

Documentos de Instrução

Área: Alimento

Assunto:

4116 - Avaliação de inclusão de enzimas para uso como coadjuvantes de tecnologia

4117 - Avaliação de extensão de uso de enzimas para uso como coadjuvantes de tecnologia

Orientação para elaboração de Relatório Técnico-científico

3 - Em atendimento ao Anexo da Resolução Anvisa nº 54/2014, o Relatório técnico-científico (RTC) apresentado pela peticionante deve ser elaborado e redigido na língua portuguesa, contendo os seguintes itens:

3.1 Dados administrativos

3.1.1 Razão social e endereço completo da empresa fabricante ou importadora;

3.1.2 Alvará ou licença sanitária válida;

3.1.3 Identificação do responsável técnico e/ou responsável legal;

3.1.4 Detalhamento do assunto da petição (inclusão/exclusão de enzima, alteração de método ou fonte, etc.).

3.2 Identificação da enzima e da preparação enzimática

3.2.1 Nome comum da enzima e/ou da preparação enzimática;

3.2.2 Marca comercial da enzima e/ou da preparação enzimática;

3.2.3 Classificação da enzima no International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB (número e nome);

3.2.4 Número da enzima no Chemical Abstract Service –CAS;

3.2.5 Outros nomes da enzima (quando aplicável);

3.2.6 Forma de apresentação da preparação enzimática;

3.2.7 Formulação da preparação enzimática, incluindo os aditivos alimentares e veículos (g/100g ou 100ml).

Orienta-se que a composição seja expressa em g/100g ou g/100 mL (%). Os veículos, antioxidantes, antieméticos, conservadores, estabilizantes, reguladores de acidez, sequestrantes, entre outros aditivos permitidos para uso em preparações enzimáticas estão listados nos anexos II e III da RDC n. 53/2014 e na RDC n. 45/2010.

3.3 Composição química e propriedades da enzima e da preparação enzimática

3.3.1 Massa molecular e sequência de aminoácidos da enzima;

Encaminhar a sequência de aminoácidos no formato FASTA e, também, em mídia eletrônica. A sequência será usada para conferir aspectos de segurança da enzima, tais como a toxicidade e alergenicidade.

3.3.2 Especificações de pureza e identidade da preparação enzimática para:

a. Chumbo;

b. Salmonella;

c. Coliformes totais;

d. *Escherichia coli*;

e. Atividade antimicrobiana;

A atividade antimicrobiana deve ser ausente (JECFA, 1992). 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 (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens*). 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>.

f. Eventuais resíduos de solventes de extração;

g. Níveis de garantia da enzima, incluindo informações sobre variação lote a lote;

Recomenda-se apresentar laudos analíticos de pelo menos 3 lotes independentes da enzima/preparação enzimática para os parâmetros mais relevantes, tais como atividade enzimática, % TOS, metais pesados, micotoxinas e resíduos de solventes, se aplicáveis. O objetivo é garantir que haja consistência no processo produtivo da enzima/preparação enzimática.

h. Percentual de sólidos orgânicos totais por unidade de peso (% T.O.S.);

Considera-se que $\%TOS = 100 - (\text{cinzas} + \text{água} + \text{diluyente} + \text{outros ingredientes da formulação})$. Orienta-se 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>.

i. Unidades de atividade enzimática por unidade de peso; e

j. Outros parâmetros relevantes.

Nos casos em que a enzima é obtida por meio da fermentação de fungos, encaminhar três laudos de análise para a pesquisa de micotoxinas de importância à saúde.

3.3.3 Laudos de análise laboratoriais, com identificação da metodologia analítica, que comprovem o atendimento às especificações do item 3.3.2;

3.4) Atividade enzimática, substratos e produtos de reação, cofatores necessários para a atividade principal da enzima, pH e temperatura ótimos, fatores inibidores e ativadores;

3.5) Caracterização de possíveis efeitos adversos relacionados à atividade enzimática e eventuais formações de metabólitos tóxicos, quando apropriado;

3.6) Dados sobre alergenicidade;

Para avaliação do potencial alergênico da enzima/preparação enzimática, recomenda-se que os seguintes aspectos sejam levados em consideração: fonte da enzima alimentar, semelhanças estruturais entre a enzima em análise e os alérgenos conhecidos (testes de homologia da sequência de aminoácidos), teste de screening plasmático específico para avaliar a reatividade de IgE no plasma de pacientes com alergia conhecida, teste de resistência à pepsina e testes de alergenicidade em modelos animais, a depender do caso. A Comissão do Codex Alimentarius (2003) desenvolveu diretrizes para avaliação do potencial de alergenicidade de proteínas. Para a avaliação de semelhanças estruturais entre a enzima e alérgenos conhecidos deve-se realizar pesquisa bioinformática usando a sequência de aminoácidos da enzima em bases de dados de alérgenos,, a identidade de pelo menos 35% em uma janela deslizante de 80 aminoácidos pode indicar a possibilidade de reação cruzada. Recomenda-se o uso das seguintes bases de dados: www.allergenonline.org e www.allergen.org, e a consulta ao seguinte documento: European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their food and feed products. 2011.

3.7) Dados de estabilidade durante o armazenamento antes do uso.

4) Finalidade de Uso

4.1 Finalidade tecnológica e mecanismo de ação da enzima no alimento;

4.2 Uso proposto (alimentos em que a preparação enzimática será utilizada e limites de uso).

Deve-se descrever a reação catalisada pela enzima e seu modo de ação no alimento que justifique tecnologicamente o seu uso no processamento de alimentos como coadjuvante de tecnologia. Informar em que categoria(s) de alimento(s) será adicionada, em qual(is) quantidade(s) e em qual(is) etapa(s) do processo produtivo do(s) alimento(s). Destacar a forma de eliminação ou inativação da enzima, de forma a comprovar que a substância é de fato coadjuvante de tecnologia, ou seja, demonstrar técnica e cientificamente que a enzima e seus derivados são eliminados ou inativados, podendo restar em quantidades não significativas (traços) no produto final (Portaria n. 540/1997).

Deve-se indicar claramente todas as categorias em que se pretende utilizar a preparação enzimática, bem como os limites de uso devem ser definidos. Os limites devem, preferencialmente, ser expressos em mg/TOS/kg do alimento.

4.3 Fonte e processos de fabricação

4.3.1. Produção a partir de fontes animais

4.3.1.1 Tecido animal utilizado e histórico de consumo seguro;

4.3.1.2 Documentação que comprove que o tecido animal utilizado foi submetido à inspeção pelo órgão competente;

4.3.1.3 Métodos utilizados para assegurar a ausência de risco de transmissão de doenças a partir do tecido utilizado para obtenção da enzima, considerando a classificação dos tecidos e seus agentes infecciosos potenciais;

4.3.1.4 Descrição detalhada do processo de produção e dos controles de qualidade utilizados.

4.3.2. Produção a partir de fontes vegetais e basidiomicetos

4.3.2.1 Parte da planta ou do fungo utilizada para produção e histórico de consumo seguro;

4.3.2.2 Documentação que comprove a ausência de substâncias que podem causar efeitos adversos em humanos;

4.3.2.3 Descrição detalhada do processo de produção e dos controles de qualidade utilizados.

4.3.3) Produção a partir de microrganismos (no caso de microrganismos geneticamente modificados os dados devem ser fornecidos para o microrganismo doador e o de expressão)

4.3.3.1 Identificação taxonômica;

4.3.3.2 Identificação da cepa e local de depósito. Caso não possua, justificar;

4.3.3.3 Identificação do grupo ou classe de risco, com as respectivas referências (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

4.3.3.4 Histórico de uso seguro; (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

4.3.3.5 Dados e estudos de estabilidade da cepa geneticamente modificada (cepa de produção); (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

4.3.3.6 Descrição detalhada do processo de produção e dos controles de qualidade utilizados;

4.3.3.7 Patogenicidade e toxigenicidade; (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

Caso a fonte seja um OGM, os dados devem ser fornecidos sobre o doador e o receptor. Caso a o microrganismo produtor não seja OGM, somente para este. Devem ser fornecidas informações sobre a capacidade do microrganismo causar doença em um hospedeiro, seus fatores de virulência, seu potencial para produzir toxinas e metabólitos tóxicos, respaldadas em referências científicas.

4.3.3.8 Dados de resistência microbiana; (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

Caso a fonte seja um OGM, os dados devem ser fornecidos sobre o doador e o receptor. Caso a o microrganismo produtor não seja OGM, somente para este. A fim de permitir a avaliação do potencial de transferência de genes de resistência microbiana para outros organismos, em caso de resistência a algum antibiótico, deve-se determinar sua natureza, se intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais do microrganismo, transmitida verticalmente à prole. A resistência ainda pode ser não natural ou adquirida e ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão., mediante a aquisição de elementos genéticos móveis, tais como transposons, integrons, plasmídeos e fagos), Caso a resistência seja adquirida é altamente indicado encaminhar teste que comprove que a enzima/preparação enzimática final não possui o microrganismo produtor, nem o gene de resistência, mesmo não sendo OGM.

4.3.3.9 Para microrganismos geneticamente modificados:

- a. Dados de resistência microbiana e identificação dos antibióticos para os quais eventuais marcadores de resistência tenham sido utilizados; (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)
- b. Descrição da modificação genética, incluindo caracterização do DNA introduzido e o método de integração do DNA recombinante ao cromossomo; (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

Os principais parâmetros a serem avaliados são os seguintes: fonte e tipo de vetor (plasmídeo, transposon, bacteriófago, vírus), mapa físico e genético detalhando a posição de todos os componentes do vetor, tabela que identifique cada componente do vetor, com suas respectivas sequências, posição, origem e função, métodos usados para introduzir, excluir, substituir ou modificar o DNA no receptor, tamanho, número e função do material genético inserido/excluído ou alterado, identificação das sequências marcadoras do material genético construído (genes marcadores e promotores).

- c. Dados sobre eventuais toxinas e outros metabólitos não seguros sintetizados em decorrência da modificação; (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)
- d. Documentação que comprove que a enzima foi purificada de forma a não conter o microrganismo nem traços de seu material genético recombinante. (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

A remoção do OGM e de DNA recombinante é necessária, uma vez que, caso a enzima/preparação enzimática contenha OGM ou DNA recombinante, ela deverá atender às exigências estabelecidas pela Lei de Biossegurança – Lei n. 11.105/2005 e alterações (parágrafo único do art. 12 da RDC n. 54/2014). O procedimento de remoção do OGM e de qualquer traço de DNA recombinante deve ser confiável e eficaz. Para comprovar a ausência do microrganismo, o plaqueamento direto não é suficiente, uma vez que o microrganismo pode estar apenas injuriado pela presença de alguma substância presente na formulação e não se multiplicar. Desta forma, para garantir a ausência do OGM no ingrediente é necessário encaminhar teste reconhecido de contagem de células viáveis. O procedimento tem de garantir a detecção de células estressadas, incluindo, portanto, uma etapa de ressuscitação. A ressuscitação deve ser feita em meios de cultivo líquidos e ricos ou pelo fornecimento de um tempo de incubação mais longo em comparação com a cultura normal do organismo viável. Recomenda-se a análise de, pelo menos, três lotes independentes da preparação enzimática final.

Para comprovar a ausência de DNA recombinante no ingrediente, o teste deve atender aos seguintes requisitos:

- a presença de DNA deve ser avaliada usando um método baseado em PCR;
- a confiabilidade, eficácia e a sensibilidade do método de detecção de DNA devem ser documentadas;
- controles positivo e negativo devem ser incluídos para garantir o funcionamento da técnica;
- como controle positivo deve ser utilizado o DNA total do OGM, como controle negativo podem ser utilizadas amostras colhidas antes da recombinação;
- todo o DNA presente no produto deve ser extraído, portanto, um passo de lise celular deve ser incluído no protocolo de extração de DNA;
- para verificar a eficácia do passo de lise, as células intactas do OGM devem ser testadas em diferentes diluições como controle positivo;
- DNA de controle (positivo) deve ser adicionado à amostra em diferentes diluições até sua extinção, a fim de verificar o limite de detecção do DNA recombinante na amostra;
- pelo menos um gene deve ser pesquisado, entretanto, todos os genes de preocupação inseridos no OGM, por exemplo, genes de resistência antimicrobiana, genes de virulência, genes que codificam compostos tóxicos, devem ser pesquisados.
- os iniciadores utilizados na PCR devem abranger todo o comprimento da sequência codificada, não sendo superior a ela.
- pelo menos três lotes independentes do ingrediente devem ser analisados.

5. Dados para avaliação de risco

5.1 Estudos de mutagenicidade e genotoxicidade realizados de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais e com os parâmetros estabelecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD -Guidelines for the Testing of Chemicals); (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

5.2 Estudos de toxicidade subcrônica oral, que permitam a derivação de um NOEL (No Observed Effect Level) ou NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), realizados de acordo as Boas Práticas Laboratoriais e com os parâmetros estabelecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD -Guidelines for the Testing of Chemicals); (item dispensado para os pedidos de extensão de uso)

5.3 Avaliação de exposição alimentar, com justificativa para a escolha do método utilizado;

Orienta-se que o peticionante apresente memorial de cálculo da exposição alimentar à enzima/preparação enzimática, considerando-se os níveis mais altos de uso da enzima/preparação enzimática e os dados de consumo de todos os alimentos/bebidas nos quais se pretende adicionar a enzima/preparação enzimática. Sugere-se também que a avaliação seja realizada em TOS.

Recomenda-se, inicialmente, usar o método conservador Budget para a avaliação de exposição, uma vez que ele leva em consideração a capacidade fisiológica máxima de consumo de alimentos e bebidas (sólidos: 0,05 kg/kg de peso corpóreo/dia; líquidos: 0,1L/kg de peso corpóreo/dia). Sugere-se consultar o seguinte documento: WHO. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Chapter 6: dietary exposure assessment of chemicals in food. 2009.

Posteriormente, se houver necessidade, os dados de consumo de alimentos/bebidas podem ser refinados, considerando os bancos de dados de consumo de alimentos, como a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF). Caso a enzima/preparação enzimática seja empregada em produtos destinados ao público infantil, a avaliação de exposição deve ser específica para este grupo populacional.

5.4 Caracterização do risco (margem de exposição ou percentual da ingestão diária aceitável – IDA).

6. Aprovação em outros países ou organismos internacionais

6.1 Dados de aprovação em outros países e/ou organismos internacionais, quando disponíveis.

A não apresentação de algum item do RTC deve ser justificada por meio de racional técnico-científico que comprove que a ausência da informação ou documento não compromete a conclusão sobre a segurança de uso da preparação enzimática.

Fundamentação Legal

Decreto-Lei n. 986/69, Lei n. 9782/1999, Portaria n. 540/97, RDC n. 54/2014 e RDC n. 53/2014