

## Documentos de Instrução

Área: Alimento

Assunto: 4108 - Avaliação de Segurança e Eficácia de Propriedades Funcional ou de Saúde para Enzimas como ingredientes

### Orientação para elaboração de Relatório Técnico-Científico

3 - Em atendimento ao item 4.1 da Resolução Anvisa nº 16/1999 e aos itens 4.1, 4.2 e 4.3 da Resolução Anvisa nº 17/1999 e do Anexo da Resolução Anvisa nº 54/2014, deve ser apresentado Relatório técnico-científico (RTC) para comprovação da segurança, elaborado e redigido na língua portuguesa, contendo os seguintes itens:

- 3.1) Caracterização do ingrediente
- 3.2) Identificação do Ingrediente, contemplando os seguintes itens estabelecidos no Anexo da RDC 54/2014:
  - 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 aditivos e coadjuvantes de tecnologia utilizados no processo de obtenção dos novos ingredientes devem estar autorizados. Caso sejam utilizados aditivos alimentares ou coadjuvante de tecnologia não previstos na legislação, deve ser protocolada a petição específica para avaliação.

#### 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  $\geq 16$  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 – (cinzas + água + diluente + 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

- 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](http://www.allergenonline.org) e [www.allergen.org](http://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) Fonte e processos de fabricação

#### 3.7.1) Produção a partir de fontes animais

3.7.1.1 Tecido animal utilizado e histórico de consumo seguro;

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

3.7.1.3 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;

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

#### 3.7.2) Produção a partir de fontes vegetais e basidiomicetos

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

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

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

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

3.7.3.1 Identificação taxonômica;

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

3.7.3.3 Identificação do grupo ou classe de risco, com as respectivas referências;

3.7.3.4) Histórico de uso seguro;

3.7.3.5 Dados e estudos de estabilidade da cepa geneticamente modificada (cepa de produção); quando couber

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

3.7.3.7 Patogenicidade e toxigenicidade;

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.

3.7.3.8 Dados de resistência microbiana; quando couber

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.

3.13) Para microrganismos geneticamente modificados:

a. Dados de resistência microbiana e identificação dos antibióticos para os quais eventuais marcadores de resistência tenham sido utilizados;

b. Descrição da modificação genética, incluindo caracterização do DNA introduzido e o método de integração do DNA recombinante ao cromossomo;

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;

d. Documentação que comprove que a enzima foi purificada de forma a não conter o micro-organismo nem traços de seu material genético recombinante.

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.

#### 4. Caracterização do perigo

##### 4.1. Informações Toxicológicas

- a) Estudos de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME)
- b) Estudos de genotoxicidade
- c) Estudos de Toxicidade Subcrônica
- d) Estudos de Toxicidade Crônica ou de carcinogenicidade, a depender dos achados do estudo subcrônico ou dos testes de genotoxicidade, bem como de outras informações específicas que indiquem a necessidade de estudos a longo prazo.
- e) Estudos de toxicidade sobre a reprodução e o desenvolvimento (teratogenicidade) que avaliem os efeitos da exposição do novo alimento/novo ingrediente na reprodução de mamíferos e efeitos adversos na gestante e no desenvolvimento do embrião e do feto. A princípio, esses estudos devem ser apresentados para novos alimentos/novos ingredientes indicados para gestantes e lactentes, bem como quando existirem evidências que indiquem a necessidade de estudos sobre o desenvolvimento.
- f) Estudos em humanos
- g) Outros estudos e informações para a caracterização do perigo
- h) Evidências do histórico de uso seguro do novo alimento ou ingrediente
- i) Metodologia utilizada pela empresa para determinar o valor de segurança

#### 5. Caracterização do risco:

- a) Finalidade e condições de uso
- b) Abordagem para avaliação da exposição
- c) Conclusão sobre a caracterização quantitativa do risco, nos níveis e condições de uso propostos, com base nos resultados e nas informações sobre a caracterização do ingrediente, estudos toxicológicos, estudos em humanos e avaliação da exposição apresentadas nas etapas anteriores.

#### 6. Informações sobre avaliações e aprovações de autoridades regulatórias internacionais.

Para elaboração do Relatório Técnico Científico, a empresa deve observar as orientações constantes no Guia para comprovação de segurança de alimentos e ingredientes (Guia n. 23, disponível no Portal da Anvisa em: Assuntos > Regulamentação > Legislação > Consulta de Guias), no Guia de Especificações de Ingredientes Alimentares (Guia n. 37, disponível no Portal da Anvisa em: Assuntos > Regulamentação > Legislação > Consulta de Guias) e regulamentos específicos: Resoluções Anvisa nº 16 e nº 17/1999.

Quando os novos alimentos/ingredientes forem destinados ao uso em fórmulas infantis para lactentes e crianças de primeira infância, devem ser cumpridos os requisitos adicionais de segurança estabelecidos nas Resoluções RDC nº 42, 43, 44 e 45/2011, conforme o caso.

Quando os novos alimentos/ingredientes forem destinados ao uso em fórmulas para nutrição enteral, devem ser cumpridos os requisitos de segurança estabelecidos nas Resoluções RDC nº 21 e 22/2015.

Quando os novos alimentos forem destinados ao uso em suplementos alimentares, devem ser cumpridos os requisitos adicionais para atualização das listas de constituintes e limites de uso, estabelecidos na RDC nº 243/2018.

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 do novo alimento.

**7 -** Para petições que incluam avaliação de eficácia de alegação de propriedade funcional ou de saúde, o Relatório técnico-científico (RTC) deve ser complementado com os itens abaixo, em atendimento aos itens 4.1, 4.2 e 4.3 da Resolução Anvisa nº 18/1999:

7.1) Alegação de propriedade funcional ou de saúde: Deve ser explicitado o texto da alegação pretendida pela requerente.

O efeito benéfico a ser atribuído ao novo alimento/novo ingrediente deve estar adequadamente refletido no texto da alegação e relacionado aos desfechos avaliados nos estudos científicos anexados ao RTC. Não são permitidas alegações que façam referência à prevenção, terapia ou à cura de doenças, que são finalidades de um medicamento.

Para alegações de propriedade funcional, deverá ser identificado e comprovado um efeito benéfico relativo à manutenção ou melhoria da função específica no corpo que é o alvo da alegação.

Para alegações de propriedade de saúde (redução de risco), tanto o fator de risco quanto a doença deverão ser identificadas. Quando o fator de risco está bem estabelecido, basta demonstrar a redução (ou alteração benéfica) desse fator. Para fatores de risco não estabelecidos, devem ser demonstrados a redução do fator de risco e a redução do risco da doença, ou apenas a redução do risco da doença, desde que seja demonstrada a plausibilidade biológica do fator de risco e seja explicado o papel deste nas vias causais do resultado.

Os estudos observacionais prospectivos são padrão-ouro para avaliação de fatores prognósticos de doença ou fatores de risco de desenvolvimento de determinada condição. Em contrapartida, para a avaliação de medidas clínicas de saúde/doença, os estudos clínicos randomizados são o tipo de estudo mais adequado. Portanto, para as alegações de saúde (redução de risco), os dois tipos de estudo podem ser aportados, a depender da situação (fator de risco de doença bem estabelecido ou não).

Ressalta-se que as doenças têm vários fatores de risco e alterar um desses fatores de risco pode ou não ter um efeito benéfico. Portanto, a apresentação de declarações de redução de risco deve garantir o uso de linguagem apropriada ou referência a outros fatores de risco, para que os consumidores não as interpretem como alegações de prevenção.

Apenas uma alegação de propriedade funcional ou de saúde pode ser solicitada por petição, exceto quando se tratar de variações textuais relacionadas ao mesmo benefício.

7.2) Evidências científicas aplicáveis à comprovação da alegação de propriedade funcional ou de saúde:

7.2.1) Busca estruturada e seleção de estudos

Os desfechos utilizados para embasar a alegação e a busca da evidência nas bases de dados devem ser claramente descritos, bem como intervenção, matriz e público-alvo.

7.2.2) Análise do nível da evidência a partir dos estudos incluídos, considerando a qualidade dos estudos, a consistência e a força da associação em relação ao efeito alegado;

7.2.3) Conclusão baseada na análise da totalidade da evidência para sustentar a alegação pleiteada.

#### **Fundamentação Legal**

Decreto-Lei n. 986/69, Lei n. 9782/1999, RDC n. 25/2011, Resoluções 16 e 17/1999, Portaria n. 540/97, RDC n. 54/2014 e RDC n. 53/2014 Resolução RDC 243/2018, IN 28/2018, Portaria MS/SVS 29/1998, Portaria MS/SVS 36/1998, RDC 42/2011, RDC 43/2011, RDC 44/2011, RDC 45/2011, RDC 21/2015, RDC 22/2015 e regulamentos técnicos específicos para alimentos convencionais, conforme Biblioteca de Temas de Alimentos disponível no Portal da Anvisa.