deve ser fornecida.

6 PROCESSO DE OBTENÇÃO

Na avaliação de segurança e/ou eficácia de ingredientes, as informações fornecidas no dossiê são utilizadas para identificar potenciais impurezas, intermediários de reação, subprodutos ou contaminantes que possam representar um risco. Onde os perigos são identificados (por exemplo, metais pesados), eles podem precisar ser controlados no ingrediente. Espera-se, portanto, um nível detalhado de informações sobre o processo de obtenção, permitindo tirar conclusões sobre o impacto deste na segurança e/ou eficácia do ingrediente. Em todos os casos, uma descrição detalhada do processo de obtenção deve ser fornecida contemplando os seguintes aspectos, entre outros: (i) matérias-primas, substâncias iniciadoras e outros reagentes e solventes utilizados; (ii) limites operacionais e parâmetros-chave do processo de produção; (iii) medidas implementadas para controle de produção e garantia de qualidade (por exemplo, HACCP, BPF, ISO); (iv) um fluxograma de produção, incluindo verificações de controle de qualidade. Ademais, informações adicionais sobre o processo de obtenção devem ser fornecidas nos seguintes casos:

- Substâncias obtidas por sínteses químicas: (i) sequência de reação, reações indesejadas, etapas de purificação e preparação do produto a ser comercializado, que podem auxiliar na determinação de impurezas prováveis (incluindo nanopartículas) e sua influência na avaliação toxicológica; (ii) informação sobre substâncias que entram no processo de obtenção, ex.: identidade do(s) solvente(s) de extração, reagentes, condições de reação (por exemplo, temperatura, duração da reação, catalisador), precauções especiais (por exemplo, luz, temperatura), métodos de descontaminação/purificação química ou física (por exemplo, extração de solvente, cristalização);
- Substâncias derivadas de espécies vegetais: (i) informações sobre o(s) método(s) de obtenção (exemplo: tipo de extração, duração, temperatura, pressão); (ii) solvente empregado no processo (tipo, concentração e quantidade); (iii) razão matéria-prima/extrato vegetal; (iv) outros critérios de padronização;
- Para fontes derivadas de fontes vegetais, animais ou microbiológicas, o peticionante deve descrever em detalhe o processo pelo qual a matéria-prima é convertida em uma preparação, ex.: extração ou outro(s) procedimento(s), bem como procedimentos de padronização. As informações também devem ser fornecidas sobre o manejo das fontes, por exemplo, as condições de crescimento e colheita de plantas e fungos (por exemplo, selvagens ou cultivadas, práticas de cultivo incluindo o uso de pesticidas e tempo de colheita em relação à estação e ao estágio do crescimento da planta);

condições de reprodução, criação, alimentação e manejo de animais de criação ou caça; as condições de cultura para microrganismos e algas unicelulares (cianobactérias).

7 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para cada um dos parâmetros especificados em alimentos e ingredientes deve ser indicado, no mínimo, um método farmacopeico ou um método analítico validado por laboratório para a identificação e quantificação dos componentes principais e dos seus produtos de degradação e reação. O(s) método(s) fornecido(s) deve(m) ser específico(s) e adequado(s) ao objetivo. Devem ser aplicáveis a todas as categorias de alimentos às quais a substância pode ser adicionada. O(s) método(s) deve (m) ser descrito(s) integralmente, sendo admitida a simples referência somente quando os métodos analíticos utilizados estiverem estabelecidos em referências reconhecidas. Em alguns casos, a validação do método deve ser apresentada (Ex.: quando o ensaio for de um marcador de interesse em saúde).

8 PADRÕES PARA A IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

8.1 Ensaios para a identificação

A abordagem e a quantidade de ensaios de identidade necessários dependem do tipo do ingrediente. Os ensaios empregados devem ser específicos o suficiente para distinguir o alimento ou ingrediente corretamente, espécies de plantas e partes de plantas de adulterantes prováveis etc. As técnicas de ensaio devem ser específicas para o alimento ou ingrediente e baseadas em aspectos exclusivos destes e podem ser realizadas na etapa de matéria-prima ou produto acabado.

Em misturas complexas (por exemplo, extratos, hidrolisados proteicos), todos os constituintes não podem, em geral, ser totalmente caracterizados quimicamente e/ou identificados.; uma caracterização qualitativa e quantitativa dos constituintes principais deve ser realizada, pelo menos por meio de parâmetros de soma.

A caracterização de compostos quelatos é uma questão relevante para a avaliação de constituintes ou compostos fonte de nutrientes, particularmente para minerais. Um complexo químico pode exibir uma associação reversível de moléculas, átomos ou íons através de ligações químicas fracas; no entanto, existem compostos quelatos que são bastante estáveis na medida em que estão ligados por ligações consideravelmente fortes. A caracterização dos complexos de coordenação é realizada com base em seus dados físicos, espectrais e analíticos; os resultados da análise elementar e dados espectrais dos ligantes não-complexados e seus complexos metálicos devem estar em boa concordância com suas estruturas, o que eventualmente prova a pureza de todas as substâncias. Deve-se demonstrar que não há junto com o composto quelato a presença significativa de material residual (não ligado) ou outras impurezas.

As informações também devem ser fornecidas sobre a identidade e a quantidade de impurezas ou subprodutos, resíduos e contaminantes. O tipo e o espectro de potenciais analitos alvo devem ser considerados à luz das fontes e do processo de produção. Por exemplo, para substâncias produzidas via fermentação microbiana, a presença de metabólitos microbianos indesejáveis, como as micotoxinas, deve ser investigada. Para substâncias isoladas por extração, devem ser fornecidos resíduos do(s) solvente(s) usado(s).

As Boas Práticas Agrícolas (BPA), quando aplicáveis, e as Boas Práticas de Fabricação (BPF) devem ser aplicadas à cadeia de fornecimento para garantir a identificação adequada, controle de qualidade e consistência de lote para lote.

8.2 Marcadores

Em alguns casos, o processo pode envolver a identificação de substâncias químicas específicas relacionadas ou não à segurança e/ou eficácia (também conhecidas como marcadores) que podem ser utilizadas como parâmetros para a fabricação de ingredientes padronizados. Os marcadores são constituintes quimicamente definidos ou grupos de constituintes que podem ser utilizados para controlar a consistência de lote para lote do ingrediente, independentemente de serem identificados e classificados como de interesse em saúde. Eles são classificados da seguinte forma:

- Marcador de interesse em saúde: constituinte conhecido ou geralmente reconhecido ou grupo(s) de constituintes que estão associados a desfechos de interesse em saúde pública, visto que, acima ou abaixo de determinado limite, este(s) exerce(em) atividade terapêutica ou efeito toxicológico indesejável não toleradas para ingredientes ou são ineficazes para a(s) finalidade(s) a que se propõe(m). O produto deve ser padronizado em relação ao nível destes marcadores de tal maneira que seja reprodutível;
- Marcador analítico: constituinte ou grupo(s) de constituintes que serve apenas para fins analíticos e não contribui para a atividade de interesse em saúde, em relação a qual o produto é ajustado para obter uma composição reprodutível.

8.3 Caracterização

A caracterização é a determinação de características distintivas e qualidades especiais de um ingrediente usando uma variedade de métodos físicos e/ou químicos. As petições de Avaliação de Segurança e/ou Eficácia de Ingredientes requerem informações sobre a caracterização destes produtos, de forma a avaliar adequadamente a evidência da sua identidade, sua segurança e/ou sua eficácia.

8.3.1 Compostos Químicos Isolados

Ingredientes altamente purificados, tais como isolados e equivalentes sintéticos, devem ser descritos pelo nome químico do ingrediente como um todo; por exemplo, o nome deve incluir o sal ou frações hidratadas e não apenas o nome da fração ativa.

8.3.2 Ingredientes Processados

Para ingredientes como extratos vegetais, a caracterização pode ser definida pelos métodos e controles usados para processar o ingrediente. Deve haver medidas adequadas de controle de qualidade implementadas em todas as etapas do processo de fabricação para garantir a consistência de lote para lote.

1. Caracterização de processos de materiais brutos

- Os materiais brutos podem ser caracterizados pela forma como foram obtidos e pela forma como os materiais foram colhidos e limpos.
- A caracterização adicional pode ser definida pelo processamento após a colheita / purificação (ou seja, se os materiais foram secos ou mantidos frescos, se os materiais foram mantidos inteiros, cortados ou em pó)
- A caracterização da identidade, pureza e estabilidade do material bruto é de importância considerável, especialmente quando os materiais brutos são adicionados aos produtos acabados diretamente, sem processamento adicional.
- A caracterização de microrganismos vivos inclui a viabilidade da linhagem, em meios de cultura específicos, temperaturas de incubação, atmosfera de incubação, coleta de células etc.

2. Caracterização de processos para ingredientes altamente processados

- A caracterização deve incluir uma descrição completa de como os materiais foram processados.
- Substâncias que são processadas ou quimicamente modificadas após a purificação do(s) ingrediente(s) são consideradas ingredientes diferentes do ingrediente original. Por exemplo, processos tais como fermentação, esterificação para diminuir a labilidade ácida, hidrólise para aumentar a solubilidade ou bioatividade, ou estabilização por conversão numa forma de sal, resultam todos na produção de um ingrediente diferente.

8.3.3 Extratos Vegetais

A caracterização fitoquímica dos extratos vegetais é de fundamental importância para a identificação destes e, portanto, para o desenvolvimento das especificações e subsequente avaliação de risco. Durante um determinado período, pode-se acompanhar diferentes lotes de produção do extrato vegetal para se obter um perfil fitoquímico histórico, embora isso possa levar várias colheitas e ciclos de produção. Estes dados históricos são coletados retrospectivamente, podendo ser usados para a caracterização fitoquímica do extrato vegetal. Nos casos em que não seja

possível estabelecer um perfil fitoquímico histórico bem consistente, recomenda-se que seja traçado o perfil fitoquímico considerando ao menos 3 lotes independentes do extrato vegetal. Este perfil deve ser pautado em laudos analíticos identificando devidamente os lotes do extrato vegetal analisado, bem como todos os compostos identificados, suas respectivas quantidades e unidades de medida, bem como os métodos analíticos empregados. Os métodos devem ser referenciados e validados.

De acordo com o documento intitulado “Guidance on equivalence of herbal extracts in complementary medicines”, fatores como o ingrediente botânico, o processo e o solvente de extração e a relação matéria-prima / extrato vegetal nativo afetam o perfil fitoquímico dos componentes extraídos de espécies botânicas. Tais fatores são detalhados nas seções seguintes.

8.3.3.1 Fatores que afetam o perfil fitoquímico dos extratos vegetais

8.3.3.1.1 *Ingrediente botânico*

Espécies vegetais provenientes de diferentes épocas do ano ou de diferentes situações climáticas/geográficas podem fornecer diferentes quantidades de componentes fitoquímicos extraíveis.

Os principais fatores que afetam o perfil fitoquímico de componentes extraídos de um ingrediente botânico são o tipo (espécie) e a parte da planta. Se um destes parâmetros for alterado, o resultado será um produto distinto.

Para identificar inequivocamente as espécies botânicas, os fabricantes devem seguir as BPA. Princípios que devem ser seguidos pelos produtores e coletores de materiais vegetais para garantir a identificação e autenticação da planta estão incluídos em vários documentos detalhados. Consulte, por exemplo, “Boas Práticas para Identificação de Plantas”, “[Diretrizes de Boas Práticas Agrícolas e de Coleta da Organização Mundial de Saúde](#)”. A Instrução Normativa n. 15/2017 estabelece a necessidade de comprovação do depósito de exemplares da espécie botânica regional em herbários.

8.3.3.1.2 *Processo de Extração*

O tipo de processo de extração utilizado para fabricar um extrato vegetal, incluindo tamanho do lote, tempo, temperatura e pressão de extração, são fatores que influenciam o perfil fitoquímico do extrato vegetal.

8.3.3.1.3 Solvente de Extração

O tipo, a concentração e a quantidade de solvente afetam o perfil fitoquímico do extrato vegetal. Uma mudança no tipo de solvente usado para fazer um extrato é atualmente considerada como uma prática que resulta em um produto distinto. No entanto, uma pequena variação na concentração de solvente pode ser considerada aceitável, e é improvável que afete significativamente o perfil fitoquímico. As faixas descritas no quadro abaixo são consideradas improváveis de afetar significativamente o perfil fitoquímico do extrato vegetal. Por exemplo, um extrato produzido a partir da concentração de 1% de solvente poderia ser equivalente ao extrato produzido com 0,5% a 1,5% do mesmo solvente, desde que mantidas as demais variáveis de produção (mesmo procedimento de extração, tempo, temperatura, pressão, espécie e parte da planta etc.).

Concentração do solvente	Variação aceitável
1%	0.5% - 1.5%
5%	2.5% - 7.5%
7.5%	3.75% - 11.25%
10%	5% - 15%
15%	7.5% - 22.5%
20%	10% - 30%
30%	20% - 40%
40%	30% - 50%
50%	40% - 60%

Quadro 1: concentração do solvente e respectivas variações aceitáveis.

8.3.3.1.4 Proporção de extração (relação matéria-prima/extrato vegetal nativo)

Em alguns casos, a variação no peso seco de uma matéria-prima vegetal usada na preparação de extrato vegetal pode afetar o perfil fitoquímico do produto, bem como afetar a sua segurança e/ou eficácia. Portanto, é necessário informar a relação matéria-prima/extrato vegetal nativo alvo da avaliação de risco. Essa relação significa o quanto de extrato vegetal (sem considerar quaisquer excipientes ou substâncias adicionadas) é formado a partir de determinada quantidade da matéria-prima. Por exemplo, uma proporção de 2:1 indica que são usados 2 kg da matéria-prima vegetal para a obtenção de 1L de extrato vegetal.

Diante do exposto, pode-se concluir que os diversos fatores acima mencionados podem afetar a equivalência (padronização) de extratos vegetais. O quadro 2 abaixo descreve a influência dos parâmetros de fabricação e qualidade na quantidade de extrato vegetal obtido e no perfil fitoquímico.

Parâmetro	Quantidade de extrato (proporção de extrato nativo)	Perfil fitoquímico dos componentes
1. Ingrediente botânico:		
tipo	+	+
parte da planta	+	+
teor de água	+	
grau de cominuição	#	
2. Solvente de extração		
tipo	+	+
concentração	+	+
quantidade	+ (maceração)	+ (maceração)
taxa de fluxo*		
3. Processo extração		
Tipo (maceração/percolação)	+	+

duração	#	#
temperatura	+	+
pressão	+	+
4. Equipamento		
altura de enchimento	+	
pressão estática **		
tamanho do lote (extrator, evaporador, secador)		

Legenda

+ Este parâmetro impacta na quantidade de extrato ou no perfil fitoquímico

sem influência desde que a extração estável ou exaustiva seja alcançada

* a taxa de fluxo influencia a velocidade de extração quando é usada a percolação como método de fabricação

** a pressão estática influencia a velocidade de extração

1 Esta tabela foi baseada em informações incluídas em Gaedcke F., Steinhoff B e Blasius, H. Medicinal Herbal Medicinal Products: Scientific e Regulatory Base for Development, Quality Assurance and Marketing Authorization, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart 2003.

Quadro 2: fatores que afetam o perfil fitoquímico de extratos vegetais

Se não for possível estabelecer a equivalência de um extrato vegetal via controles de processo (como descrito acima), a análise de equivalência pode ser feita usando cromatogramas de perfil fitoquímico dos extratos vegetais. A comparação de dois extratos para determinar o grau de similaridade ou diferença deve incluir uma avaliação quantitativa, bem como uma avaliação qualitativa dos perfis cromatográficos. Este tipo de comparação é fundamental para o estabelecimento das especificações de extratos vegetais ou para a comparação de determinados extratos com especificações publicadas.

8.3.3.2 Técnicas para identificação de espécies botânicas

Técnicas macroscópicas/organolépticas: estas técnicas incluem características morfológicas e anatômicas definidas de toda a planta ou parte da planta; desde ramificação de raízes, forma do caule, forma e disposição das folhas e organização das flores, frutos e sementes, até mesmo cor, cheiro, gosto, etc. Referências a guias de flora e campo e comparação a espécimes disponíveis em bancos de espécies botânicas podem ser utilizados. Essas características são determinadas em relação à matéria-

prima, antes que a forma original do material seja modificada durante o processo de obtenção.

Técnicas microscópicas: O uso de técnicas de alta ampliação e luz especial ou de coloração é necessário para examinar as características estabelecidas para o ingrediente. Estes exames devem ser comparados com materiais de referência autenticados ou internos e / ou descrições técnicas autorizadas (por exemplo, Farmacopeia europeia).

Identificação química: Essas técnicas incluem métodos como cromatografia, espectrometria, gravimetria, eletroforese capilar, impressão digital de DNA, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier ou espectroscopia de infravermelho próximo. Estudos genômicos, proteômicos e metabolômicos, combinados com técnicas estatísticas, como Análise de Componentes Principais, podem ser muito úteis para distinguir até mesmo pequenas diferenças, incluindo a origem da matéria-prima.

A combinação de características botânicas e testes de identificação química devem ser utilizados para evitar a identificação equivocada do produto botânico.

Extratos de material vegetal podem ser identificados pelas características do material original, como mencionado acima, antes do processo de extração e da impressão digital cromatográfica do extrato. Extratos também podem ser identificados por constituintes de interesse em saúde ou marcadores analíticos.

8.3.3.3 Cromatografia

8.3.3.3.1 Perfil cromatográfico

Um cromatograma de perfil ou, como é mais comumente conhecido, um cromatograma de "impressão digital", é um perfil cromatográfico de um ingrediente botânico, uma preparação de um material à base de plantas ou outra substância que pode ser comparada com uma amostra de referência ou padrão.

Quando um cromatograma de perfil é usado para determinar se uma determinada preparação à base de plantas não é significativamente diferente de outra preparação à base de plantas, o perfil deve ser exclusivo da substância e suficientemente abrangente para fornecer uma base para assegurar a identidade e consistência da substância com a qual está sendo comparada. Ao determinar se dois extratos ou preparações são 'essencialmente os mesmos', os cromatogramas de perfil devem ser realizados no extrato nativo, sem a adição de veículos ou outras substâncias.

O cromatograma do perfil deve inicialmente visar refletir a possível variação que pode ocorrer para uma substância, portanto, os peticionantes devem assegurar que os cromatogramas do perfil representem, na medida do possível, a maior variação possível da variabilidade da substância. Isso pode envolver uma investigação dos perfis de substâncias de diferentes fontes, e de plantas, possivelmente estações diferentes. Isso é mais relevante se houver preocupações de que a segurança ou a qualidade possam ser comprometidas pela fonte da substância. Onde a literatura indica que o potencial de substituição ou adulteração é possível, então as condições e técnicas usadas para desenvolver o cromatograma de perfil também devem permitir a detecção de adulterantes e diferenciação de substitutos.

Ao desenvolver um cromatograma de perfil para determinar se duas preparações à base de plantas são 'essencialmente as mesmas', os peticionantes precisam considerar substâncias que não serão determinadas como parte do perfil. O cromatograma de perfil deve incluir todos os grupos de componentes relevantes, e não apenas aqueles que são considerados responsáveis pelo risco ou benefício do ingrediente (por exemplo, amidos ou açúcares). Se conhecido, e quando praticável, um cromatograma de perfil deve, portanto, ser acompanhado de informações sobre quaisquer constituintes da substância que não são perfilados.

A justificativa para não elaborar o perfil destes outros constituintes deve ser fornecida com base no fato destes não terem qualquer efeito sobre a identidade do ingrediente botânico.

8.3.3.3.2 Desenvolvimento de perfil cromatográfico

Nenhuma técnica única pode ser recomendada para o desenvolvimento de um cromatograma de perfil. Os peticionantes devem primeiro realizar uma pesquisa bibliográfica rigorosa para garantir que as condições do cromatograma do perfil ainda não tenham sido desenvolvidas por outros pesquisadores. Os peticionantes podem avaliar a técnica mais apropriada para usar, considerando a natureza dos constituintes principais ou significativos da substância; por exemplo, óleos voláteis em uma substância seriam melhor determinados por cromatografia gasosa (GC) do que a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), enquanto a cromatografia em camada fina (TLC) poderia ser mais apropriada do que a HPLC para determinar açúcares em uma substância.

Ao desenvolver um cromatograma de perfil, os peticionantes podem precisar experimentar as diferentes técnicas cromatográficas usando diferentes solventes (incluindo solventes de extração) ou condições de eluição, diferentes fases estacionárias e diferentes técnicas de detecção ou derivatização. As técnicas e condições usadas para desenvolver um cromatograma de perfil devem ser otimizadas para produzir a quantidade máxima de informações. Além disso, os peticionantes podem

combinar técnicas para obter perfis mais detalhados de uma substância. Em geral, as técnicas e procedimentos devem ser:

- objetivos e reprodutíveis;
- sob medida para se adequar às características dos componentes que são o alvo das determinações;
- eletivos o suficiente para separar os componentes que, tanto quanto se sabe, são característicos da substância;
- suficientemente gerais para traçar o maior número de componentes possível;
- robustos o suficiente para garantir que componentes lábeis ou instáveis sejam identificados, especialmente quando se trata de estabilidade de uma substância;
- otimizados para produzir cromatogramas de perfil de alta qualidade.

Os peticionantes devem estar cientes de que um cromatograma de perfil representativo e as técnicas e condições para o desenvolvimento desses cromatogramas seriam disponibilizados publicamente. Isso visa a garantir que os ingredientes botânicos utilizados e os extratos obtidos possuem qualidade e segurança aceitáveis.

8.3.3.3 Interpretação do Cromatograma do Perfil

A interpretação dos cromatogramas de perfil envolve:

- desenvolver especificações do cromatograma do perfil utilizando cromatogramas de ingredientes botânicos de qualidade aceitável;
- comparar e contrastar o tamanho, a forma e a distribuição de picos ou pontos relevantes na amostra e nos cromatogramas padrão ou de referência;
- avaliar essas diferenças e semelhanças com as especificações do cromatograma de perfil para determinar a conformidade com a especificação.

Antes que qualquer amostra de uma substância possa ser comparada com um material padrão, as especificações com as quais as amostras futuras precisarão estar de acordo devem ser determinadas. Para cromatogramas de perfil, essa abordagem envolve a determinação dos picos / pontos-chave ou indicativos e o desenvolvimento de tolerâncias que podem ser usadas para avaliar amostras da substância. Observe que esse processo pode precisar ser realizado em vários comprimentos de onda diferentes para garantir que todos os componentes / grupos de componentes relevantes que podem ser usados para estabelecer a equivalência de preparação tenham sido identificados.

Para desenvolver estas tolerâncias, pode ser necessário examinar cromatogramas de perfil de:

- material degradado ou de baixa qualidade contendo a substância, uma vez que isso fornecerá uma indicação das variações de pico ou manchas associadas a uma substância abaixo do padrão;
- a substância 'cravada' com adulterantes ou substitutos conhecidos, uma vez que isto fornecerá uma indicação da especificidade do método.

Os picos/pontos chave ou indicativos são aqueles que estão associados à degradação da substância e/ou à presença de adulterantes ou substitutos. Ao selecioná-los, os peticionantes não devem se concentrar indevidamente em um tipo de constituinte (por exemplo, flavonóides). Os peticionantes devem trabalhar do geral para o específico, em vez de se concentrar em constituintes específicos no início.

O tamanho, a forma e a distribuição dos resultados podem ser utilizados para determinar as especificações do cromatograma de perfil. Peticionantes também podem considerar as proporções de certos resultados e não apenas os resultados individuais para os constituintes. As proporções podem, às vezes, representar melhores indicadores de qualidade, porque permitem que os controles sejam determinados para mais de um constituinte e podem ser particularmente úteis quando mais de uma substância é associada ao risco e/ou eficácia.

A extensão permitida de variações nos cromatogramas de perfil precisará ser determinada caso a caso. Isso ocorre porque pequenas variações podem ser importantes, particularmente se a variação estiver associada à presença de uma ou mais substâncias tóxicas ou à eficácia do produto. Por outro lado, alterações brutas podem, às vezes, ter um significado limitado.

Como ponto de partida, os peticionantes devem considerar as especificações que limitam:

- quaisquer alterações nos resultados dos componentes que sejam superiores a +/- 10%, no caso de constituintes relacionados à segurança e/ou à eficácia;
- quaisquer alterações nos resultados dos componentes que sejam superiores a +/- 20 por cento, no caso dos demais componentes.

Os peticionantes podem adotar limites mais amplos de especificação, desde que justificados. Grandes variações nas especificações do cromatograma de perfil não devem ser usadas como um meio de legitimar ingredientes de baixa qualidade. As especificações devem ser suficientemente amplas para permitir variações normais nos constituintes da substância.

O analista deve notar quaisquer semelhanças e diferenças entre os cromatogramas obtidos da amostra e da amostra de referência, particularmente para quaisquer componentes identificados nas especificações. Similaridade em áreas importantes, assim como diferenças, devem ser registradas, particularmente quando o peticionante estiver ciente de que um pico ou mancha está associado a um constituinte de significado toxicológico (segurança) ou à eficácia. Diferenças nos resultados, que excedem os critérios de +/- 10% ou +/- 20% discutidos anteriormente, devem ser exploradas e a aceitação de tais amostras em um produto acabado deve ser justificada.

8.3.3.4 Especificações de extratos vegetais

Considerando o exposto nas seções supratranscritas, as especificações para extratos padronizados devem incluir:

- i. parte do vegetal usada;
- ii. forma de apresentação (exemplo: forma líquida);
- iii. aspectos sensoriais (exemplos: cor, aparência);
- iv. caracterização físico-química (exemplos: densidade relativa, pH, grau Brix);
- v. identificação do(s) marcador(es) declarados (se aplicável);
- vi. impurezas ou contaminantes (matérias estranhas, contaminantes inorgânicos, resíduos de solventes para extratos que não sejam obtidos com etanol ou água e possíveis resíduos de pesticidas);
- vii. processo de obtenção do extrato vegetal (exemplos: maceração, percolação);
- viii. temperatura, pressão e tempo empregados no processo produtivo;
- ix. tipo de solvente, sua concentração e quantidade usada no processo produtivo;
- x. relação matéria-prima/ingrediente (corresponde à proporção entre a quantidade de matéria-prima usada e a quantidade de extrato vegetal obtido).

8.3.4 Identificação adequada de ingredientes contendo enzimas

Em termos de identificação de enzimas, existem três perspectivas diferentes para se observar os ingredientes enzimáticos:

- i) enzimas como compostos ativos caracterizados por sua estrutura molecular ou por sua função;
- ii) concentrados enzimáticos contendo o componente ativo (isto é, a enzima) mais quaisquer impurezas resultantes do caldo de fermentação e os passos subsequentes de purificação;
- iii) a preparação enzimática destinada tanto à aplicação intermediária como coadjuvante de tecnologia, sendo as enzimas inativadas no produto antes da

comercialização, quanto para a disponibilização com as enzimas na forma ativa, classificada como alimento.

8.3.4.1 Enzimas como compostos ativos

As enzimas são os catalisadores dos sistemas biológicos; quase todas as enzimas conhecidas são proteínas. As unidades estruturais das proteínas são aminoácidos. Basicamente, todas as proteínas em todas as espécies, de bactérias para humanos, são construídas a partir do mesmo conjunto de vinte aminoácidos. As cadeias laterais desses aminoácidos diferem em tamanho, forma, carga, capacidade de ligação de hidrogênio e reatividade química. Eles podem ser agrupados da seguinte forma:

- cadeias laterais alifáticas - glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e de prolina;
- cadeias laterais alifáticas hidroxila - serina e treonina;
- cadeias laterais aromáticas - fenilalanina, tirosina e triptofano;
- cadeias laterais básicas - lisina, arginina e histidina;
- cadeias laterais ácidas - ácido aspártico e ácido glutâmico;
- cadeias laterais amídicas - asparagina e glutamina;
- cadeias laterais de enxofre - cisteína e metionina.

Quase todas as enzimas são constituídas por mais de 100 unidades de aminoácidos, o que lhes confere uma massa superior a 10 kDa e um diâmetro superior a 25 Å. O sítio ativo de uma enzima é a região que liga o(s) substrato(s) (e o grupo proteico, se houver) e contém os resíduos que participam diretamente da reação catalítica. Esses resíduos são chamados de grupo catalítico. O sítio ativo compreende uma parte relativamente pequena do volume total de uma enzima. A maioria dos resíduos de aminoácidos em uma enzima não está em contato com o substrato.

Os arranjos teoricamente possíveis de 20 aminoácidos dentro de um polipeptídeo de comprimento de 100 aminoácidos ou mais resultarão em uma quantidade quase infinita de moléculas diferentes. Aparentemente, a estrutura tridimensional exerce mais influência nas características da enzima que a sequência de aminoácidos.

As enzimas compartilham algumas propriedades com polímeros; ambos são macromoléculas que consistem em um conjunto (definido) de elementos (geralmente dispostos em sequência linear) dando origem a estruturas tridimensionais complexas. Os polímeros geralmente consistem em apenas um ou poucos elementos diferentes, que geralmente são organizados em padrões regulares. Os polímeros são, portanto,

caracterizados pelas proporções dos respectivos elementos, comprimento médio (ou alcance) das cadeias e grau de ramificação. Esse tipo de descrição é suficiente, pois a ordem exata e o local exato de um determinado elemento geralmente não importam em polímeros. Em contraste, a ordem e a natureza exatas dos aminoácidos determinam a estrutura tridimensional das proteínas, que por sua vez é importante para suas propriedades.

As enzimas podem, portanto, ser descritas pela sequência de aminoácidos e pela conformação tridimensional. Enquanto as substâncias químicas são tradicionalmente descritas pela sua estrutura molecular, as enzimas, em contraste, são geralmente caracterizadas por parâmetros funcionais.

8.3.4.1.1 Propriedades relacionadas à função das enzimas

Por razões históricas, as enzimas são definidas pela sua função / papel dentro do sistema biológico (células procarióticas ou eucarióticas). Isso é refletido na nomenclatura (parâmetros N1 - N5 da Tabela 3). As interações do ligante enzimático (parâmetros E1 - E9 da Tabela 3) referem-se à especificidade de uma enzima: indicam se a enzima é adaptada (por natureza / evolução ou via biotecnologia) para ser altamente específica para um único substrato ou se é capaz de reagir em uma ampla gama de substratos relacionados ou mesmo completamente diferentes. A necessidade de ligantes são indicadores de mecanismos que controlam a atividade enzimática. Parâmetros funcionais (parâmetros F1 – F8 da Tabela 3), tais como ótimos e faixas de pH e temperatura, assim como parâmetros cinéticos (atividade específica, número de *turnover*) podem ser considerados como uma impressão digital funcional da enzima. Além disso, são importantes no que diz respeito às condições de aplicação.

N°	Nomenclatura	Descrição
N1	Número EC	O número EC é dado pela IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular). Classes de enzimas e subclasses são definidas de acordo com a reação catalisada. Um Número EC é composto por quatro números divididos por um ponto. Por exemplo, a álcool desidrogenase tem o número EC 1.1.1.1. O termo número IUB é frequentemente usado como sinônimo de número EC.
N2	Nome recomendado	Nome dado pela IUBMB
N3	Nome sistemático	Nome dado pela IUBMB

N4	Nomes da enzima	Nomes dados pela IUBMB ou encontrados em outras bases de dados, referências bibliográficas, abreviaturas e referências cruzadas a outras enzimas.
N5	Sinônimos	Nomes encontrados em outras bases de dados, referências bibliográficas, abreviaturas e referências cruzadas para outras enzimas.
N6	Número de registro CAS	A maioria das enzimas possui um único número de Chemical Abstracts Service (CAS). Alguns não têm números, alguns têm dois ou mais números. Às vezes, duas enzimas compartilham um número comum.
N7	Reação	A reação é definida pelo IUBMB.
N8	Tipo de reação	De acordo com a classe de enzimas, um tipo de reação pode ser atribuído. Isso pode ser oxidação, redução, eliminação, adição ou um nome de reação.
N9	Organismo	O nome sistemático ou o nome comum do organismo.
Interações-ligante enzimáticas		
E1	Ligantes	Os ligantes são definidos como se segue: se for possível ou conveniente considerar parte de uma entidade molecular poliatômica como central, então os átomos, moléculas ou grupos ligados a essa parte são chamados de ligantes. Ligantes de enzimas atuam, por exemplo, como inibidores, ativadores, co-substratos, substratos ou produtos.
E2	Substratos e produtos	Todos os substratos naturais e sintéticos e produtos são listados (não em quantidades estequiométricas). A informação da reversibilidade da reação é dada.
E3	Substratos	Todos os substratos naturais ou sintéticos são listados.
E4	Produtos	Todos os produtos naturais ou sintéticos são listados.
E5	Substratos naturais	O substrato que é usado no metabolismo normal da célula. Só é dado quando é mencionado na literatura.
E6	Cofatores	Todos os compostos que atuam como cofatores verdadeiros: muitas enzimas requerem a presença de um cofator adicional, não-proteico. Alguns deles são íons metálicos como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , K^{+} e Na^{+} . Alguns cofatores são pequenas moléculas orgânicas chamadas

		coenzimas (por exemplo, vitaminas, açúcares, lipídios). As coenzimas podem ser covalentemente ligadas à parte proteica (denominada apoenzima) de enzimas como um grupo prostético. Outros ligam-se mais livremente e, de fato, podem se ligar apenas temporariamente à enzima enquanto realiza seu ato catalítico.
E7	Metais / íons	Este campo lista todos os íons ou sais que possuem efeitos de ativação, ou estão intimamente ligados à enzima.
E8	Inibidores	Os compostos encontrados como inibidores estão listados.
E9	Compostos ativos	Todos os compostos são administrados com efeitos de ativação, exceto íons metálicos ou cofatores.
Parâmetros relacionados à atividade enzimática (parâmetros funcionais)		
F1	Valor K_m (Parâmetro complementar)	A constante de Michaelis, ou valor de K_m , é definida como a concentração de substrato que dá origem a uma velocidade igual a metade da velocidade máxima; o K_m fornece como medida aproximada a informação sobre a afinidade enzima-substrato: um K_m alto indica uma baixa afinidade e vice-versa. A unidade desse valor é mM para um determinado substrato.
F2	Número de rotação (k_{cat}) (Parâmetro complementar)	O número de rotação é definido como o número de moléculas de um substrato que são transformadas por minuto por uma única molécula de enzima quando a enzima está trabalhando no seu máximo. O número de rotação (k_{cat}) é dado na unidade 1 / min. para um substrato específico e geralmente está na faixa de 10^3 a 10^7 por segundo.
F3	Atividade específica	A atividade específica é a velocidade da reação enzimática catalisada (geralmente V_{max}) para a enzima desejada dividida pela quantidade total de proteína na amostra. A unidade deste valor é micromol / min / mg de proteína. À medida que o esquema de purificação avança, a atividade específica deve aumentar. Em uma amostra pura, a atividade específica atingirá um máximo fundamental, que é proporcional ao k_{cat}
F4	%TOS	Percentual de sólidos orgânicos totais por unidade de peso. Considera-se que %TOS = 100 – (cinzas + água +

		diluyente + outros ingredientes da formulação). FAO/WHO. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing. Compendium of food additive specifications, sixty-seventh meeting. FAO JECFA Monographs 3, 2006 (ISBN 92-5-105559-9). ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0675e/a0675e00.pdf .
F5	pH ótimo	Diferentes enzimas têm diferentes pH ótimos, onde a enzima é mais ativa, dependendo do organismo e do ambiente em que eles evoluíram.
F6	Faixa de pH	Faixa de pH em que a enzima está ativa.
F7	Temperatura ótima	Diferentes enzimas têm diferentes temperaturas ótimas, onde a enzima é mais ativa, dependendo do organismo e do ambiente em que elas evoluíram.
F8	Faixa de temperatura	Faixa de temperatura em que a enzima está ativa

Os parâmetros listados na tabela 3 acima, são detalhados no documento [“Collection of information on enzymes”](#), publicado pela Comunidade Europeia.

8.3.4.1.2 Da estrutura à função - investigando enzimas "semelhantes"

Para conferir aspectos de segurança da enzima, tais como a toxicidade e alergenidade, devem ser realizados testes para verificação de alinhamento entre a sequência proteica da enzima e sequências proteicas conhecidas como fatores de virulência (alergênicos, hemolisinas, toxinas, etc).

8.3.4.1.2.1 Relação estrutura-função

A função enzimática é determinada pela sua estrutura proteica. Um olhar mais atento sobre a relação entre a estrutura da enzima e a função enzimática, no entanto, elucidará a natureza complexa, por vezes intrigante e contraditória, dessa relação. As peculiaridades da relação estrutura-função são particularmente importantes para se ter em mente ao avaliar se as enzimas com diferenças na sequência de aminoácidos e / ou modificações pós-tradução são equivalentes em relação às propriedades funcionais. A Figura 1, abaixo, ilustra as possíveis implicações das diferenças na estrutura primária para a função enzimática: diferentes estruturas

primárias podem resultar em estruturas terciárias similares (mesmas dobras), e diferentes estruturas terciárias (dobras) podem resultar na mesma função catalítica.

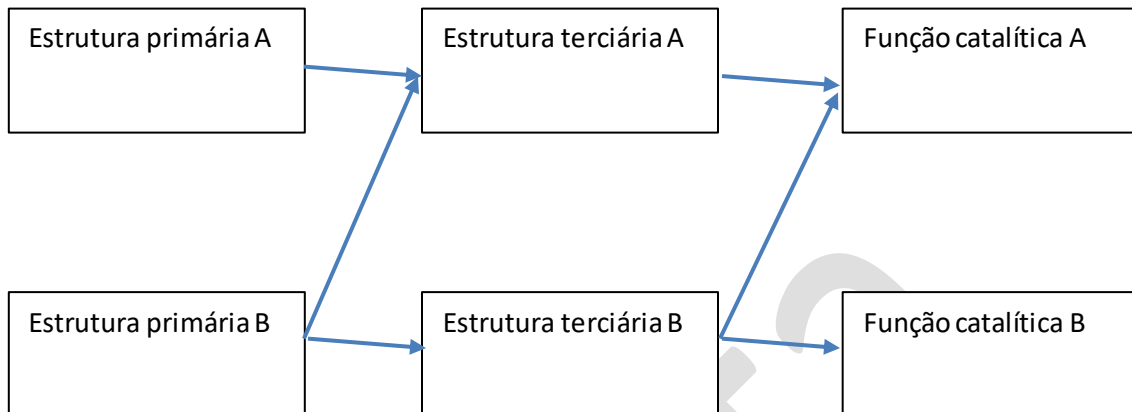


Figura 1: Relação estrutura-função

A extensão das diferenças entre a sequência de aminoácidos da enzima A e da enzima B nem sempre é um indicador confiável, quer a estrutura terciária ou a função estejam alteradas ou não, uma vez que, para as enzimas, a localização da modificação é relevante. Existe uma diferença significativa, quer as inserções de aminoácidos ocorram no local ativo ou próximo dele ou em algum outro local da molécula. Como uma função particular pode ser preenchida de mais de uma maneira, proteínas diferentes adquirem a capacidade de servir a funções similares (convergência funcional). Existem numerosos exemplos de enzimas independentemente evoluídas que catalisam as mesmas reações. Por exemplo, a capacidade de hidrolisar a ligação peptídica tem evoluído muitas vezes: existem as sulfidrilas proteases, metaloproteases, aspartil proteases, serina proteases e algumas outras (RAWLING et al., 1993). Além disso, as proteases de serina evoluíram em pelo menos três ocasiões diferentes, como evidenciado pelas enzimas subtilisina, tripsina e tipo α - β (OLLIS et al., 1992). Uma das maiores surpresas surgidas da determinação precoce de proteínas de estrutura de raios X foi a observação de que em duas diferentes proteases de serina, as cadeias laterais da tríade catalítica foram reunidas na mesma geometria a partir de dobras e arranjos de sequências completamente diferentes (convergência mecanicista) (KRAUT, 1977). Os segmentos α e β frequentemente ocorrem alternadamente em uma sequência proteica e se dobam em complexos α - β . Suas estruturas tridimensionais são notavelmente similares, mas geralmente não existe homologia de sequência detectável. Muitos deles podem ter descendido de um ancestral comum, mas a grande diversidade de funções poderia refletir uma convergência estrutural geral à mesma estrutura, seja como resultado da estabilidade destes complexos ou de sua facilidade de formação. É evidente que é a estrutura terciária que determina a função. A relação entre a sequência de aminoácidos e a estrutura terciária ainda não está bem estabelecida. No entanto, é muito melhor

definido que a relação entre a sequência de aminoácidos e a função da proteína. A mesma dobra é frequentemente vista em famílias homólogas aparentemente diferentes com funções diferentes. Em contraste, uma variedade de funções bioquímicas pode ser realizada por proteínas com a mesma dobra ou mesmo por membros de uma única família homóloga. GERLT & BABBITT (2000) chamam a atenção para um problema importante, possivelmente insuficientemente reconhecido, de alinhamento funcional, ou seja, que proteínas homólogas não precisam catalisar a mesma reação química.

Mesmo nos casos em que a identificação funcional é bem especificada por homologia à sequência de consenso altamente conservada, há vários exemplos em que sequências altamente similares têm funções completamente diferentes. GERLT & BABBITT (2000) descreveram um exemplo de uma família mecanicamente diversa, onde diferentes reações de oxidação ocorrem sem divergência de sequência significativa: Uma oleato-hidroxilase de *Lesquerella fendleri* compartilha 81% de identidade de sequência com uma oleato-dessaturase de *Arabidopsis thaliana* mas 71% de identidade com uma oleato-hidroxilase de *Ricinus communis*. Esses fatos sugerem que a divergência de função é fácil e pode ter ocorrido muitas vezes na especificação de plantas superiores. Notando que sete resíduos foram conservados em oleato-dessaturases de várias espécies mas divergiram em hidroxilases; Sommerville e colaboradores (GERLT & BABBITT, 2000) construíram bibliotecas de mutantes nos quais estes resíduos conservados foram substituídos. Curiosamente, apenas quatro substituições foram capazes de converter um oleato 12-dessaturase em uma hidroxilase; na direção oposta, seis substituições converteram uma hidroxilase em uma dessaturase (ambas as enzimas têm o mesmo substrato: oleato). Esses achados ilustram que a diversidade mecânica não requer uma grande divergência significativa na sequência e ressaltam que altos níveis de identidade de sequência não garantem a mesma função enzimática.

8.3.4.1.2.2 Homologia e Similaridade

Esta seção discute os diferentes significados quando as enzimas são consideradas homólogas ou similares. Primeiro, é preciso esclarecer a confusão que desperta o uso facultativo dos termos homologia, similaridade e analogia ao comparar proteínas na literatura científica. As proteínas são geralmente comparadas umas com as outras ao nível da sequência de nucleotídeos ou ao nível da sequência de aminoácidos deduzida. Como a sequência de aminoácidos contém a informação relevante para a função proteica, a análise concentra-se principalmente na estrutura primária da proteína. Por vezes também são consideradas propriedades estruturais secundárias e terciárias. Sequências homólogas são denominadas homólogos e este termo pode ser aplicado a genes e proteínas. Os homólogos parecem semelhantes uns aos outros e parecem compartilhar ancestrais comuns, mas podem ou não exibir a mesma atividade. Os heterólogos diferem tanto na origem (sem similaridade na sequência de aminoácidos) quanto na atividade. Os análogos têm atividade comum, mas não de

origem comum (sem homologia de sequência). Semelhança é um termo quantitativo que define o grau de correspondência de sequências entre duas sequências comparadas. Se sequências alinhadas contiverem 28 correspondências de 39 possíveis, o grau de similaridade será então de 28/39 ou 72%. Semelhança e Homologia: Quando duas sequências (ácido nucléico ou proteína) são semelhantes em um curto espaço de tempo ou de maneira global, isso não significa necessariamente que elas compartilharão funcionalidades comuns. Por outro lado, quando duas sequências são homólogas, elas compartilham identidades funcionais comuns em algum lugar ao longo de suas sequências. Um nível muito alto de similaridade entre duas ou mais sequências é um forte indicador de homologia entre elas. Global *versus* Local: As semelhanças globais consideram a extensão inteira das sequências sendo comparadas, e uma pontuação de similaridade quantitativa é atribuída. Tentativas iniciais de criar algoritmos para pesquisas de similaridade focaram principalmente em semelhanças globais (NEEDELMAN & WUNSCH, 1970). Algoritmos globais geralmente não são sensíveis a sequências altamente divergentes com algumas semelhanças locais dentro deles. As semelhanças entre sequências podem ser mais bem analisadas com algoritmos de similaridade local que, em geral, atribuem um “score” de similaridade total para duas sequências com base em uma soma dos “scores” de similaridade local. Na análise de sequência comparativa, duas ou mais sequências podem ser comparadas uma com a outra ou as bases de dados de sequências nucleotídicas / proteicas são pesquisadas a partir de uma sequência de dados e produzindo um conjunto de proteínas possivelmente homólogas. Os algoritmos FASTA (PEARSON & LIPMAN, 1988) e BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) são comumente usados como aproximações. Entretanto, existem bancos de dados específicos que podem também ser consultados diretamente, tais como, www.allergenonline.org e www.allergen.org, para investigação de alérgenos; e <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>, para investigação de fatores de virulência de bactérias.

Fatores que afetam o percentual de similaridade:

A porcentagem de similaridade entre proteínas calculada usando programas de alinhamento de computador é altamente afetada por esquemas de pontuação e métodos de alinhamento, conforme descrito em detalhes por Geoffrey J. Barton em STERNBERG (1996). A pontuação depende da identidade ou, alternativamente, do grau de similaridade entre os aminoácidos encontrados. Por exemplo. Esquemas de classificação de similaridade química visam dar mais ênfase ao alinhamento de aminoácidos com propriedades físico-químicas semelhantes. Isto é desejável, uma vez que alterações importantes no tipo de aminoácidos podem reduzir a capacidade da proteína para desempenhar o seu papel biológico. Longa experiência com esquemas de pontuação baseados em substituições observadas sugere que eles são superiores à simples identidade, código genético ou esquemas de propriedades físico-químicas intuitivas. Dado um esquema de pontuação, o próximo problema é como comparar as sequências, decidir como elas são semelhantes e gerar um alinhamento. Os resultados

podem ser diferentes dependendo do tamanho da janela aplicado e das inserções ou exclusões permitidas. Para sequências de proteínas, o algoritmo de alinhamento local mais comumente utilizado que permite intervalos é o descrito por SMITH & WATERMAN (1981). Além disso, vários fatores podem ser calculados a partir de alinhamentos de sequências que proporcionam informação adicional sobre a homologia de sequências, por exemplo, desvio padrão e porcentagem de identidade (em uma determinada parte (comprimento) da sequência). Quando um alinhamento de duas ou mais sequências é feito, a implicação é que os resíduos equivalentes estão desempenhando funções estruturais similares na proteína dobrada nativa. O melhor juiz de precisão de alinhamento é assim obtido comparando alinhamentos resultantes da comparação de sequências com aqueles derivados de estruturas tridimensionais de proteínas. Determinar a homologia com base na estrutura tridimensional é muito mais complicado. Os métodos disponíveis baseiam-se no alinhamento dos elementos da estrutura secundária, bem como no alinhamento das distâncias atômicas *intra* e *inter*-moleculares.

8.3.4.1.2.3 Conclusões

A partir destes resultados, pode-se concluir que uma função enzimática particular pode ser preenchida por estruturas proteicas diferentes e estruturas semelhantes podem dar origem a diferentes funções enzimáticas. A substituição de apenas um resíduo de aminoácido pode mudar o tipo catalítico de uma enzima. Esta questão está intimamente relacionada com a homologia como homologia geral, por exemplo, com base na sequência de aminoácidos, isso não implica necessariamente que as enzimas resultantes também estão intimamente relacionadas em relação à função. Assim, designando enzimas como homólogas, como é frequentemente feito no contexto científico e às vezes também regulatório, isso não implica necessariamente que elas sejam idênticas na estrutura primária ou na estrutura terciária. Mesmo que sejam altamente semelhantes, como mostrado por um alto número percentual, isso não implica necessariamente que eles sejam idênticos na função catalítica. A validade do número percentual é muito limitada e é necessário considerar o algoritmo particular aplicado e os parâmetros utilizados, por exemplo, homologia global ou local, esquema de pontuação, métodos de alinhamento, indels (inserções / deleções), tamanho da janela, tendo em conta a homologia da estrutura terciária. Assim, para tornar esses números mais significativos, é preciso considerar parâmetros adicionais que também devem ser documentados no decorrer dos estudos de homologia.

- Algoritmo (s)
- Matriz de substituição: Todos os programas modernos de busca usam matrizes de substituição. A escolha da matriz de substituição pode afetar

significativamente os resultados da pesquisa. Portanto, é imperativo documentar quais matrizes (ou matrizes) foram usadas na pesquisa e no alinhamento.

- Penalidade de lacuna. Para algoritmos que usam penalidades de lacuna (como FASTA), é crítico indicar a penalidade de diferença usada.

- Nome do banco de dados. Especificação explícita do banco de dados utilizado, não apenas por tipo (nucleotídeo, proteína, sequência).

- Versão do banco de dados. Os bancos de dados estão mudando muito rapidamente, muito mais rápido que o ciclo de publicação e frequentemente mais rápido do que os administradores de sistemas locais podem manipular. Portanto, é essencial declarar a versão do banco de dados usado. Se pesquisar um banco de dados constantemente atualizado, a data da última pesquisa deverá ser informada.

Infelizmente, muitas comparações de sequências publicadas não atendem a esses requisitos.

8.3.4.2 Concentrados de enzimas e preparações enzimáticas

Uma caracterização de produtos enzimáticos não leva em conta apenas enzimas como os compostos ativos (caracterizados por sua estrutura molecular ou por função). A seguir, os parâmetros aplicáveis para a caracterização de concentrados enzimáticos (compreendendo o componente ativo (ou seja, a enzima) mais quaisquer impurezas resultantes das etapas de fermentação e purificação e preparações enzimáticas finais (concentrado enzimático mais aditivos) serão delineados. Como quase todas as enzimas industriais são fabricadas e como a maioria das regulamentações se concentra em microrganismos, as fontes animais e vegetais não são consideradas nesta seção.

8.3.4.2.1 Concentrados enzimáticos

Basicamente, existem três diferentes produtos de fermentação em uso contendo atividade enzimática:

- (i) Produto de fermentação microbiana bruto: As enzimas, assim como todo o meio, são recuperadas, em conjunto com outros metabólitos e substâncias de fermentação. Isto inclui os sólidos solúveis associados à fermentação
- (ii) Uma fonte de enzima mais purificada consiste apenas na porção solúvel do produto de fermentação, a partir da qual os sólidos foram separados.

(iii) Produto enzimático relativamente puro resulta da extração e purificação dos sólidos solúveis.

Assim, dependendo das sucessivas etapas de purificação, o concentrado de enzima resultante da fermentação não contém apenas a proteína enzimática ativa, mas também sobras da fermentação, solventes de extração etc. A enzima ativa, proteína no concentrado enzimático, compõe 25 - 75% para usos tecnológicos em alimentos e enzimas alimentares. O resto (25-75%) consiste em impurezas.

A natureza e a porcentagem das impurezas dependem da:

- escolha do material de origem (meio de produção e meio físico),
- do próprio processo de fermentação,
- das etapas subsequentes de purificação.

As impurezas de um concentrado de enzima, portanto, variam até certo ponto devido a mudanças nos parâmetros operacionais. As impurezas particulares são consideradas contaminantes:

- microrganismos, esporos,
- toxinas e antibióticos,
- contaminantes inorgânicos, e
- DNA.

Contaminantes que são prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente são de grande preocupação. Assim, uma seleção cuidadosa do organismo de produção, bem como o monitoramento do processo de produção para garantir condições higiênicas, são cruciais para evitar contaminantes no produto de fermentação resultante.

Organismo de produção

Os microrganismos de produção não são selecionados apenas por sua capacidade de produzir a enzima desejada. O organismo também deve ser não-toxigênico, ou seja, não deve produzir quaisquer toxinas prejudiciais ao consumidor ou ao meio ambiente, e não patogênicos, para garantir a segurança dos trabalhadores na fábrica de produção de enzimas. No caso da produção de toxinas, a produção dos metabólitos tóxicos pelos fungos (micotoxinas) é a principal preocupação. Outras toxinas possíveis são enterotoxinas, neurotoxinas e antibióticos.

Na prática, a gama de organismos comercialmente utilizados na produção de enzimas é bastante limitada. Normalmente, uma determinada cepa é selecionada e / ou modificada para melhoramento genético (por exemplo, maior rendimento enzimático). Mesmo cepas que foram submetidas a rearranjos genéticos consideráveis, resultando em múltiplas mudanças de propriedades fisiológicas induzidas por mutagênese ou por técnicas de engenharia genética, não são consideradas como

constituindo uma nova espécie. No entanto, a descrição precisa, bem como a avaliação de segurança de uma linhagem de produção são importantes.

Meios

Um meio adequado para a produção de enzimas por fermentação consiste em uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, minerais e água. A fonte de carbono pode consistir em açúcares, álcoois e ácidos orgânicos. O nitrogênio é frequentemente fornecido por proteínas animais ou vegetais, mas aminoácidos, peptídeos, nitratos e amônia também podem ser adequados. Os minerais são principalmente adicionados como sais. Os meios usados para a fermentação têm que se manter em certas condições de uso: as matérias-primas utilizadas para a fermentação devem ser de alta qualidade e livres de contaminantes tóxicos. As matérias-primas são geralmente esterilizadas antes do uso. Se a enzima for destinada a ser usada em alimentos, todos os ingredientes (incluindo o meio) também devem ser de grau alimentício.

Processo de produção

O processo de fermentação é monitorado durante todo o período de fermentação. O controle do processo de produção deve ser baseado em um programa de controle bem definido de acordo com um sistema de qualidade reconhecido (por exemplo, BPF). Este sistema inclui o controle e verificação / ajuste do equipamento, amostragem e análise, e o uso de resultados analíticos para controle de processo. Todos os procedimentos de controle estão bem documentados durante a fabricação. Pureza e identidade do organismo devem ser verificadas regularmente durante este período. A contaminação com organismos estranhos (patogênicos) também é verificada: Por exemplo, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*. Para aplicação em alimentos, limites para a presença de coliformes, bem como a contagem viável total são definidos. O concentrado enzimático também deve ser analisado quanto à presença de contaminantes inorgânicos, como arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio.

8.3.4.2.1.1 Conclusão

Como as impurezas resultantes da fermentação e purificação são altamente complexas e variáveis, o concentrado enzimático é melhor descrito pela linhagem de produção e pelo próprio processo de produção. A ausência ou nível de contagem viável total, microrganismos patogênicos conhecidos e toxinas, bem como contaminantes inorgânicos devem ser verificados, se necessário.

8.3.4.2.2 Preparação enzimática

A preparação enzimática é formulada para o produto no qual a enzima será utilizada. Os aditivos servem como estabilizadores, conservantes, granulados, revestimentos e (des)corantes. As fichas de dados de segurança de materiais, informações sobre o produto e folhetos técnicos descrevem a composição e as propriedades de uma preparação enzimática comercializada. No geral, as seguintes informações são listadas:

- Identificação da preparação e da empresa
- Informações sobre os ingredientes
- Propriedades físicas e químicas
- Estabilidade e reatividade
- Informações toxicológicas, informações ecológicas
- Identificação de perigos, medidas de primeiros socorros, Medidas de combate a incêndio, medidas de liberação acidental
- Manuseio e armazenamento, controles de exposição / proteção individual
- Considerações sobre descarte, informações de transporte, informações regulamentares, outras informações

As especificações de enzima geralmente contêm algumas ou todas as informações apresentadas no Anexo III deste Guia.

8.3.5 Identificação adequada de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia

Para se realizar a identificação e caracterização de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia deve-se levar sempre em consideração os últimos modelos de especificações estabelecidos pelo JECFA (FAO-OMS) ou pelo FCC (Food Chemical Codex) para substâncias semelhantes (estrutura química, função, etc). Nos anexos deste Guia, devem ser considerados o Anexo I e o anexo IV – categoria 8. Caso outros formulários, gerais ou específicos, constantes nos anexos deste guia, sejam mais adequados para determinados casos específicos, podem ser utilizados com as devidas justificativas e sempre com vistas a uma identificação e caracterização que favoreçam a padronização, principalmente em relação aos parâmetros relacionados à segurança e à finalidade tecnológica.

8.3.6 Identificação adequada de ingredientes contendo microrganismos (probióticos)

Este assunto já foi abordado pela Anvisa recentemente no [Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos](#), na seção sobre a identificação de probióticos.

8.3.7 Identificação adequada de ingredientes específicos

Isolados e equivalentes sintéticos de materiais de origem natural (por exemplo, flavonóides como rutina e vitaminas) devem ser identificados no estágio de matéria-prima por descrição física (por exemplo, cor, forma cristalina, ponto de fusão ou ponto de ebulição, rotação óptica, etc.) e testes de identificação química apropriados, como a espectroscopia de infravermelho, também devem ser realizados. Por exemplo, os óleos de peixe podem ser caracterizados pela composição de ácidos graxos do óleo, acidez, quantidade de anisidina, índice de peróxidos, valor total de oxidação (Totox), tempos de retenção de pico específicos da cromatografia comparados com um padrão de referência e/ou quaisquer outros testes de identificação apropriados.

Se o ingrediente é uma enzima, a caracterização inclui detalhes do organismo de origem. Detalhes adicionais, como eletroforese em gel, especificidade do substrato, ponto isoelétrico e atividade específica também devem ser documentados. O teste pode ser feito de acordo com métodos analíticos validados ou métodos farmacopéicos aprovados pela International Enzyme Commission.

Para microrganismos em que a identificação da linhagem é necessária (por exemplo, probióticos), deve ser fornecida uma descrição qualitativa de características da espécie probiótica. Isto inclui parâmetros de identidade tais como a identificação binomial (por exemplo, *Bifidobacterium longum*) e a identidade das linhagens probióticas, que deve ser determinada de forma inequívoca usando a metodologia mais atual válida, usando uma combinação de métodos fenotípicos e genotípicos. A identidade da linhagem deve ser verificada rotineiramente. A identificação deve garantir também a ausência de bactérias não pertencentes ao produto no estágio de matéria-prima.

8.4 Quantificação

As especificações consistem em parâmetros qualitativos e quantitativos dos ingredientes. Para cada parâmetro quantitativo especificado, elencado na etapa de identificação e caracterização do ingrediente, é necessário estabelecer a variabilidade,

considerando as BPF e as BPA, os requisitos legais pertinentes, as referências internacionais (farmacopeias ou não), se disponíveis e os limites de detecção e quantificação dos métodos analíticos.

As especificações de ingredientes devem conter informações detalhadas para cada composto de interesse em saúde, respeitando suas quantidades limite estabelecidas nas conclusões das petições de Avaliação de Segurança e Eficácia de Ingredientes.

8.4.1 Quantificação por ensaio

A quantificação por ensaio é um método para determinar a presença ou quantidade de um componente ou ingrediente. No caso de ingredientes contendo compostos de interesse em saúde que são entidades químicas únicas, aqueles que contêm um constituinte que é usado para padronizar um produto, ou para aqueles que têm uma atividade biológica conhecida, testes quantitativos podem ser feitos no estágio final do produto, de acordo com métodos analíticos apropriados descritos nas farmacopeias (por exemplo, USP, Farmacopeia Europeia).

8.4.1.1 Ingredientes botânicos, incluindo extratos

Os compostos marcadores específicos podem ser analisados em espécies botânicas inteiras ou extratos de ingredientes botânicos. Se nenhum padrão farmacopeico estiver disponível para o ensaio do marcador, é responsabilidade do peticionante determinar os limites apropriados para o marcador com base nos dados de segurança e eficácia do produto e na variabilidade natural do marcador.

Se a evidência que sustenta uma alegação for baseada na quantidade de um componente de interesse em saúde específico, então a quantificação desse componente deve ser realizada no estágio final do produto.

Quando o componente que é analisado é encontrado em vários ingredientes do produto, ex.: cafeína no chá verde e no guaraná, então as especificações devem ser definidas para refletir a quantidade total de todas as fontes.

8.4.1.2 Vitaminas e Minerais

Para vitaminas, testes quantitativos devem ser feitos no produto acabado de acordo com métodos analíticos apropriados descritos em uma farmacopeia aceitável ou outros métodos internacionalmente aceitos. Os limites de tolerância para a

quantidade de vitaminas e minerais individuais devem ser conforme os limites estabelecidos na legislação.

8.4.1.3 Microrganismos vivos

A quantificação de microrganismos vivos deve ser realizada usando métodos de cultura seletiva na matéria-prima e/ou no estágio final do produto. A contagem total das células deve ser expressa como unidades formadoras de colônia (UFC) por grama ou por ml.

No caso em que o ingrediente é uma mistura de microrganismos, é aceitável listar a contagem total de CFU como a quantidade e listar as estirpes como fontes do ingrediente probiótico.

8.4.1.4 Enzimas

A quantidade por unidade de dosagem deve incluir a atividade da enzima. A atividade é medida de acordo com a reação catalisada por enzimas individuais (especificidade do substrato). Métodos e unidades (por exemplo, Unidades de Lipase FCC, Unidades de Lactase FCC) especificadas no Food Chemicals Codex (FCC) devem ser usadas. Os testes quantitativos para um componente específico em um extrato podem ser feitos no estágio de produto acabado ou no estágio do ingrediente de extrato usando métodos analíticos apropriados. Se a quantidade de uma enzima for declarada em peso, a atividade deve ser declarada como uma potência. É responsabilidade do peticionante, dos fabricantes e dos distribuidores e importadores garantir que todos os produtos atinjam um mínimo de 80% do rótulo de potência atividade no final do prazo de validade, com base nos estudos de estabilidade conduzidos para o produto.

9 PADRÕES DE PUREZA

As especificações dos ingredientes devem conter informações detalhadas sobre a pureza, incluindo seus limites de tolerância. Os peticionantes, os fabricantes, os importadores e distribuidores são responsáveis por garantir que todos os esforços possíveis sejam feitos para entender o potencial de contaminação e o impacto na população que consome o produto, a fim de minimizar a presença de contaminantes. As especificações dos ingredientes devem incluir os métodos e os limites de tolerância para os contaminantes microbianos e químicos.

Os peticionantes, os fabricantes, os importadores e os distribuidores também devem considerar testes apropriados para contaminantes não listados neste guia que possam ser necessários para o seu produto (por exemplo, testes de aflatoxina se a presença de aflatoxinas for provável (por exemplo, ginseng, amendoim)).

9.1 Contaminantes microbiológicos

Boas Práticas Agrícolas (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) são necessárias para garantir baixos níveis de contaminação microbiana. Técnicas rotineiras de redução microbiana não devem ser usadas como substituto das BPF ou para garantir que o produto acabado atenda às especificações de contaminação microbiana.

O ensaio para contaminação microbiana deve ser realizado no estágio final de fabricação do ingrediente. Se o teste de contaminação microbiológica não for realizado nesta etapa, o peticionante deverá fundamentar cientificamente a isenção desses testes.

As monografias geralmente estabelecem os seguintes parâmetros microbiológicos:

- Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios;
- Contagem de bolores e leveduras;
- *Salmonella spp.*;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Pseudomonas aeruginosa*.

Os ensaios devem ser feitos de acordo com métodos da Farmacopeias (USP, Farmacopeia Europeia etc), da Organização Mundial da Saúde (OMS) ou qualquer outro método reconhecido internacionalmente e devem apresentar resultados como adequados para uso.

Os limites de tolerância devem estar em conformidade com os estabelecidos em farmacopeias apropriadas (por exemplo, USP, Farmacopeia brasileira e Farmacopeia Europeia).

9.2 Contaminantes inorgânicos

Os contaminantes inorgânicos incluem catalisadores e contaminantes ambientais que podem estar presentes em matérias-primas ou produtos acabados. Essas impurezas podem ocorrer naturalmente, ser adicionadas intencionalmente como parte do processo de fabricação ou serem introduzidas inadvertidamente (por exemplo, através de interações com o equipamento de processamento). Os contaminantes inorgânicos podem ser testados individualmente ou como metais pesados totais expressos como chumbo no estágio final de elaboração do ingrediente ou na etapa da matéria-prima, se todos forem testados. O teste deve ser feito de acordo com os métodos de teste aceitáveis da monografia do ingrediente, farmacopêicos, ou quaisquer outros métodos internacionalmente aceitos para elementos individuais.

Os limites de contaminantes inorgânicos tolerados em alimentos estão estabelecidos na [Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 42, de 29 de agosto de 2013](#), que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.

9.3 Outras impurezas

É responsabilidade do peticionante, do fabricante, do importador ou do distribuidor garantir que todas as matérias-primas usadas na fabricação do ingrediente ou alimento tenham especificações apropriadas. As especificações das monografias de referência devem ser consultadas ao estabelecer as especificações para um ingrediente ou alimento.

A USP, a Farmacopeia europeia e monografias do FCC são exemplos de algumas monografias apropriadas para o controle da qualidade de um ingrediente ou produto acabado.

9.3.1 Micotoxinas (ex.: aflatoxina)

A [Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011](#), é a norma vigente que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. A necessidade de testes com micotoxinas depende se a contaminação fúngica for considerada provável.

É responsabilidade do peticionante, do fabricante, do distribuidor e do importador determinar quais micotoxinas podem apresentar um risco à saúde e determinar os métodos de teste e os limites de tolerância para as micotoxinas em questão, com base da RDC n. 7/2011 supracitada.

9.3.2 Resíduos de solventes

Os solventes conhecidos por causar toxicidades inaceitáveis (ICH Classe I) não são considerados apropriados para os alimentos e ingredientes. Se os solventes da Classe I não puderem ser evitados, a confirmação da aceitabilidade do solvente é necessária antes de ser usada na matéria-prima. O uso de solventes associados a toxicidade menos severa (Classe II do ICH) deve ser limitado para proteger os consumidores de potenciais efeitos adversos. Sempre que possível, os solventes menos tóxicos (ICH Classe III) devem ser usados. Essas listas de classes estão disponíveis nas [Diretrizes do ICH para solventes residuais](#).

O teste para solventes deve ser feito de acordo com os métodos da Farmacopeia (USP, Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Europeia, etc) usando técnicas de cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os limites de tolerância para resíduos de solvente devem estar em conformidade com os limites ICH ou farmacopeicos.

Se apenas solventes ICH de Classe III forem utilizados na fabricação do ingrediente, um teste para perda na secagem com um limite de tolerância não superior a 0,5% é considerado aceitável para testar resíduos de solvente.

Para fins de avaliação de solventes em alimentos também são aceitas as diretrizes da [Diretiva 2009/32/CE](#).

9.3.3 Preparações Enzimáticas

A produção e a análise de enzimas devem ser realizadas em conformidade com as especificações gerais para preparações enzimáticas usadas no processamento de alimentos publicadas pela Food and Agriculture Organization (FAO) em conjunto com o Comitê de Especialistas da OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA).

9.3.4 Impurezas incidentais, substâncias relacionadas e impurezas do processo

As etapas de processamento ou purificação podem introduzir impurezas orgânicas ou inorgânicas (por exemplo, compostos intermediários, outros isômeros, compostos racêmicos, reagentes, catalisadores e produtos de degradação) no ingrediente. Todas as impurezas conhecidas presentes na matéria-prima em níveis significativos devem ser listadas nas especificações da matéria-prima com seus testes e limites de tolerância associados e estar disponíveis mediante solicitação.

Se o perfil de impureza de um ingrediente isolado ou sintético for alterado devido a uma mudança no material de origem ou no processo de fabricação, as especificações revisadas com os novos limites de tolerância para as impurezas devem ser submetidas a nova avaliação.

9.3.5 Ingredientes irradiados

Em circunstâncias específicas, onde há risco de contaminação por radiação, pode ser necessário testar a radioatividade. A Resolução de Diretoria Colegiada - RDC 21, de 26 de janeiro de 2001, no item 4.1.7, estabelece que a irradiação, assim como qualquer outro processo de tratamento de alimentos, não deve ser utilizada em substituição as boas práticas de fabricação e ou agrícolas.

Segundo o item 4.3 da mesma RDC, qualquer alimento poderá ser tratado por radiação desde que sejam observadas as seguintes condições:

- a) A dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida;
- b) A dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou os atributos sensoriais do alimento.

Com base nestes princípios deve-se definir a dose absorvida e fazer constar na especificação do ingrediente.

9.3.6 Estabilidade oxidativa em óleos

O teste de estabilidade oxidativa é aplicável a todos os óleos que possuem alto grau de insaturação para garantir a estabilidade. As análises devem ser feitas de acordo com os métodos analíticos validados de organizações padronizadoras de métodos, tais como AOAC, AOCS, ISSO, NMKL e/ou farmacopeicos para os valores de acidez e peróxidos, conforme a Resolução de Diretoria Colegiada – [RDC n. 270, de 22 de setembro de 2005](#), que estabelece o Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal, item 5. O Item 5.3 desta Resolução ainda estabelece que a identidade de óleos vegetais, incluindo azeites de oliva, e de gorduras vegetais

deve atender aos requisitos de composição estabelecidos em normas do Codex Alimentarius - FAO/OMS. Neste sentido, os padrões do Codex Committee on Fats and Oils – CCFO devem ser acessados na página do Codex Alimentarius, com vistas à verificação dos requisitos de identidade pertinentes a cada tipo de produto. O atendimento destes requisitos deverá ser refletido na monografia de especificações do produto.

9.3.7 Adulterantes potenciais

Adulterações podem ocorrer como resultado de práticas de controle de qualidade insatisfatórias ou podem ser propositas para usar alternativas mais baratas ou alterar a eficácia do ingrediente. Eles podem ou não representar risco à saúde dos consumidores. É responsabilidade do peticionante, do fabricante, do importador e do distribuidor garantir que o ingrediente esteja isento de adulteração.

9.3.8 Ingredientes provenientes de tecidos suscetíveis à encefalopatia espongiforme transmissível e à encefalopatia espongiforme bovina.

É responsabilidade do peticionante garantir que todos os produtos estejam isentos de agentes causadores de encefalopatia espongiforme transmissível e de encefalopatia espongiforme bovina. Declaração de que o ingrediente está isento destes agentes deve estar presente na especificação do produto.

Além disso, recomenda-se que não se usem tecidos suscetíveis à encefalopatia espongiforme transmissível, incluindo ossos (exceto coluna vertebral ou crânio) de chifres de gado bovino, ovino ou caprino. Recomenda-se o uso de alternativas, tais como materiais vegetais, gelatina feita de materiais de animais que não são suscetíveis à encefalopatia espongiforme transmissível (por exemplo, porco), ou gelatina feita a partir de pele e peles de qualquer outro animal.

10 ANÁLISES E CRITÉRIOS ADICIONAIS

10.1 Indicadores gerais de qualidade

10.1.1 Matérias estranhas

Estes parâmetros possuem o objetivo de possibilitar a avaliação da presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas, como o vidro, a areia e resíduos de insetos ou de roedores, indicativas de riscos à saúde humana e/ou as indicativas de falhas na aplicação das boas práticas na cadeia produtiva de alimentos e ingredientes. O teste deve ser feito de acordo com métodos de referência validados e com base na [Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 14, de 28 de março de 2014](#), que dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências.

10.1.2 Determinação de cinzas

Este teste é importante para se determinar a quantidade de impurezas inorgânicas na forma de materiais estranhos (não biológicos) que estão presentes em alimentos e ingredientes.

10.1.3 Conteúdo de água

Este ensaio é necessário quando o material é conhecido como higroscópico. Os limites de tolerância devem ser justificados pelos dados sobre os efeitos da absorção de umidade no produto (por exemplo, potência e estabilidade). Um procedimento de "perda por secagem" pode ser adequado, mas em alguns casos (por exemplo, plantas contendo óleos essenciais), testes específicos como o método de Karl Fischer podem ser necessários.

10.2 Ensaios e requisitos analíticos para apoiar as alegações, advertências e informações nutricionais complementares – INC veiculadas no rótulo de alimentos

Ensaios de rotina devem aparecer nas especificações dos ingredientes utilizados em alimentos que veiculam alegações de propriedades funcionais ou de saúde no rótulo e/ou informações nutricionais complementares e/ou advertências, como “não contém glúten” (Lei n. 10.674, de 16 de maio de 2003, que obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca; e Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 40, de 8 de fevereiro de 2002, que aprova o regulamento técnico para rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contêm glúten), declarações de alergênicos (Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 26, de 2 de julho de 2015, que dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares), lactose (Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 136, de 8 de fevereiro de 2017, que estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos), Informações nutricionais complementares – INC (Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 54, de 12 de novembro de 2012, que dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar).

Na maioria das vezes, a eficácia de alegações de propriedades funcionais para alimentos depende da presença de certos componentes em determinadas quantidades mínimas no alimento, durante toda a vida de prateleira, para que o alimento seja considerado eficaz para a alegação ou finalidade que o peticionante alega exercer. Nestes casos, estes parâmetros devem ser refletidos na monografia de especificação e quantificados com métodos apropriados farmacopeicos ou outros internacionalmente reconhecidos.

11 ANEXOS

ANEXO I – MODELO DE ESPECIFICAÇÃO GERAL PARA INGREDIENTES ALIMENTARES, EXCETO PROBIÓTICOS E ENZIMAS

PARÂMETRO DE TESTE	LIMITES DE TOLERÂNCIA
Identidade	
Descrição física do ingrediente	Cor, Forma, outros limites de tolerância, conforme apropriado. Se o produto for uma única entidade química, apresentar a fórmula molecular ou estrutural
Descrição do Processo de obtenção	Descrição abreviada do processo de obtenção do ingrediente com indicação dos PCCs
Identidade de cada marcador (de interesse em saúde e analíticos) no ingrediente	Conforme apropriado para identificar o ingrediente e garantir a segurança e/ou eficácia
Contaminantes microbiológicos	
Aer. meso. viáveis/mL L. monocytogenes/25g C. sulfito redutor a 46°C Salmonella sp / 25g Coliformes a 45°C / g Estaf.coag.positiva / g Pseudomonas aeruginosa B. cereus	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis.
Outros testes de contaminantes microbiológicos importantes, a depender do ingrediente	Limites definidos em farmacopeias ou outras referências reconhecidas
Contaminantes inorgânicos e solventes	
Arsênio	RDC n. 42/2013 ou atualização
Chumbo	RDC n. 42/2013 ou atualização
Cádmio	RDC n. 42/2013 ou atualização
Mercúrio	RDC n. 42/2013 ou atualização
Estanho	RDC n. 42/2013 ou atualização
Resíduos de Solventes	Limites estabelecidos pela USP ou pelo ICH
Parâmetros de teste específicos	
Micotoxinas (ex.: aflatoxinas)	RDC n. 7/2011 ou atualização
Matérias estranhas	RDC n. 14/2014 ou atualização
Estabilidade oxidativa em óleos: acidez, índice de peróxidos e Totox	RDC n. 270/2005 e padrões Codex Alimentarius
Perfil de ácidos graxos para óleos e gorduras de origem animal ou vegetal	Codex Alimentarius ou outras referências reconhecidas

Perfil fitoquímico no caso de ingredientes botânicos, preparações botânicas, extrato nativo e extratos	Referências reconhecidas. O ingrediente solicitado deve possuir perfil fitoquímico equivalente ao do material utilizado nos estudos de segurança e/ou eficácia apresentados
Perfil aminoacídico para alguns ingredientes relacionados a dietas para fins especiais	Referências reconhecidas
Encefalopatia espongiforme transmissível e encefalopatia espongiforme bovina em ingredientes de origem animal	Declaração de isento dos patógenos relacionados
Rotação ótica para constituintes fontes de nutrientes	Codex Alimentarius ou outras referências reconhecidas
Radioatividade (para ingredientes irradiados)	A dose absorvida deve ser definida com base nos seguintes princípios: a) A dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida; b) A dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou os atributos sensoriais do alimento.
Conteúdo de cinzas	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Grau de pureza	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Impurezas incidentais (especificar)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Impurezas decorrentes do processo (especificar)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Impurezas específicas do ingrediente (especificar)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Substâncias relacionadas (especificar)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Adulterantes potenciais (especificar)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Produtos de degradação (especificar)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Hormônios (ingredientes de origem animal)	Ausentes
Outros indicadores de qualidade: a_w , pH, conteúdo de água, se aplicáveis	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não), se disponíveis
Quantificação	
Quantidade específica por ensaio ou por entrada para cada marcador de interesse em saúde ou analítico	Limite mínimo e/ou máximo de determinadas substâncias estabelecidas na Avaliação, com vistas a garantir a segurança e/ou eficácia do ingrediente ou padronizá-lo

ANEXO II – MODELO DE ESPECIFICAÇÃO GERAL PARA INGREDIENTES CONTENDO MICRORGANISMOS VIVOS (PROBIÓTICOS)

PARÂMETRO DE TESTE		MÉTODO	LIMITES DE TOLERÂNCIA
Identidade			
Descrição física do produto acabado		Cor, Forma, outros limites de tolerância, conforme apropriado	
Descrição do processo de obtenção		Descrição abreviada do processo de obtenção com indicação dos PCCs	
Identidade de cada microrganismo presente	classificação, origem e nomenclatura de cada microrganismo presente	N/A	N/A
	Identificação do gênero ou espécie (Métodos Fenotípicos, bioquímicos)	Características fenotípicas de bactérias incluem características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, e requerem a multiplicação do organismo em cultura pura, sob condições adequadas. Já suas características morfológicas são diretamente observáveis a olho nu (ex. forma, cor e textura de colônias) ou por microscopia (ex. forma da célula, tipo de agrupamento celular e coloração de Gram). As características fisiológicas se referem às condições nas quais os micro-organismos multiplicam, sobrevivem e perpetuam sua população. (ex. faixa de pH, crescimento em determinadas concentrações de sal, tolerância ao oxigênio, suscetibilidade/resistência a antimicrobianos). As	N/A

		características metabólicas, em sua maior parte, são indiretamente observadas porque se baseiam em reações bioquímicas ou atividades metabólicas dos micro-organismos. Os métodos bioquímicos geralmente envolvem crescimento em vários substratos, ensaios para avaliação de atividade enzimática ou ensaios para detecção de subprodutos metabólicos resultantes da atividade enzimática (ex. teste de catalase, oxidase, utilização de carboidratos e produção de ácidos).	
	Identificação do gênero ou espécie (Métodos Genotípicos)	Testes genotípicos comparam diretamente sequências, em vez de considerar a expressão do gene e, muitas vezes são necessários para a discriminação correta entre espécies e linhagens. Identificação de espécies por comparação com linhagens de idênticas e não idênticas, obtidas de uma coleção de culturas internacionalmente reconhecidas (por exemplo, ATCC; NCTC)	N/A
		Identificação da linhagem através do sequenciamento completo do genoma.	Amostragem / sequenciamento <i>in vitro</i> do genoma completo através de um método que é adequado para a espécie ou confirmação por meio de técnicas de tipagem (por exemplo, *RAPD-PCR; PFGE; ERIC-PCR; rep-PCR).
Contaminantes microbiológicos			

Aer. meso. viáveis/mL L. monocytogenes/25g C. sulfito redutor a 46°C <i>Salmonella sp</i> / 25g <i>Coliformes a 45°C / g</i> <i>Estaf.coag.positiva / g</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>B. cereus</i>	Métodos estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeicas ou não)	Limites definidos em farmacopeias ou outras referências reconhecidas
Outros testes de contaminantes microbiológicos importantes, a depender do ingrediente		Limites definidos em farmacopeias ou outras referências reconhecidas
Contaminantes inorgânicos		
Arsênio	Métodos estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeicas ou não)	RDC n. 42/2013 ou atualização
Chumbo		RDC n. 42/2013 ou atualização
Cádmio		RDC n. 42/2013 ou atualização
Mercúrio		RDC n. 42/2013 ou atualização
Estanho		RDC n. 42/2013 ou atualização
Impurezas relacionadas		Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeicas ou não)
Outros		Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeicas ou não)
Quantificação		
Contagem viável total em unidades formadoras de colônia (UFC)	Métodos estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeicas ou não)	Pelo menos 80% da quantidade declarada no rótulo no final do prazo de validade

Ensaio de Desempenho (se aplicáveis)		
Desintegração ou dissolução	Métodos estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não)
Ensaio de Virulência		
Resistência a antibióticos / antifúngicos	Microdiluição em caldo ou outro método não clínico equivalente.	Concentrações inibitórias mínimas (CIM) abaixo dos limites das espécies, conforme publicado por um painel internacionalmente reconhecido (por exemplo, EFSA).
Parâmetros de teste específicos		
Produção de fator de virulência	Comparação de PCR / Southern blot com uma cepa virulenta intimamente relacionada (controle positivo).	Ausência dos elementos genéticos responsáveis pela produção de fatores de virulência característicos da espécie.
Atividade toxigênica	Método <i>in vitro</i> confirmatório adequado para a espécie, ou outros métodos internacionalmente reconhecidos.	Ausência de produção de toxina conhecida para a espécie (por exemplo entérica, emética).
Informação sobre níveis residuais de toxinas sobre a identidade dos intermediários residuais ou metabolitos microbianos no produto	Métodos estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não)	Limites estabelecidos em referências reconhecidas (farmacopeias ou não)

- PCR: Polymerase chain reaction
- rep: Repetitive sequence-based
- RAPD: Random amplification of polymorphic DNA
- PFGE: Pulse field gel electrophoresis
- ERIC: Enterobacterial repetitive intergenic consensus

ANEXO III – MODELO DE ESPECIFICAÇÃO GERAL PARA ENZIMAS

Descrição geral do ingrediente	Nome químico
	Sinônimos
	Marca comercial
	Número CAS
	Número IUB ou equivalentes
	Identidade do organismo produtor No caso de OGM, citar o microrganismo doador e o receptor, além do código de identificação do próprio OGM.
	Forma de apresentação, aparência, cor
Formulação	Principais componentes (em %); aditivos, veículos etc.
Características físico-químicas	Tamanho da enzima e massa molecular
	Sequência de aminoácidos da enzima
	pH (se houver)
	Matéria seca (se houver)
	Densidade aparente (se houver)
	Viscosidade (se houver)
	Condutividade elétrica (se houver)
	Solubilidade (se houver)
Atividade enzimática	Atividade enzimática por unidade de peso
	Modo de ação, substratos e produtos de reação
	pH ótimo e faixas
	Temperatura ótima e faixas
	Cofatores
	Temperatura e condições de armazenamento
	As constantes catalíticas K_M e K_{cat} , bem como as condições sob as quais foram mensuradas (se houver).
Finalidade	Finalidade de uso
	Doseamento ou níveis de uso
	Categoria de alimentos em que será usada
Contaminantes microbiológicos	<p>Tipos e limites estabelecidos na RDC n. 12/2001 ou atualização e outros testes importantes definidos em literatura ou referências reconhecidas.</p> <p>Para enzimas usadas como coadjuvantes de tecnologia, são solicitadas as seguintes informações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coliformes totais • Escherichia coli • Salmonela

Contaminantes Inorgânicos	Tipos e limites estabelecidos na RDC n. 42/2013 ou atualização e outros testes importantes definidos em literatura ou referências reconhecidas. Para enzimas usadas como coadjuvantes de tecnologia, é solicitada a seguinte informação: <ul style="list-style-type: none"> • Chumbo
Atividade antimicrobiana	Recomenda-se o uso da metodologia do JECFA (1992) para avaliação da atividade antimicrobiana da enzima/preparação enzimática. A atividade antimicrobiana é medida por meio de zonas de inibição (halos) em placas, frente a diferentes bactérias (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Serratia marcescens</i>). A atividade antimicrobiana é considerada presente quando se detectam mais de 3 zonas de inibição ≥ 16 mm. Sugere-se consulta ao seguinte documento: JECFA. Compendium of food additive specifications . Vol. 1, Appendix A, Annex 1, Rome, 1992. http://www.fao.org/3/a-a0691e.pdf .
Eventuais resíduos de solventes de extração (se aplicável)	
Percentual de sólidos orgânicos totais por unidade de peso (%TOS)	Considera-se que %TOS = 100 – (cinzas + água + diluente + outros ingredientes da formulação). Orienta-se a consultar o seguinte documento: FAO/WHO. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing. Compendium of food additive specifications, sixty-seventh meeting . FAO JECFA Monographs 3, 2006 (ISBN 92-5-105559-9). ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0675e/a0675e00.pdf .
Outros	Nos casos em que a enzima é obtida de fungo, encaminhar laudos de análise das micotoxinas de importância. Recomenda-se analisar resquícios da cepa de produção, de forma a comprovar que o processo de purificação da enzima é eficaz.
Precauções de manuseio	Descrição dos procedimentos de manuseio necessários para garantir a segurança e a eficácia do produto
Método de produção	Descrição abreviada do processo de obtenção com indicação dos PCCs, o que pode incluir descrição das etapas de produção (ex.: inoculação, fermentação, filtração, condicionamento, embalagem), descrição do método de separação da preparação enzimática dos microrganismos ou de outras impurezas.

ANEXO IV – MODELOS DE ESPECIFICAÇÕES COMPLEMENTARES PARA ALIMENTOS E INGREDIENTES ESPECÍFICOS

CATEGORIA 1	Substâncias isoladas, quimicamente caracterizadas; Fontes constituídas, isoladas ou obtidas a partir de matérias de origem mineral inorgânica
	Nome químico (inequívoco) e nome químico de acordo com as regras de nomenclatura da IUPAC
	Material de origem, parte utilizada
	Número CAS e outros números de identificação, conforme disponíveis em fontes científicas estabelecidas
	Sinônimos, nomes comerciais, abreviaturas
	Fórmula molecular e estrutural
	Peso Molecular (ou peso atômico para elementos) (g / mol, Da)
	Tamanho de partícula, forma e distribuição, se aplicável
	Dados espectroscópicos (impressão) como IR, UV-VIS, RMN ou espectros de EM ou outros dados
	Descrição das propriedades físicas e químicas: aparência, ponto de fusão, ponto de ebulição, gravidade específica, estereoquímica (se houver)
	Solubilidade (referência, por exemplo, método geral JECFA para solubilidade (JECFA, 2006)) em água e outros solventes comuns
	Influência do pH na solubilidade; constante(s) de ionização
	Relação de partição octanol-para-água (KOW)
	Outros dados que o requerente considere podem ser úteis para apoiar a identidade da substância
CATEGORIA 2	Misturas de substâncias simples, caracterizadas quimicamente
	Nome químico, quando apropriado, de acordo com as regras de nomenclatura da IUPAC

	Material de origem, parte utilizada
	Composição química: identidade dos componentes da mistura, conforme requerido no item 1
	Número CAS, e outros números de identificação, conforme disponíveis em fontes científicas estabelecidas.
	Sinônimos, nomes comerciais, abreviaturas
	Proporção de cada componente na mistura
	Fórmulas moleculares e estruturais de cada componente na mistura
	Peso molecular (ou peso atômico para elementos) (g / mol, Da) de cada componente na mistura
	Dados espectroscópicos e cromatográficos (impressão de espectros / cromatogramas) que permitem a identificação dos componentes da mistura
	Descrição das propriedades físicas e químicas: aparência, estereoquímica, de cada componente (a menos que não seja aplicável)
	Solubilidade (referência, por exemplo, método geral JECFA para solubilidade (JECFA, 2006)) em água e outros solventes comuns
	Tamanho de partícula, forma e distribuição, se aplicável
	Outros dados que o requerente considere podem ser úteis para apoiar a identidade da mistura de substâncias simples
CATEGORIA 3	Misturas complexas não derivadas de fontes botânicas, possivelmente não totalmente caracterizadas quimicamente (extensão da caracterização química dependendo dos níveis de uso e uso propostos)
	Materiais iniciais ou materiais de origem
	Espécie, no caso de origem animal
	Nome químico, quando apropriado, de acordo com as regras de nomenclatura da IUPAC de cada componente

Número CAS e outros números de identificação, conforme disponíveis nas fontes científicas estabelecidas de cada componente. Uma mistura também deve ser identificada com o (s) número (s) de identificação apropriado (s), se disponível, de fontes científicas estabelecidas

Sinônimos, nomes comerciais, abreviaturas
Descrição química, o nível dos componentes principais na medida em que estes são conhecidos e o nível de componentes não identificados
Descrição das propriedades físicas e químicas
Solubilidade (referência, por exemplo, método geral JECFA para solubilidade (JECFA, 2006)) em água e outros solventes comuns
Tamanho de partícula, forma e distribuição, se aplicável

CATEGORIA 4	Fontes constituídas, isoladas ou produzidas a partir de animais e suas partes
------------------------	--

Nome científico (latim) (família zoológica, gênero, espécie, subespécie, raça, se aplicável)
Material de origem, parte utilizada
Sinônimos que podem ser usados de forma intercambiável com o nome científico
Nomes comuns (se um nome comum ou trivial for usado extensivamente, ele deve ser vinculado ao nome científico e parte usada)
Parte utilizada
Origem geográfica (continente, país, região)

CATEGORIA 5	Fontes de origem botânica
------------------------	----------------------------------

Nome científico (latim) (família botânica, gênero, espécie, subespécie, variedade com nome do autor, quimiotipo, se aplicável)
--

Sinônimos (nome botânico) que podem ser usados de forma intercambiável com o nome científico preferido
Nomes comuns (se um nome trivial ou comum for usado extensivamente na monografia, ele deve ser vinculado ao nome científico e à parte usada)
Parte usada (por exemplo, raiz, folha, semente)
Origem geográfica (continente, país, região)
Condições de crescimento e colheita (silvestres ou cultivadas; práticas de cultivo, época de colheita em relação à estação e ao estágio de crescimento da planta)
Forma de apresentação
Caracterização sensorial (cor, sabor etc.)
Caracterização físico-química (densidade, pH, grau Brix etc.)
Marcadores
Impurezas ou contaminantes (matérias estranhas, metais pesados resíduos de solventes etc.)
Processo de obtenção (tipo, duração, temperatura, pressão)
Solvente (tipo, concentração, quantidade)
Razão matéria-prima/extrato vegetal
Além disso, os dados sobre a composição química da fonte proposta derivada de plantas devem ser fornecidos com ênfase nas concentrações de constituintes relevantes de relevância; isto inclui as concentrações do seguinte:
Compostos classificados de acordo com a sua estrutura química (por exemplo, flavonóides, terpenóides, alcalóides)
Constituintes que são característicos do aditivo alimentar (impressão química, marcadores)
Constituintes que fornecem motivos de preocupação devido às suas propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas ou que estão relacionados com a eficácia do produto

	Devem ser fornecidas informações sobre níveis máximos de microrganismos e possíveis contaminantes, incluindo metais pesados, micotoxinas.
--	---

CATEGORIA 6	Fontes constituídas, isoladas ou produzidas a partir de culturas de células ou cultura de tecidos derivados de animais, plantas, fungos ou algas
------------------------------	---

	Fonte biológica (informação taxonômica sobre família, gênero, espécie, subespécie, variedade)
	Órgão e tecido ou parte do organismo de origem
	Coleta de laboratório ou cultura originada
	Informação sobre a identidade das células
	Células ou substrato de tecido usado como um novo alimento
	Tipo de cultura

CATEGORIA 7	Polímeros naturais, derivatizados e sintéticos
------------------------------	---

	Nome químico (ou seja, nome trivial inequívoco) e nome químico de acordo com a IUPAC
	Material de origem, parte utilizada
	Número CAS e outros números de identificação, conforme disponíveis em fontes científicas estabelecidas
	Sinônimos, nomes comerciais, abreviaturas
	Fórmula química e estrutural
	Peso molecular (ou peso atômico para elementos) (g / mol, Da) ou número médio de peso molecular e peso molecular médio (se possível)

	Fórmula estrutural de monômeros e materiais de partida, outros agentes envolvidos na polimerização
	Grau de substituição, percentagens de grupos substituídos (quando apropriado)
	Descrição das propriedades físicas e químicas
	Solubilidade (referência, por exemplo, método geral JECFA para solubilidade (JECFA, 2006)) em água e outros solventes comuns
	Tamanho de partícula, forma e distribuição, se aplicável
	Outros dados que o requerente considere podem ser úteis para identificar a mistura e seus componentes
CATEGORIA 8	Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia
	Nome comum e nome comercial
	Nome científico ou químico
	Identificação do INS (se aplicável)
	IDA ou outro valor de segurança estabelecido
	Especificações de natureza química: <ul style="list-style-type: none"> • Fórmula química; • Peso Molecular; • CAS (número de registro na Chemical Abstracts Service); • Estrutura molecular • Ensaio
	Descrição (coloração, odor, forma etc)
	Definição e breve descrição do processo de obtenção
	Caracterização (pureza, impurezas, contaminantes inorgânicos, microbiológicos, marcadores analíticos, ensaios para identificação entre outros testes considerados importantes para a caracterização da substância)
	Métodos para identificação e quantificação da substância no alimento

12 GLOSSÁRIO

Adulterantes: um ingrediente é considerado adulterado se qualquer substância ou classe de substâncias proibida estiver nele presente. Neste contexto, “proibido” significa estabelecido por orientação ou política ou regulamento. Neste documento de orientação, o termo "adulterante" é utilizado especificamente para designar uma substância não declarada, isto é, substâncias de interesse em saúde ou substâncias com valor econômico mais baixo adicionadas para aumentar o peso ou diminuir o custo. Como tal, o adulterante é distinguido separadamente do termo "contaminante".

Alga: membro do reino biológico Protista, consistindo de eucariontes multicelulares, unicelulares, coloniais ou relativamente simples que possuem uma parede celular contendo celulose ou sílica, que geralmente produzem energia pela fotossíntese usando clorofilas e pigmentos acessórios (alguns também podem ser heterotróficos em condições adequadas), que são essencialmente aquáticos e que não possuem embriões multicelulares dependentes.

Aminoácido: uma molécula orgânica contendo grupos amino e carboxílicos ligados ao mesmo átomo de carbono. Os aminoácidos são blocos de proteínas (constituintes principais) encontrados em uma planta ou material vegetal, uma alga, uma bactéria, um fungo ou um material animal não humano.

Bactéria: um membro do reino biológico Bactérias, consistindo de procariotas geralmente unicelulares (às vezes agregados, coloniais ou simples multicelulares) cujas células não possuem núcleos ou outra compartimentalização interna. A maioria das espécies possui uma parede celular externa à membrana plasmática, composta principalmente de peptidoglicano. As bactérias possuem diversos meios de nutrição; o grupo consiste principalmente de quimioheterotrofos, mas também há quimioautotrofos, fotoautotróficos e fotoheterotróficos. Eles se reproduzem por fissão binária.

Composto marcador: um constituinte que ocorre naturalmente no material e que é selecionado para atenção especial (por exemplo, para fins de identificação ou padronização) por um pesquisador ou fabricante. Os compostos marcadores não são necessariamente de interesse em saúde ou responsáveis pela eficácia do alimento ou ingrediente.

Consistência de lote para lote: a aplicação do conhecimento do produto, Boas Práticas Agrícolas e Boas Práticas de Fabricação para minimizar variações inerentes na composição de substâncias naturais, a fim de garantir um produto consistente de um lote para o outro.

Ensaio: um método para determinar a presença ou quantidade de um componente.

Enzima: uma proteína que age como um catalisador orgânico, aumentando a taxa na qual ocorre uma reação bioquímica específica. As enzimas podem ser derivadas de um material de origem animal (não-humano), vegetal, algal, bacteriano, fúngico.

Equivalente sintético: uma substância que compartilha uma estrutura química idêntica e propriedades equivalentes com sua contraparte natural. “Natural” significa um produto que é isolado ou provém de uma fonte natural (por exemplo, planta ou mineral). “Sintético” significa um produto quimicamente produzido.

Especificações: padrões de identidade e qualidade que incluem testes, referências a procedimentos analíticos e limites de tolerância apropriados, que são limites numéricos, intervalos ou outros critérios para os testes descritos. As especificações estabelecem os critérios com os quais um produto acabado (alimento ou ingrediente) deve estar em conformidade para ser considerado aceitável para o uso pretendido.

Estrutura molecular primária: a estrutura química de uma substância isolada de um material natural, obtida em sua forma original e inalterada.

Extrato: mistura complexa de múltiplos componentes obtida após a utilização de um solvente para selecionar ou remover componentes do ingrediente botânico. Extratos podem estar em forma seca, líquida ou semissólida. O suco obtido por prensagem ou trituração, os produtos químicos puros isolados de uma erva ou os constituintes de plantas modificadas sinteticamente não são considerados extratos.

Extrato nativo: material que consiste apenas em componentes presentes na planta original ou formados durante o processo de extração, excluindo quaisquer veículos ou outras substâncias adicionadas. Este termo pode se referir a extratos líquidos ou semissólidos a partir dos quais o solvente adicionado foi removido, ou pode se referir a um extrato seco ou a porção de um extrato acabado que é constituído apenas de componentes da planta. Em suma, os extratos nativos consistem unicamente em matéria vegetal extraível, enquanto os extratos ou contêm outras substâncias como os veículos, os aditivos alimentares ou solventes de extração residuais. Ao determinar se dois extratos similares são de fato equivalentes, os extratos nativos devem ser usados para a comparação.

Fungo: um membro do reino biológico Fungos, consistindo principalmente de eucariontes multicelulares complexos com uma parede celular, geralmente compostos principalmente de quitina. Os fungos são heterotróficos que absorvem nutrientes de seus arredores após a decomposição do material orgânico. Eles se reproduzem por esporos unicelulares produzidos sexualmente e/ou assexuadamente.

Ingrediente botânico: planta ou parte de uma planta (definida pelo seu nome científico botânico de acordo com o sistema de nomenclatura binomial e pela parte da planta), seja ela inteira, fragmentada, cortada ou moída e não processada (fresca ou seca).

Isolado: constituinte purificado de uma estrutura molecular definida, obtida a partir de uma planta ou outro material vegetal, uma alga, uma bactéria, um fungo ou um material animal não humano.

kg pc / dia: abreviação de quilograma de peso corporal por dia. Os limites de tolerância neste documento são frequentemente definidos com base em dados toxicológicos que indicam uma exposição diária aceitável com base no peso corporal.

Lote: um lote é uma quantidade definida de uma matéria-prima ou produto acabado produzido sob a mesma série de condições consistentes.

Matéria-prima: qualquer substância, exceto produto em processo ou material de embalagem, destinado a ser usado na fabricação de produtos, mas que não aparecem no produto acabado (a não ser em traços ou na forma inativada no caso das enzimas), como solventes e coadjuvantes de tecnologia.

Material animal não humano: uma parte do corpo ou secreção obtida de um animal que não seja humano que é usado para preparar um alimento ou ingrediente.

Mineral: os minerais naturais são naturalmente substâncias inorgânicas sólidas com uma composição química e propriedades físicas definidas e previsíveis. Derivados sintéticos podem ser aceitáveis como fontes mais estáveis, biodisponíveis ou seguras para o mineral.

Nome químico: o nome inequívoco de uma substância química citada na União Internacional de Nomenclatura em Química Pura e Aplicada ou outra literatura científica.

Nome comum: para qualquer alimento ou ingrediente, o nome pelo qual é comumente conhecido e é designado em uma referência científica ou técnica.

Orgânico: um padrão internacionalmente reconhecido que denota um material certificado como tendo sido produzido de acordo com as disposições de produção, processamento, embalagem, armazenamento e distribuição dos padrões de produtos orgânicos.

Padronização: a aplicação do conhecimento sobre o produto, Boas Práticas Agrícolas e Boas Práticas de Fabricação para minimizar as variações inerentes na composição de substâncias, a fim de garantir um produto consistente de um lote para o outro.

Peticionante: pessoa jurídica que possui a intenção de fabricar, importar, distribuir ou comercializar alimentos ou ingredientes sujeitos à anuência prévia da Anvisa em petições de avaliação de segurança e / ou eficácia.

Planta: um membro do reino biológico Plantae, consistindo de eucariontes multicelulares complexos com uma parede celular composta principalmente de celulose. As plantas geralmente produzem seus próprios alimentos pela fotossíntese

usando clorofilas “a” e “b” (secundariamente perdidas em parasitas); são na maior parte terrestres e têm estruturas reprodutivas multicelulares produzindo embriões dependentes.

Preparação à base de plantas: qualquer preparação de um ingrediente botânico, que envolva qualquer processamento adicional da erva em seu estado bruto, para além da secagem, fragmentação, corte ou trituração.

Proporção de extrato nativo: razão entre a massa do ingrediente botânico e a massa da preparação de ervas nativa resultante (= extrato nativo).

Probiótico: uma monocultura ou cultura mista de microrganismos vivos, que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde em humanos.

Produto acabado: produto que passou por todas as etapas de produção, incluindo embalagem em seu recipiente final e rotulagem.

Sobredosagem: quantidade extra planejada adicionada ao lote durante a fabricação para garantir a quantidade correta do ingrediente no produto acabado até o final da vida útil do produto.

Termos de validação de identidade:

- *Sensibilidade:* a capacidade de um método para detectar um composto botânico na presença de veículos ou adulterantes.
- *Seletividade:* “A seletividade de um método refere-se à extensão em que ele pode determinar analito (s) específico (s) em uma mistura complexa sem interferência de outros componentes na mistura” ou capacidade de produzir um resultado negativo para contaminantes / adulterantes conhecidos (IUPAC 2001).
- *Especificidade:* A especificidade é algumas vezes usada no lugar da seletividade, entretanto este termo deve ser usado apenas para métodos que são verdadeiramente específicos.
- *Taxa de seletividade:* a probabilidade de que um método classificará um verdadeiro resultado negativo como tal.
- *Taxa negativa positiva:* a probabilidade de um método produzir um resultado positivo para um composto botânico quando o material é um contaminante ou adulterante conhecido.
- *Taxa Falsa Negativa:* a probabilidade de um método produzir um resultado negativo para um material conhecido por conter o composto botânico.

Unidade (s): uma parte ou grupo funcional de uma molécula.

Vitaminas: grupo de substâncias orgânicas que ocorrem naturalmente, requeridas em pequenas quantidades pelo corpo para manter a saúde; quantidades insuficientes podem causar doenças por deficiência

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410.

ANVISA, [Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes](#), fornece orientações gerais aos fabricantes de alimentos e de ingredientes alimentares que requeiram comprovação da segurança de uso.

ANVISA, [Guia de Procedimentos para Pedidos de Inclusão e Extensão de Uso de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação na Legislação Brasileira](#): fornece instruções claras e objetivas sobre como submeter à Anvisa pedidos de inclusão ou extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia na legislação brasileira, bem como informar os documentos exigidos. Padroniza o processo de avaliação de pedidos de inclusão ou extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira.

ANVISA, [Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos](#): traz orientações sobre a forma de instrução de petição para avaliação de probiótico para uso em alimentos, abordando os aspectos relacionados à identidade, segurança e eficácia.

ANVISA, Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999, Estabelece as DIRETRIZES BÁSICAS PARA AVALIAÇÃO DE RISCO E SEGURANÇA DOS ALIMENTOS.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, dispõe sobre o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001, Aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos, constante do Anexo desta Resolução.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, estabelece o Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 37, de 6 de julho de 2009, trata da admissibilidade das farmacopeias estrangeiras.

ANVISA, Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011, dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 14, de 28 de março de 2014, dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 123, de 4 novembro de 2016, dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos.

ANVISA, Instrução Normativa – IN nº 15, de 13 de abril de 2017. Dispõe sobre os procedimentos para avaliação de aditivos aromatizantes provenientes de espécies botânicas regionais, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, que aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 239, de 26 de julho de 2018, Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 243, de 26 de julho de 2018, define as referências para especificações de ingredientes fontes de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas para constituintes utilizados na composição de suplementos alimentares.

BRASIL, Decreto-Lei n. 986, de 21 de outubro de 1969, Institui normas básicas sobre alimentos.

Comunidade Europeia; [Collection of information on enzymes](#), Office for Official Publications of the European Communities, 2002, Luxemburgo.

European Food Safety Authority -EFSA, [Guidance on safety evaluation of sources of nutrients and bioavailability of nutrient from the sources](#), EFSA Journal 2018;16(6):5294.

FAO/WHO. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing. Compendium of food additive specifications, sixty-seventh meeting. FAO JECFA Monographs 3, 2006 (ISBN 92-5-105559-9). <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0675e/a0675e00.pdf>.

Gaedcke F., Steinhoff B e Blasius, H. Medicinal Herbal Medicinal Products: Scientific e Regulatory Base for Development, Quality Assurance and Marketing Authorization, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart 2003.

GERLT, J.A. & BABBITT, P. (2000): Can sequence determine function?, Genome Biology 1(5): reviews0005.1 - 0005.10.

HEALTH CANADÁ, [Quality of Natural Health Products Guide](#), Natural and Non-Prescription Health Products Directorate; 2015; Canadá.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA); [Guidance document for WHO monographers and reviewers evaluating food additives](#), 2016, Geneva.

KRAUT, J. (1977): Serine proteases: structures and mechanism of catalysis, Annu Rev Biochem 46: 331-358.

OLLIS, D.L. et al. (1992): The alpha/beta hydrolase fold, Protein Eng. 5(3): 197-211.

Organização Mundial de Saúde – OMS, [Diretrizes de Boas Práticas Agrícolas e de Coleta da Organização Mundial de Saúde](#), 2003, Geneva.

NEEDELMAN, S.B. & WUNSCH, C.D. (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48: 443-453.

PEARSON, W.R. & LIPMAN, D.J. (1988): Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Nat. Acad. Sci. 85: 2444-2448

RAWLING, N.D. et al (1993): Evolutionary families of peptidases, Biochem. J. 290: 205-218.

Secretaria de Vigilância Sanitária – SVS/MS, Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.

SMITH, T.F. & WATERMAN, M.S. (1981): Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147, 195-197.

Therapeutic Goods Administration, [Guidance on equivalence of herbal extracts in Complementary Medicines](#), 2011, Austrália.

United States Pharmacopeia – USP, [Guideline for the Admission of Dietary Supplement Ingredients to the USP–NF Monograph Development Process](#), 2017, EUA.