



# Enzimas na fabricação de alimentos

7 de julho de 2015



# Enzimas na fabricação de alimentos

**Associação Brasileira da Indústria e Comércio de Ingredientes e Aditivos para Alimentos**

Hélvio Colino

Presidente ABIAM

CEO Labotnathus Biotecnologia Internacional Ltda.

8 de julho de 2015

# Missão

Ser o órgão de máxima representatividade do setor de ingredientes junto à sociedade, promovendo e defendendo os interesses dos seus associados, além de, promover o desenvolvimento tecnológico do setor.





# ABIAM & IECG

Ana Claudia Peluso  
Diretora Técnica e Representante da ABIAM na IECG  
Gerente de Assuntos Regulatórios LA  
Novozymes Latin America Ltda

# IECG (International Enzyme Coordination Group)

## Mandato IECG

O objetivo do IECG é identificar e buscar o consenso em relevantes questões regulatórias, legislativas, de segurança e técnicas que são globais ou que se espera que tenha um efeito em todas as regiões, com a finalidade de:

- Apoiar cada associação de enzima regional com posições unificadas a fim de maximizar a interação com as autoridades governamentais regionais e para manter uma administração equilibrada.
- Promover a coerência entre as atividades e posições face a organismos normalizadores internacionais, como o Códex e JECFA.
- Estimular a harmonização global.
- Procurar a participação de outras associações geograficamente distintas.



# ABIAM & IECG

Atualmente os membros da IECG são:

- European Association of Enzyme Manufacturers (Amfep),
- US Enzymes Technical Association (ETA),
- Japan Enzymes Association (JEA)
- Brazilian Association of Industry and Trade of Food Ingredients and Additives (ABIAM)





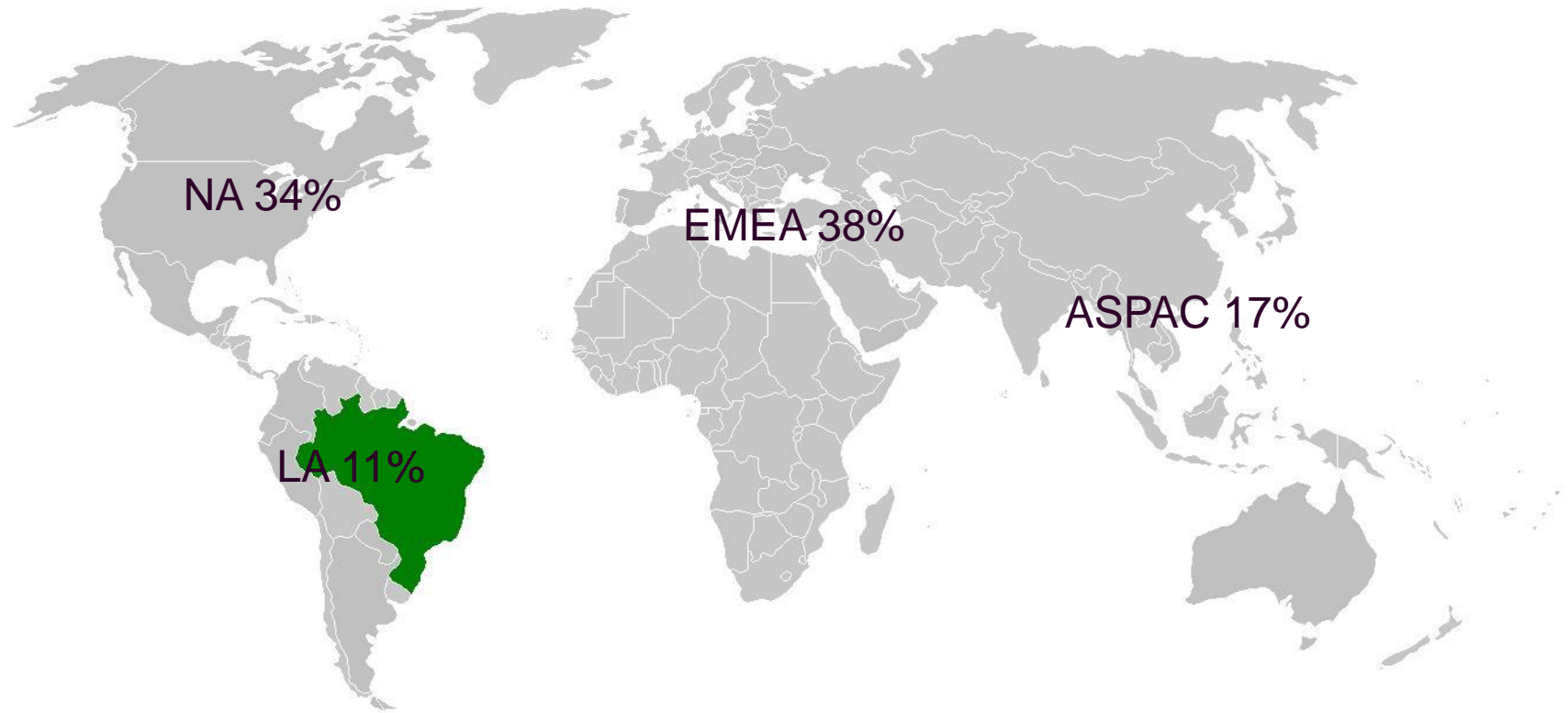
# Mercado Global de Enzimas Industriais

Daniel Stahlke  
Sales Director  
AB Enzymes GmbH

# Mercado Global

Global 4 bilhões de dólares

Estimativa Brasil: ~240 milhões de dólares (~6% do mercado global)





# Principais Mercados / Aplicações



## DETERGENTES

- Detergentes em pó e líquidos
- Detergentes hospitalares
- Sabão em barra
- Tira-manchas



## ALIMENTOS & BEBIDAS

- Panificação
- Cervejaria
- Sucos e Vinhos
- Lácteos
- Amidos
- Proteínas



## NUTRIÇÃO ANIMAL

- Suínos e Aves
- Fitases, Xilanases, Celulases
- Ganho de peso e conversão alimentar



## INDÚSTRIAS TÉCNICAS

- Têxteis
- Papel e Celulose



## BIOCOMBUSTÍVEIS

- Etanol de milho (EUA)
- Usinas Flex (Brasil)
- Etanol Celulósico



## INDÚSTRIA FARMACEUTICA



# Usos e aplicações de enzimas na área de alimentos

Fabricio Leal Rocha  
Regional Marketing Manager  
Novozymes Latin America Ltda

Martin Christoph Knossalla e Mariana Alegre  
Application Manager                      Gerente de Assuntos Regulatórios  
DSM

Andrea Valezin  
Ajinomoto do Brasil  
Engenheira Sênior Líder de Pesquisa e Desenvolvimento

# Agenda

1. Tendências que impactarão a produção de alimentos
2. Como as enzimas estão presentes no nosso dia a dia
3. Aplicações de enzimas na produção de alimentos
4. O futuro
5. Dúvidas



# Agenda

1. Tendências que impactarão a produção de alimentos
2. Como as enzimas estão presentes no nosso dia a dia
3. Aplicações de enzimas na produção de alimentos
4. O futuro
5. Dúvidas



# Tendências

1

## Envelhecimento da população

Taxas de natalidade têm diminuído enquanto a expectativa de vida tem aumentando, levando a um aumento geral da idade da população.



2

## Urbanização em massa

Mais da metade da população mundial vive hoje nas cidades e mais de 70% em 2050.



3

## Crescimento da classe média

Em 2022, outro bilhão de pessoas se somará a classe média no mundo e em 2030 se estima que mais de 90% de toda classe média estará nos mercados emergentes.



4

## Consumidor Digital

A nova geração sabe mais, espera mais e quer tudo mais rápido, influenciada pela Internet e tecnologias móveis.



5

## Importância da Sustentabilidade

A conscientização dos consumidores sobre problemas ambientais e práticas de negócios sustentáveis tem influenciado suas decisões de compra





# Tendência

- Como manter o crescimento econômico



Usadas na produção, podem aumentar a eficiência e rendimento de uma ampla gama de processos de nossa sociedade

Com as enzimas podemos "produzir mais com menos" e contribuir para manutenção do crescimento econômico e uso de recursos naturais

# Redução das emissões de CO<sub>2</sub>

Redução na emissão de CO<sub>2</sub> utilizando 1kg de enzimas em diferentes processos produtivos



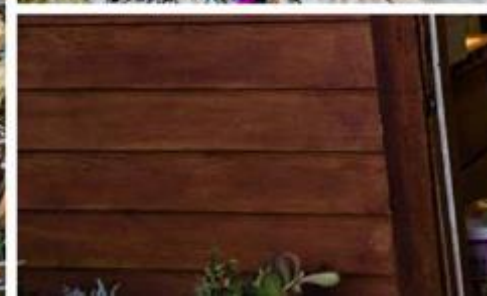
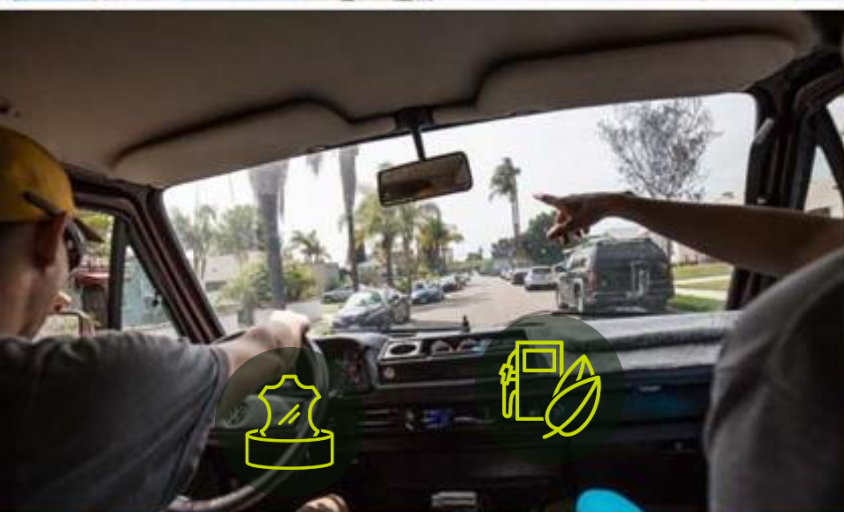
(OXENBØLL; ERNST, 2008)

# Agenda

1. Tendências que impactarão a produção de alimentos
2. Como as enzimas estão presentes no nosso dia a dia
3. Aplicações de enzimas na produção de alimentos
4. O futuro
5. Dúvidas







# Agenda



1. Tendências que impactarão a produção de alimentos
2. Como as enzimas estão presentes no nosso dia a dia
3. Aplicações de enzimas na produção de alimentos
4. O futuro
5. Dúvidas

# Enzimas na panificação



**Maior volume**

**Maior salto de forno**

**Melhor coloração da crosta**

**Maior Suavidade e frescura**

**Crosta mais fina**

**Melhor maquinabilidade Da massa**

**Maior tempo de vida**

# Mantendo o pão fresco mais tempo



## ⬇️ Antigamente...

... O pão embalado ficava seco com poucos dias de produzido.

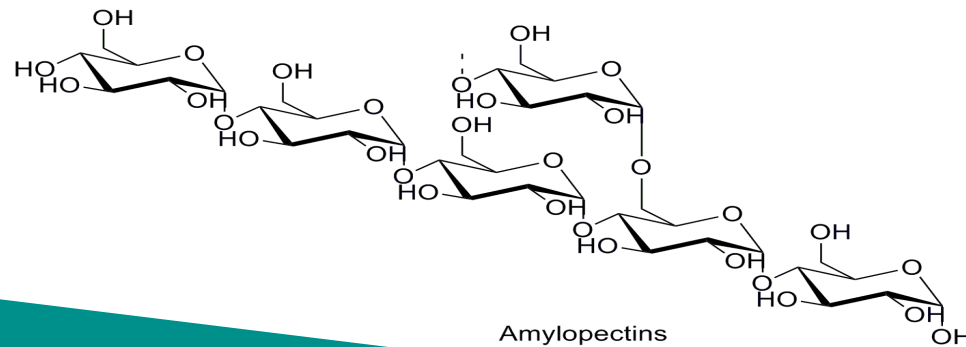
A indústria necessitava de longas e repetidas rotas de distribuição, além de diminuição da preferência do consumidor

## 👍 Com enzimas amilases...

... O pão se mantém fresco por mais dias.

São otimizadas rotas de distribuição, prolonga-se a vida útil do pão e aumenta-se a preferência do consumidor.

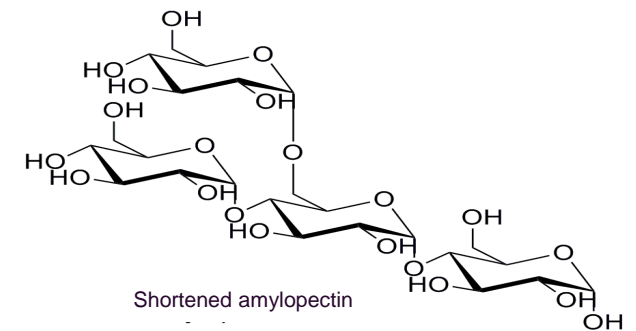
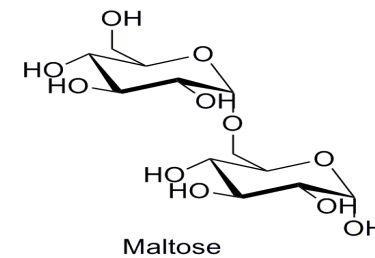
# O mecanismo envolvido na reação de uma amilase maltogênica



A amilase Maltogênica remove uma unidade de maltose por vez do final da molécula de um amido não redutor.

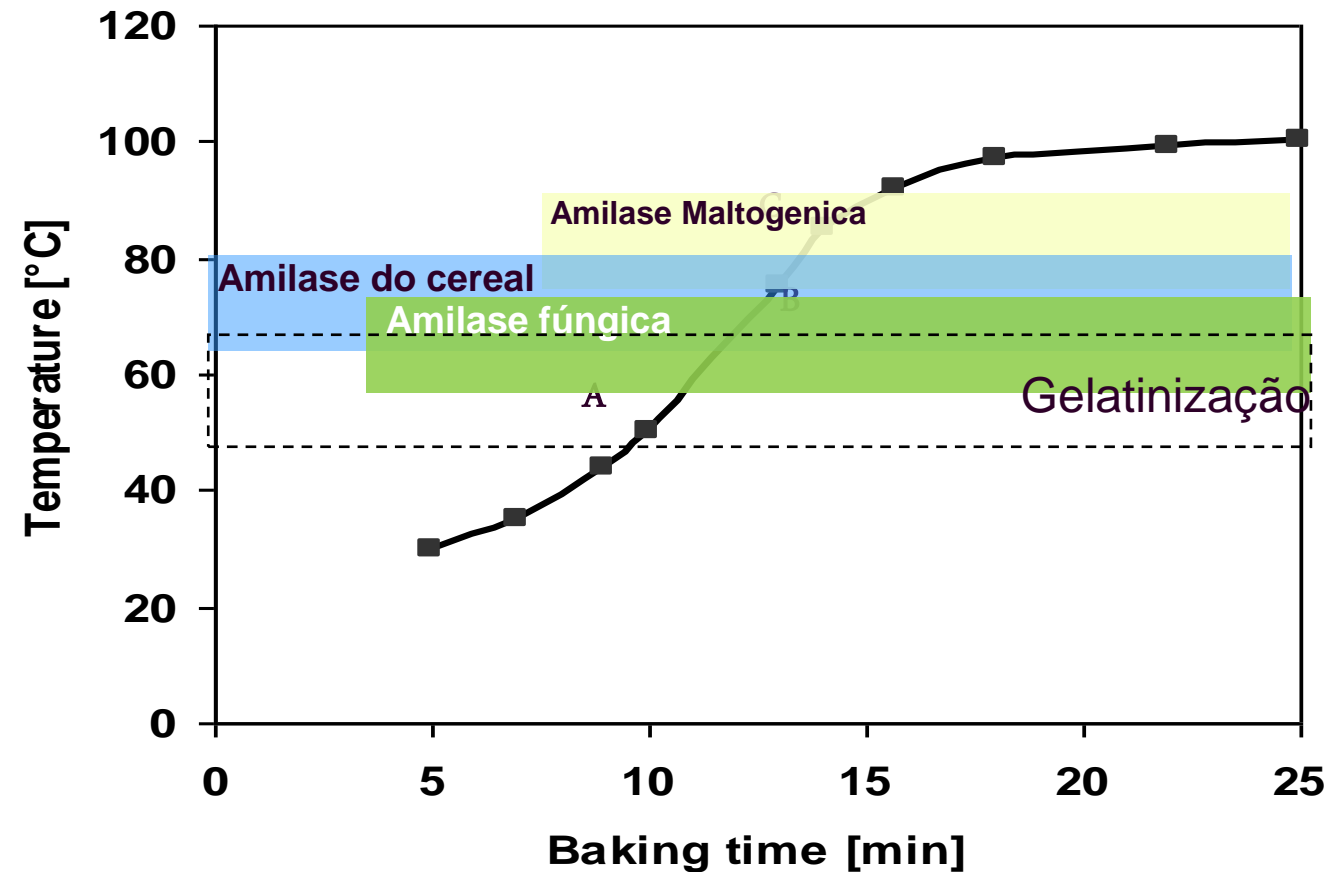
A hidrólise para quando um ponto ramificado da cadeia é atingido, gerando uma amilopectina com maior elasticidade e reduzida tendência a cristalizar.

Maltogenic amylase hydrolysis



# Inativação das amilases na panificação

## Loaf temperature in the center



# Redução nas emissões de CO<sub>2</sub>

- Aproximadamente 6 bilhões de pães são consumidos anualmente nos Estados Unidos. O uso de amilases em todo este volume de pão consumido poderia reduzir potencialmente as emissões de CO<sub>2</sub> em 0,3 milhões de toneladas ao ano. Isso corresponde a emissão anual de 35.000 cidadãos americanos ou 75.000 automóveis.
- Na China cálculos semelhantes estimam o potencial de redução nas emissões de CO<sub>2</sub> em 0,56 milhões de toneladas ou 140.000 automóveis.



(OXENBØLL; LI; AXELSEN, 2010)

# Reduzindo a utilização de aditivos



Antigamente...

... A massa era estabilizada com a utilização de aditivos.



Com enzimas lipases...

... A massa é estabilizada com lipases, que modificam os próprios lipídeos naturais da farinha de trigo

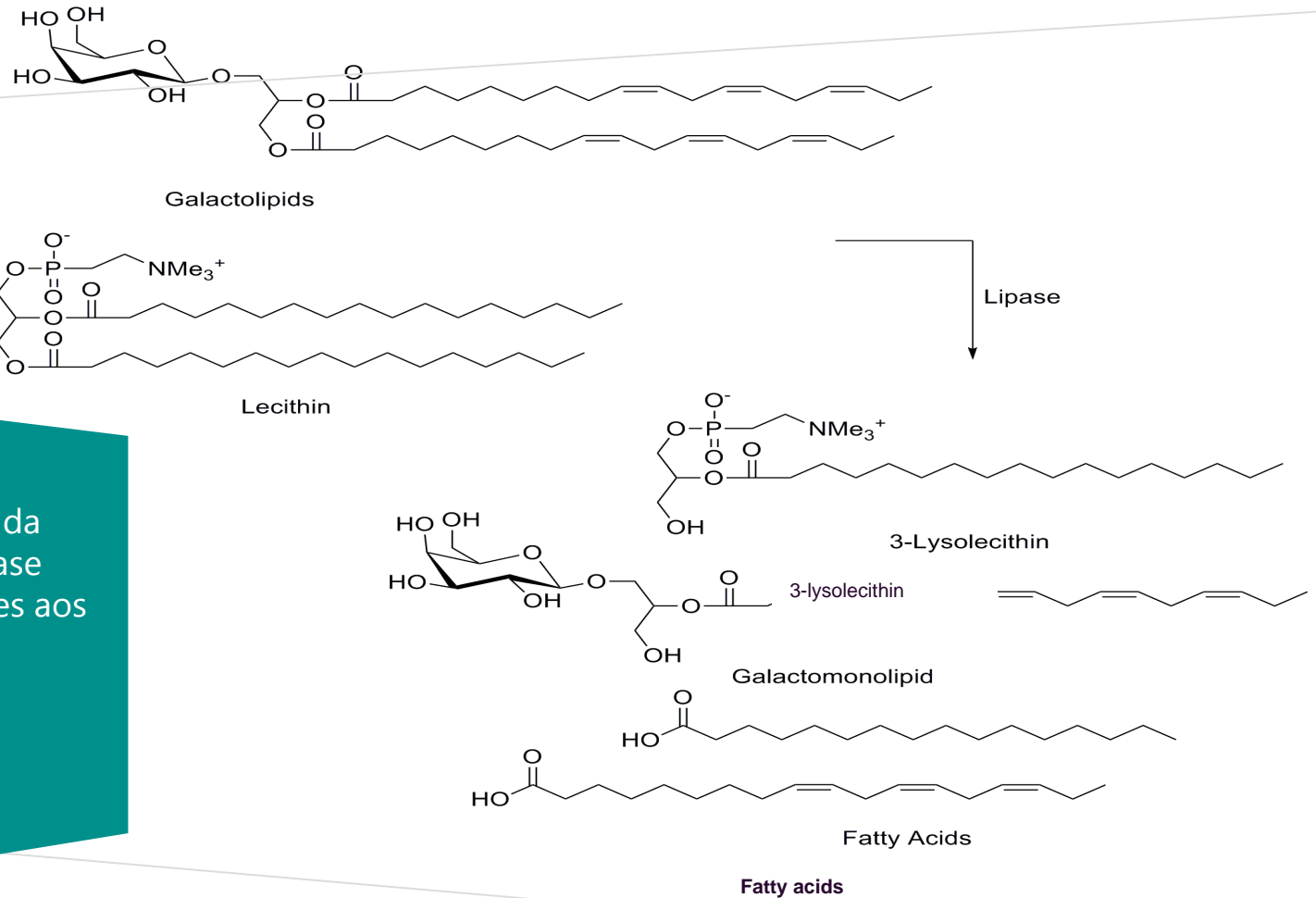
Estes lipídeos modificados, agem como emulsificantes...



# O mecanismo envolvido na reação de uma Lipase



A partir dos lipídeos naturais da própria farinha de trigo, a lipase produz moléculas semelhantes aos emulsificantes tradicionais, substituindo estes últimos



# Aplicação de enzimas na produção de biscoitos

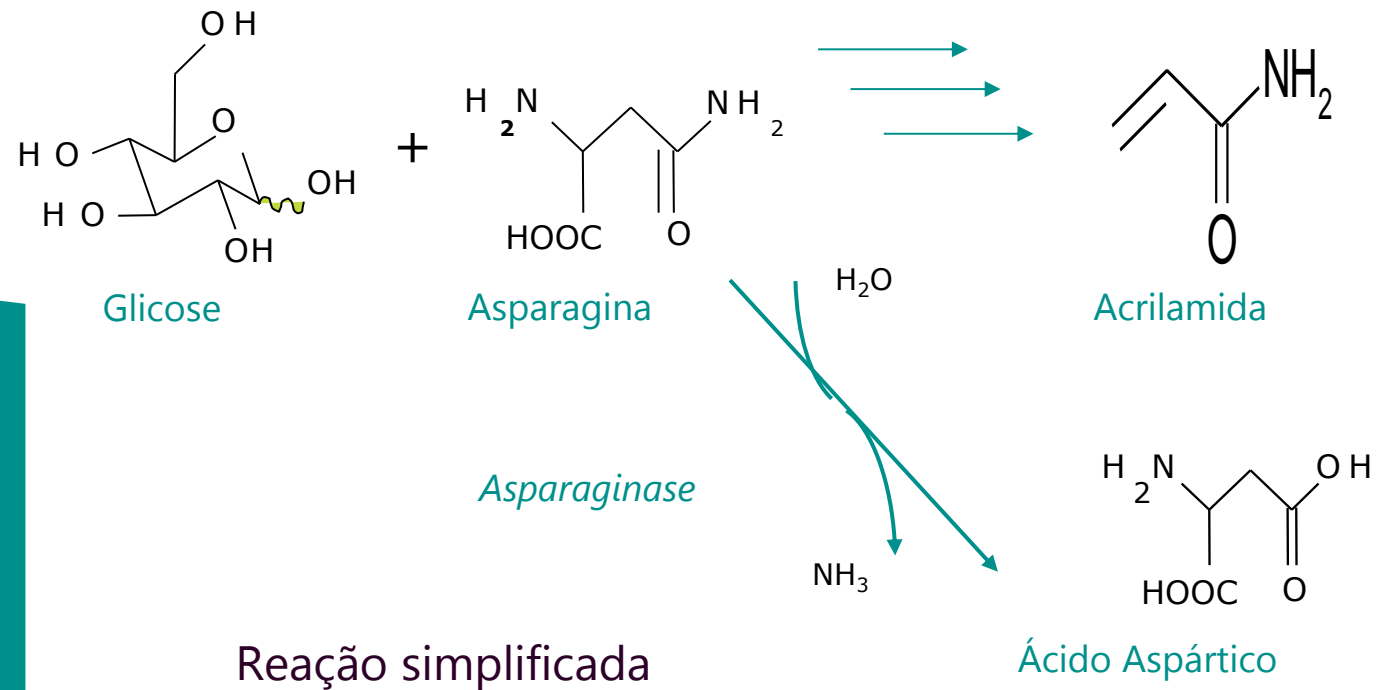


Redução Acrilamida

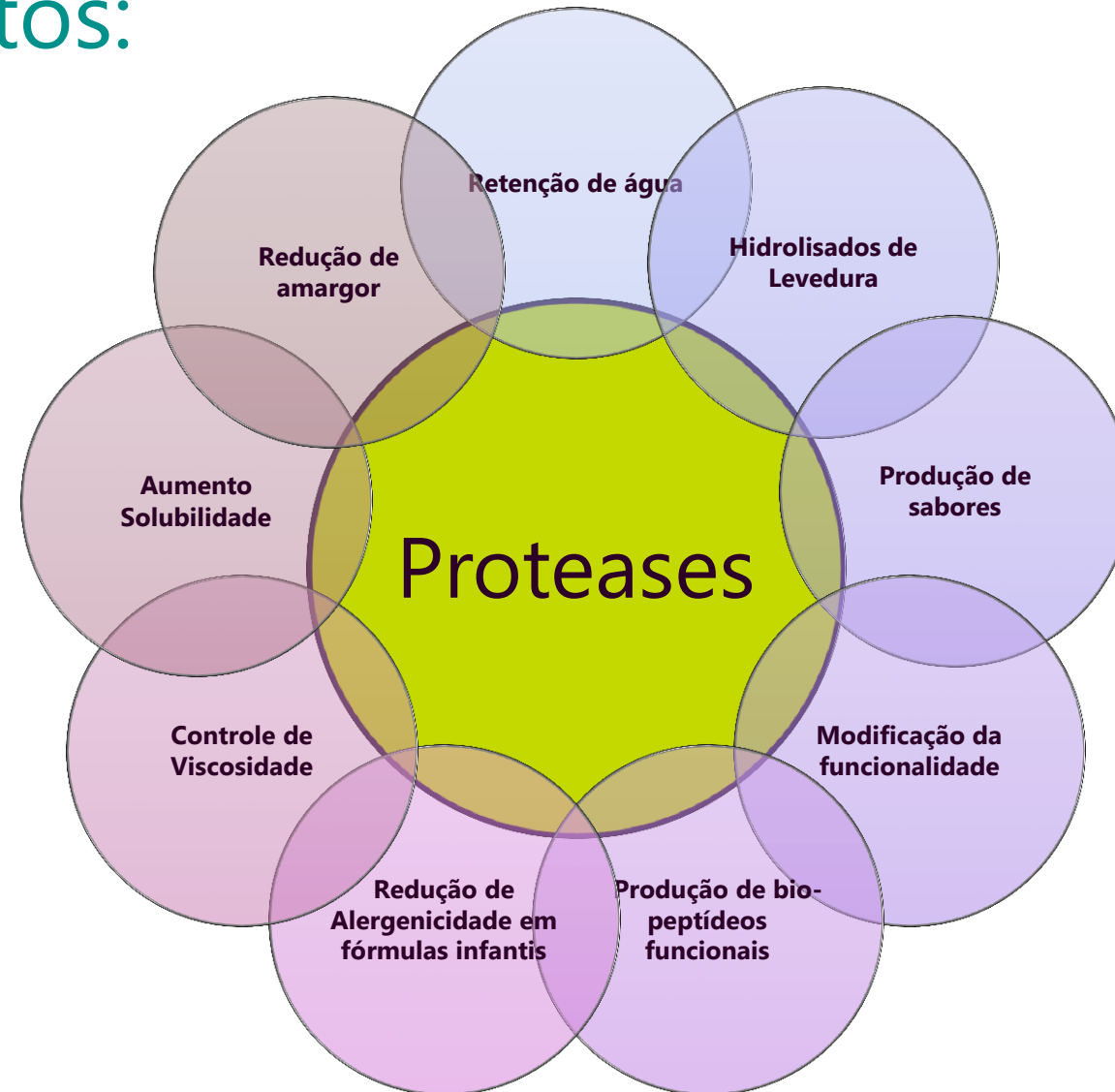
# O mecanismo envolvido na reação de uma Asparaginase



A Asparaginase reduz a formação de Acrilamida pela conversão do precursor asparagina para ácido aspártico. Sem alteração de sabor, cor ou características sensoriais



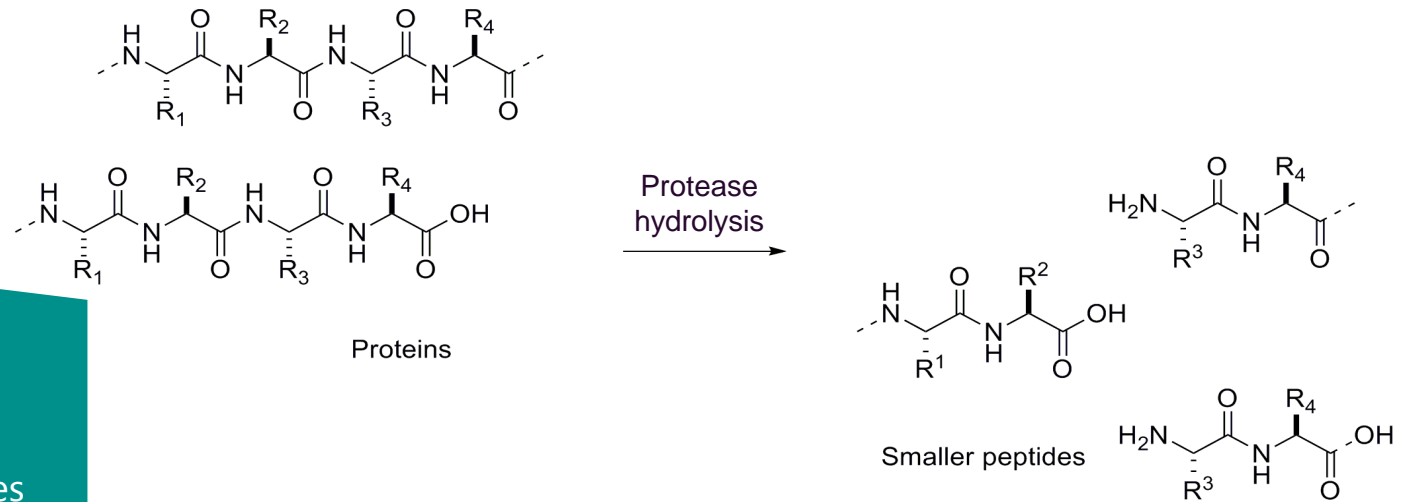
# Aplicação de proteases na indústria de alimentos:



# Mecanismo de ação das proteases



As proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos menores



# Filtração de sucos



## Antigamente...

... Sucos eram filtrados sem enzimas. Baixos rendimentos e processos longos e de alto custo.

## Com enzimas...

... Filtração de sucos é estável e requer menos tempo e recursos.

Maiores rendimentos, velocidade, previsibilidade de resultados e estabilidade de processos.

# Filtração de cervejas



## Antigamente...

... A cerveja era filtrada sem a utilização de enzimas...

O que significava que a cervejaria não aproveitava totalmente o potencial de sua matéria prima, mesmo quando essa era de excelente qualidade...



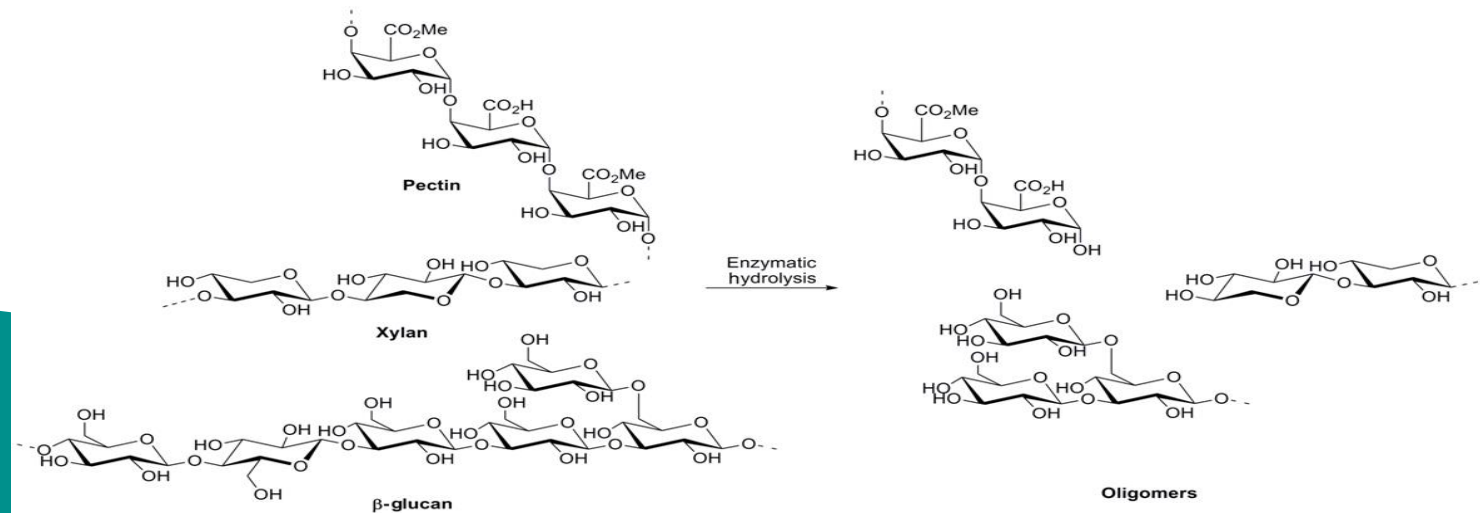
## Com enzimas...

- ... É possível produzir mais cerveja com a mesma quantidade de matérias primas, reduzindo custos;
- O desempenho das filtrações de mosto e cerveja é otimizado resultando em menor consumo de auxiliares de filtração, água e energia
- Aumenta-se a capacidade de produção e a previsibilidade dos processos

# O mecanismo envolvido na filtração com enzimas



Quebrando carboidratos complexos em estruturas menores, são produzidas moléculas mais solúveis que geram menor viscosidade e melhor filtração.





# Produção de óleos e gorduras

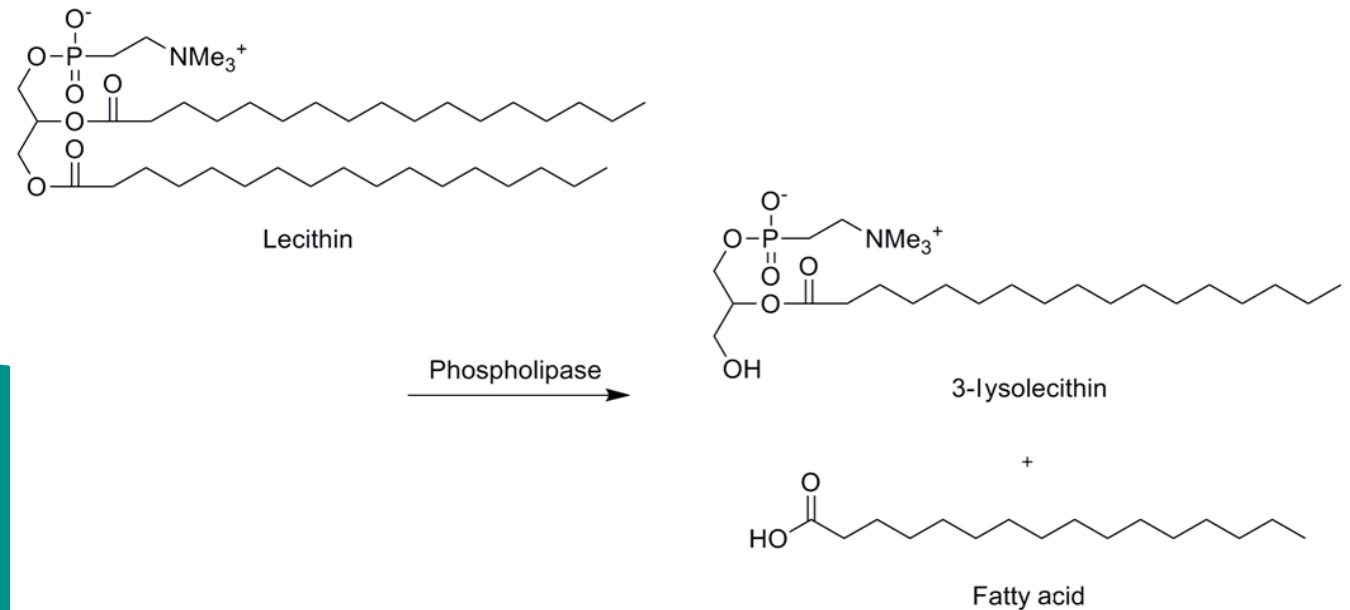


<b>Inter esterificação Enzimática</b>	<b>Degomagem enzimática</b>	<b>Óleos especiais para nutrição</b>
Alternativa a vias químicas de produção de margarinas	Alternativa a vias químicas de processamento	Síntese enzimática de ômega 3 e similares

# O mecanismo de ação na degomagem enzimática



A remoção enzimática de um ácido graxo da lecitina facilita sua extração.



# Melhor liquefação, mais amido...



## Antigamente

... A liquefação era realizada através de alta temperatura/pressão e/ou baixo pH.

O processo requeria alta energia, com baixos rendimentos e formação de subprodutos.



## Com enzimas amilases...

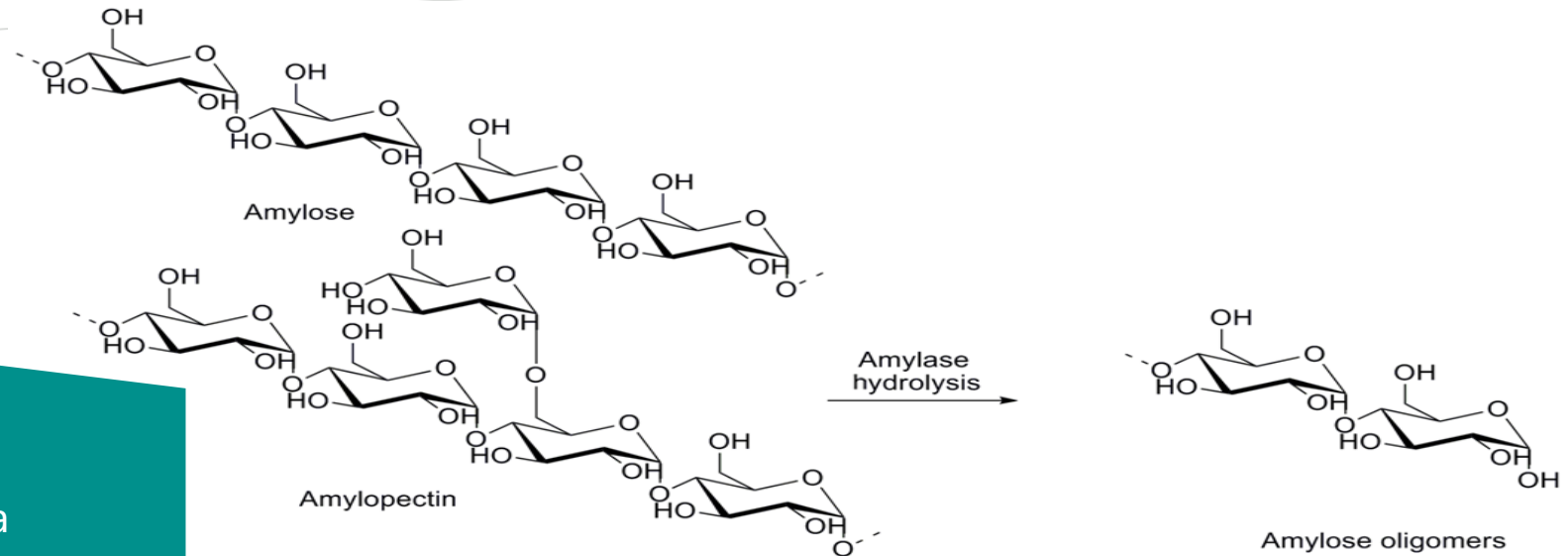
... Os resultados são alto rendimento e produtividade, facilitando o processamento.

Além disso, as enzimas garantem mínima formação de subprodutos além de reduzir os custos de produção e consumo de energia.

# O mecanismo envolvido na liquefação



A alfa amilase hidrolisa amilose e amilopectina em moléculas menores reduzindo a viscosidade.



# Reduz custos, aumenta rendimentos, e melhora qualidade dos xaropes na sacarificação



## Antigamente...

... O processo de sacarificação era de difícil controle.

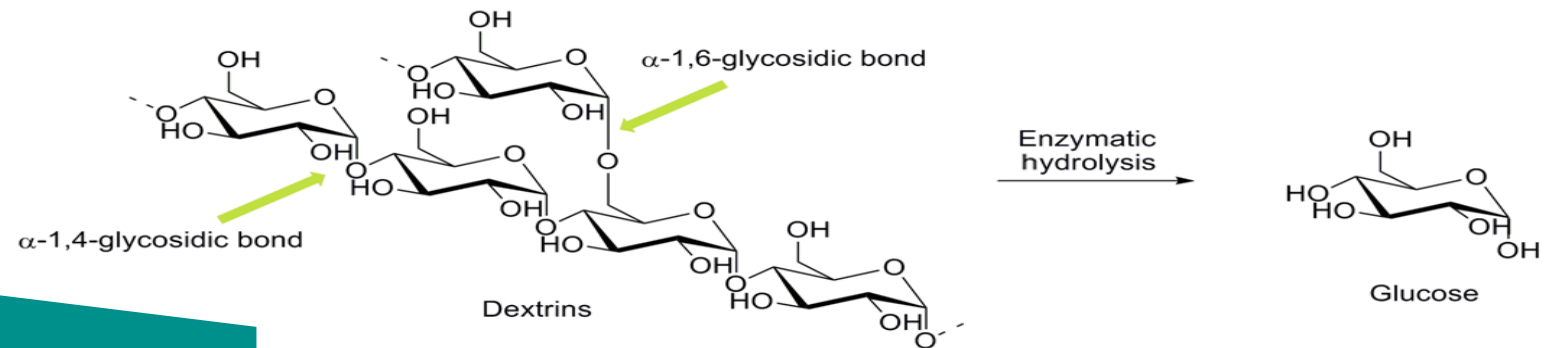
Os custos operacionais eram altos, rendimentos baixos, e a qualidade dos xaropes inconsistentes.

## Com enzimas...

... O processo é controlado, menores custos operacionais, maiores rendimentos, e qualidade do xarope consistente.

Enzimas oferecem flexibilidade operacional as fábricas, permitindo a produção de uma variedade de xaropes sem comprometimento da qualidade.

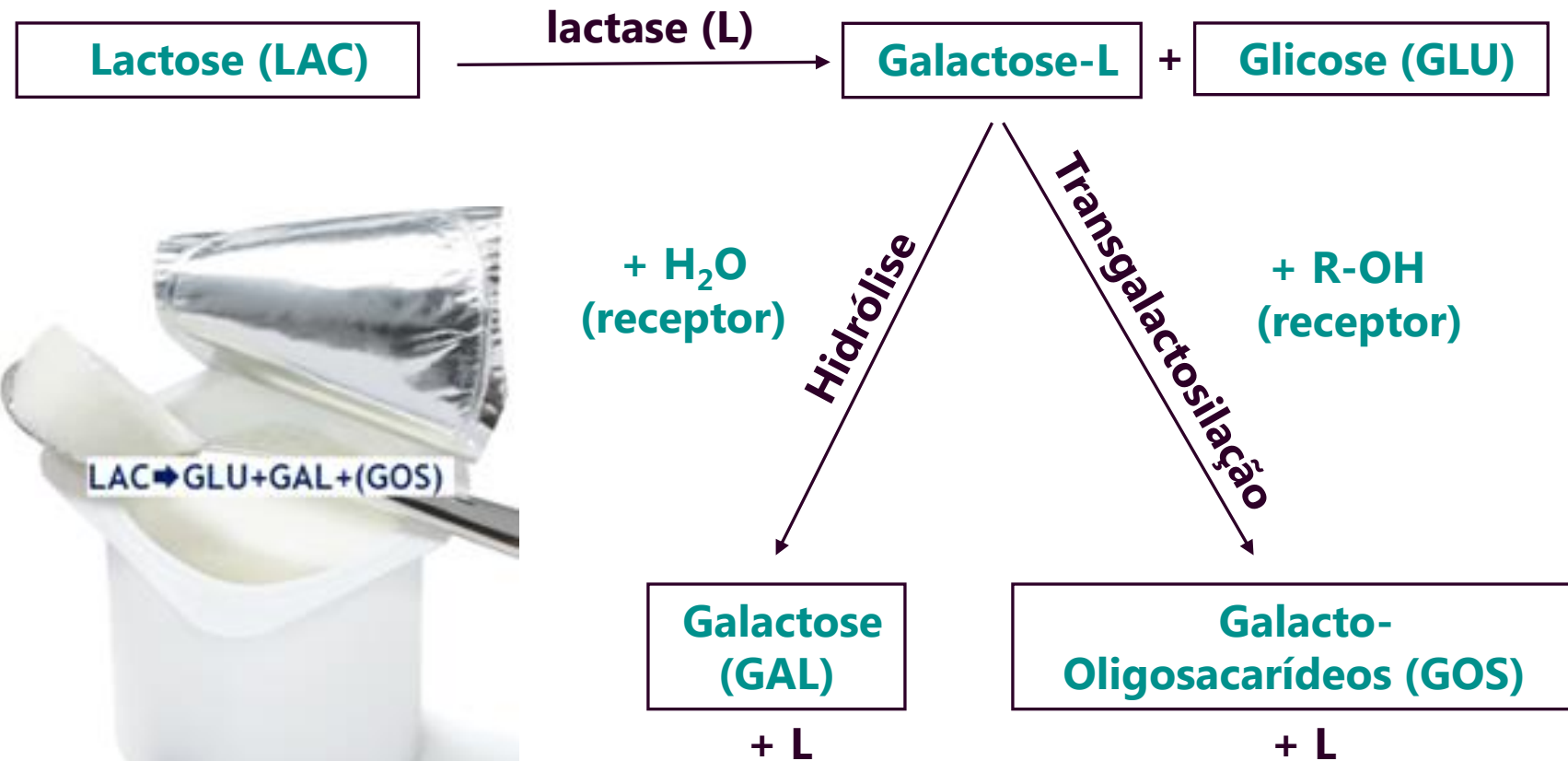
# O mecanismo envolvido na sacarificação



A glucoamilase hidrolisa ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, e a pululanase as ramificações para otimizar a produção de xaropes de alto teor de glicose (>96% DP1).

# Aplicação do enzima LACTASE nos produtos lácteos

Reações catalisadas no leite pela lactase ( $\beta$ -galactosidase)



# Digestibilidade da lactose

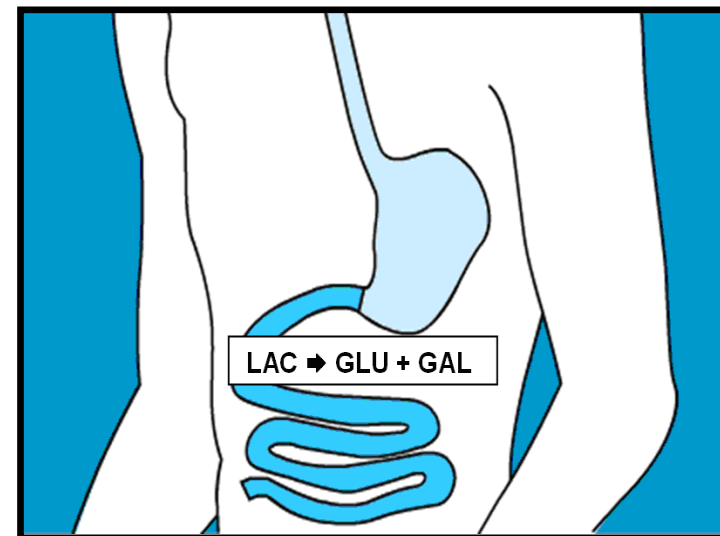
A maioria dos indivíduos adultos no Brasil não pode digerir integralmente a lactose e é considerado **intolerante à lactose**

→Intolerância à lactose não é nem alergia nem enfermidade mas um **desconforto gástrico** que compromete o bem-estar

→Laticínios deslactosados ("alimento para fins especiais") são recomendados para pessoas sensíveis à lactose



Intolerância à lactose dos adultos no <b>Brasil</b>	
<b>Índios</b>	<b>&gt;90 %</b>
<b>Branços</b>	<b>57 %</b>
<b>Mulatos</b>	<b>57 %</b>
<b>Negros</b>	<b>80 %</b>
<b>Japoneses</b>	<b>100 %</b>





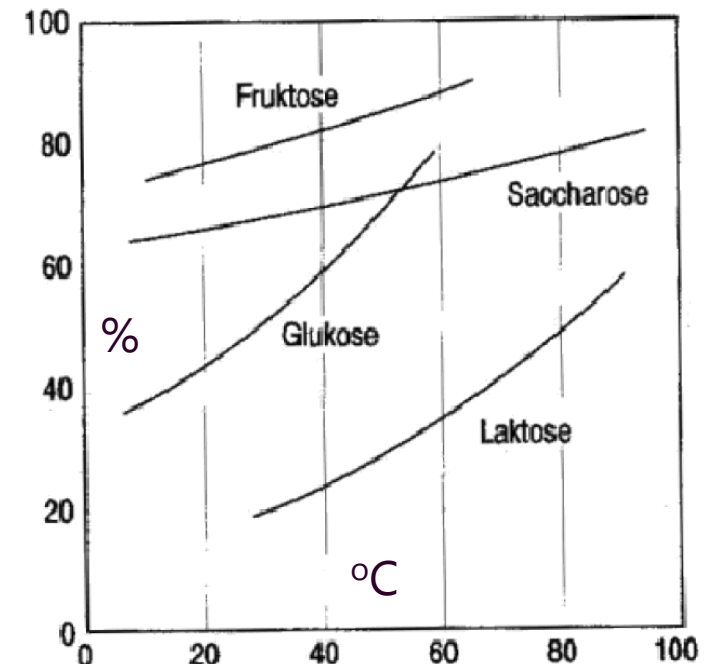
# Aplicação: Redução de formação de cristais

A lactose apresenta **baixa solubilidade** de aprox. 18% em água a 20°C

→ A hidrólise de lactose permite evitar a supersaturação da lactose nos produtos concentrados (p.ex. doce de leite) para **prevenir a formação de grandes cristais de lactose e o aparecimento de arenosidade**



Solubilidade em solução aquosa a 20°C:	
Sacarose	68 %
<b>Lactose</b>	<b>18 %</b>
Glucose	45°C
Teor típico dissolvido no doce de leite:	
Sacarose	55 %
<b>Lactose</b>	<b>25 %</b>
Glucose	22 %



# Aplicação: Formação de fibras alimentares

Aprox. 3-5 % da lactose no leite é transformada pela lactase nos galacto-oligossacarídeos (GOS) que possuem importantes características promotoras da saúde

→ Estimulam o **desenvolvimento dos microrganismos benéficos** (bactérias desejáveis) no intestino e possuem efeitos fisiológicos semelhantes aos das **fibras alimentares solúveis**

→ Teor típico no leite deslactosado: 0,1 - 0,2 %



Exemplos dos efeitos GOS	Componentes benéficos à saúde
Modificação da microflora colonizadora do cólon	<b>Lactobacilos e bifidobactérias</b>
Ligeira alteração da acidez no intestino grosso	<b>Decréscimo no pH do cólon</b>
Estímulo à produção e absorção de nutrientes	<b>Ácidos graxos de cadeia curta, cálcio, ferro e magnésio</b>

# Aplicação: Redução de açúcar adicionado

Brasil na Balança (2014)		Mulheres	Homens
Excesso de peso	IMC $\geq$ 25 kg/m <sup>2</sup>	49 %	57 %
Obesidade	IMC $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup>	18 %	18 %



Os monossacarídeos **glicose e galactose** são aprox. 2 vezes mais doces do que a lactose na concentração encontrada no leite

→A hidrólise pela lactase permite reduzir 1 – 2 g de açúcar nos laticínios açucarados (100g) sem diminuição do dulçor relativo (**aprox. – 10% dos kcal**)

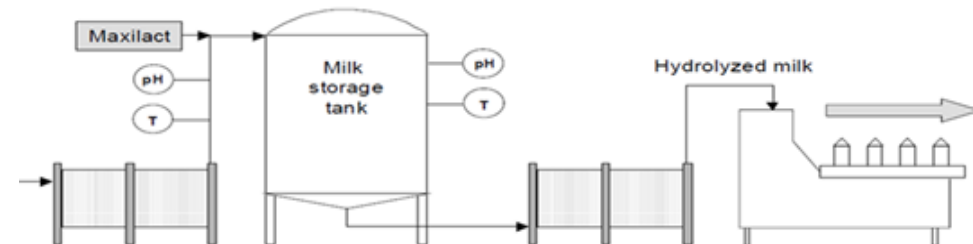
→Teor típico no leite deslactosado: **aprox. 4 %**

# Aplicação: Coadjuvante de Tecnologia

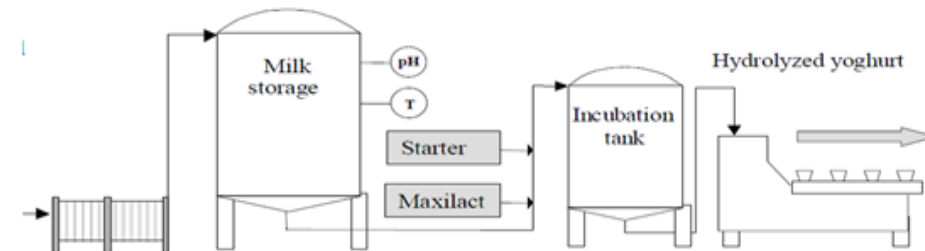
→ A inativação irreversível da lactase tanto por pasteurização na pré-hidrólise dos leites como por acidez ( $\text{pH} < 5,0$ ) na co-hidrólise dos iogurtes permite a aplicação de este enzima como coadjuvante de tecnologia



Aplicação tradicional da lactase no leite (pré-hidrólise):



Aplicação comum da lactase nos iogurtes na Europa e nos Estados Unidos (co-hidrólise):



# Conclusões

As reações catalisadas pela lactase no leite permitem não só a elaboração dos “alimentos para fins especiais” destinados a intolerantes à lactose, mas também a **produção dos alimentos regulares com características benéficas:**

- Diminuição de açúcar e calorias nos iogurtes e achocolatados
  - Redução de arenosidade (cristais) nos doce de leite
  - Formação de fibras alimentares promotoras da saúde

Junto ao processo tradicional de pré-hidrólise da lactose nos leites, também a **aplicação da lactase durante a fermentação (co-hidrólise)** permite o uso seguro desta enzima como coadjuvante de tecnologia nos alimentos:

- Processo de produção eficiente e rápido dos iogurtes deslactosados
  - **Inativação completa e irreversível da lactase** pela acidez a  $\text{pH} < 5,0$

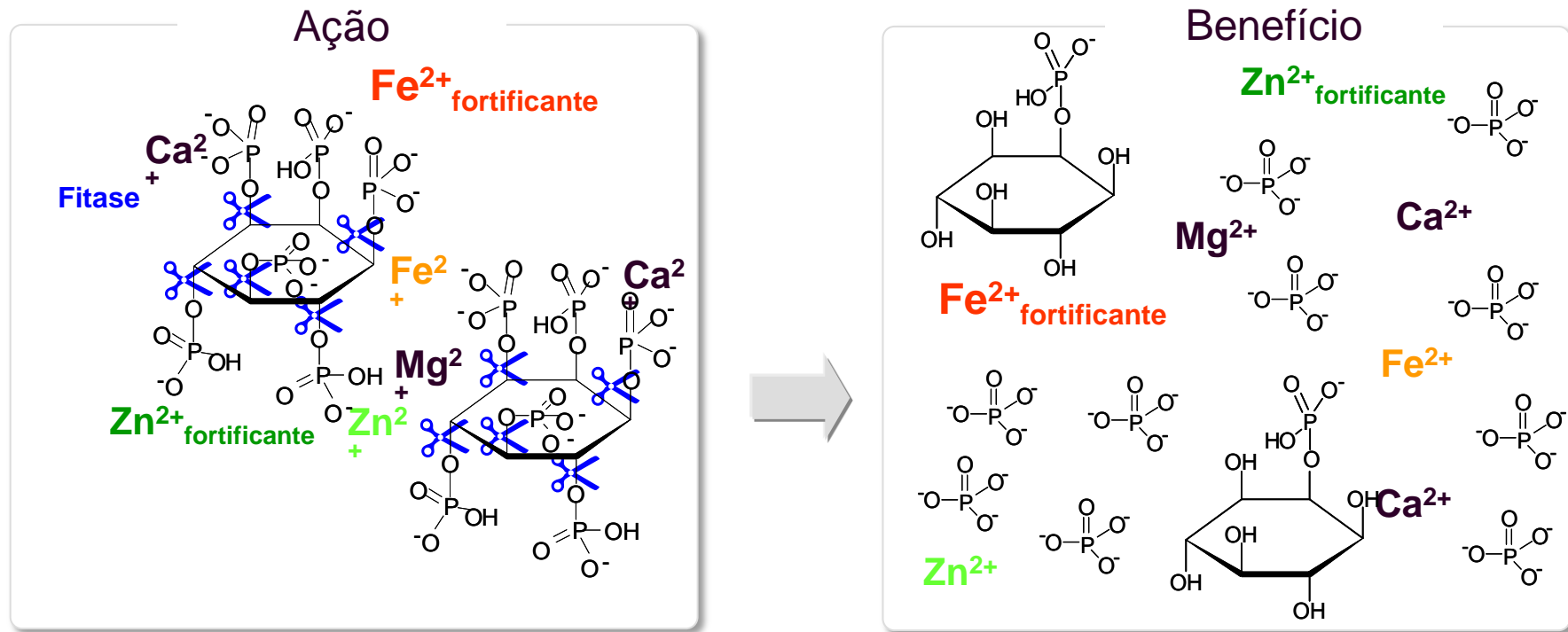


# O fitato é um importante contribuinte para deficiências minerais globalmente

- Deficiências de ferro e zinco normalmente estão presentes nos países em desenvolvimento. Mulheres e crianças estão mais expostas a tal deficiência. A deficiência de ferro e zinco em crianças de primeira infância resulta em diminuição de desenvolvimento cognitivo e físico, que não podem ser corrigidos posteriormente.
- Cereais integrais, legumes e nozes fornecem minerais em abundância. No entanto, eles também contêm níveis elevados de fitato, que se pode ligar em até seis moléculas de ferro, zinco ou cálcio.
- Minerais ligados a fitato são pouco biodisponíveis para os seres humanos.
- A fitase pode quebrar o fitato e impedi-lo de formar complexos com os minerais, tornando-os biodisponíveis.



# Fitase: digestão do fitato e transformação do dos minerais disponíveis para absorção



A fitase age clivando os fosfatos a partir do fitato (até cinco dos seis fosfatos). Três fosfatos precisam ser removidos para a liberação eficiente do mineral. Isso faz com que o fosfato e os minerais intrínsecos e fortificados ligados anteriormente fiquem disponíveis para absorção humana.

# Fitase: aplicação como coadjuvante de tecnologia ou ingrediente

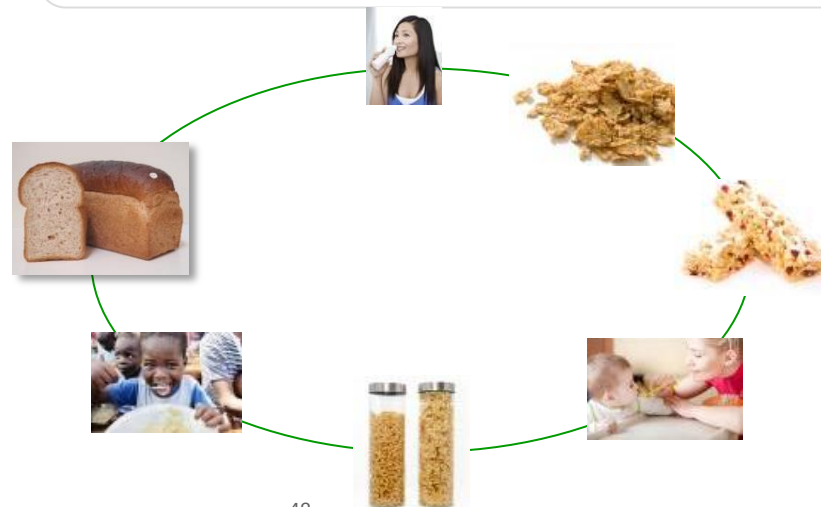
## Coadjuvante de Tecnologia

- A fitase pode ser adicionada durante o processamento de alimentos para digestão do fitato **diretamente no alimento**.
- O alimento pronto para consumo conterá minerais com boa biodisponibilidade (intrínseco e fortificado).

ou

## Ingrediente

- O alimento/ bebida/ suplemento fortificado com fitase é consumido juntamente com o alimento rico em fitato.
- A fitase digere o fitato **no estômago** deixando os minerais intrínsecos e fortificados disponíveis para absorção.





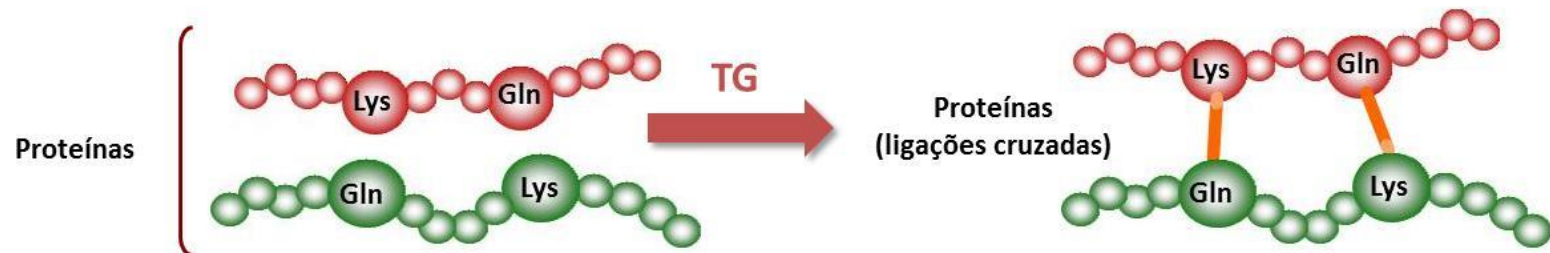
# Transglutaminase

O que é?



**Transglutaminase  
(TG)**

- Enzima transferase
- Cataliza **POLIMERIZAÇÃO** de proteínas

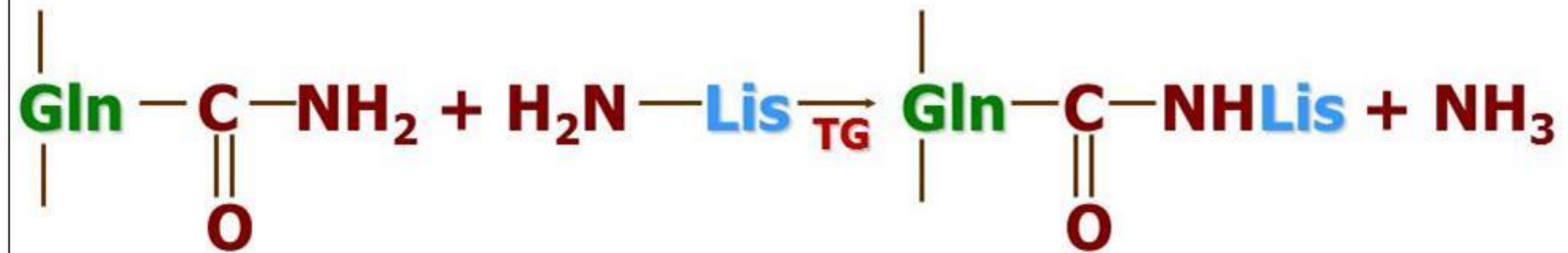


# Mecanismo de ação

## Reação de acil-transferência



## Ligação cruzada entre resíduos protéicos de glutamina e lisina

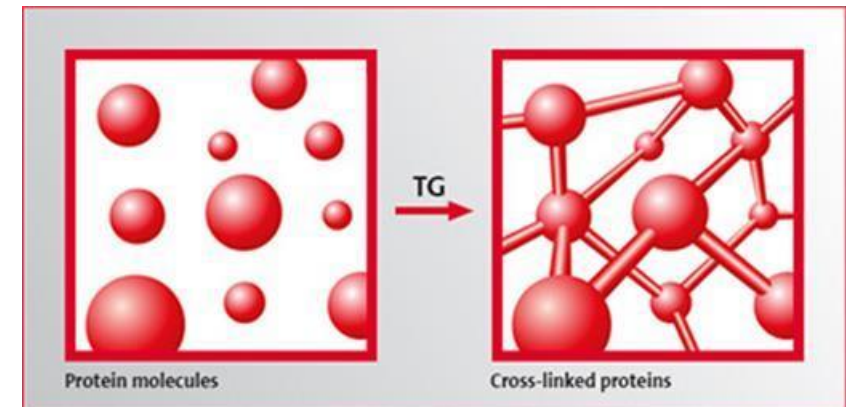


# Mecanismo de ação

## Atuação da TG sobre as proteínas

Alimento	Proteína	Reatividade
Leite	Caseína	○ ○ ○
	α-Lactoalbumina	○
	β-Lactoglobulina	○
Ovo	Clara	○
	Gema	○ ○
Trigo	Glúten	○ ○
Carne	Colágeno	○ ○
	Gelatina	○ ○ ○
	Miosina	○ ○ ○
	Actina	●
Soja		○ ○ ○

○ ○ ○	Reage muito bem
○ ○	Reage bem
○	Reage em certas condições
●	Geralmente não reage



# Aplicações e benefícios



Presunto,  
salsicha,  
linguiça,  
etc.

Cárneos

Farinhas

Massas,  
pães, etc.



Queijos,  
iogurtes,  
etc.

Lácteos

# Aplicações e benefícios



Presunto,  
salsicha,  
linguiça,  
etc.

Cárneos



## Benefícios:

- Melhoria da qualidade dos produtos:
  - Melhoria de firmeza e elasticidade
  - Melhoria da suculência
- Possibilita a elaboração de produtos inovadores

# Aplicações e benefícios

Farinhas

Massas,  
pães, etc.



Benefícios: Pães

- Melhoria da qualidade:
  - Diminuição de bolhas no miolo
  - Maior abertura de pestana e crescimento do pão
  - Aumenta a maciez
- Aumento da força da rede de glúten



Massas

- Melhoria da força da rede de glúten
- Reduz quebra da massa
- Aumenta firmeza e elasticidade



# Aplicações & Benefícios

Benefícios:



Lácteos

Bebida Láctea e iogurte  
(SET e STIRRED)

- Melhor aproveitamento das proteínas lácteas
- Melhoria da qualidade dos produtos:
  - Redução da sinerese
  - Melhoria da textura, aumentando a força do gel
  - Aumenta cremosidade






Queijos

- Promove melhor aproveitamento das proteínas lácteas
- Melhoria da qualidade dos produtos:
  - Reduz sinerese
  - Melhora fatiabilidade através da manutenção da elasticidade durante shelf life do produto



# Publicações científicas



Tipo de produto	País	Instituição	Benefício
Queijo Cheddar		United States Patent	Aumento de 20% no rendimento
Queijo frescal		Cândido Tostes	Aumento de 13% de rendimento devido a retenção de proteína no queijo
Queijo curado		University of Naples	Aumento de rendimento até 21% e retenção das proteínas no queijo
Pão sem glúten		Faculty of Food Sciences Department of Food Technology	Aumento no volume específico, aumento na aceitação sensorial e melhora de textura da casca do pão
Pão sem glúten		University of Pelotas (Brazil/Institute of Agrochemist and Food Technology (Spain))	Aumento do volume específico e melhora na textura da casca do pão



# Agenda



1. Tendências que impactarão a produção de alimentos
2. Como as enzimas estão presentes no nosso dia a dia
3. Aplicações de enzimas na produção de alimentos
4. O futuro
5. Dúvidas

# Futuras necessidades?

● Mais alimentos e melhor agricultura

● Produção mais limpa, inteligente e segura

● Crescimento econômica sustentável

● Ar e água limpos



● Energia renovável

● Clientes satisfeitos

● Cidades sustentáveis e reciclagem de resíduos

● Um mundo balanceado



Existe um grande potencial inexplorado para soluções biológicas que podem melhorar as condições de vida pelo mundo.

Nós estamos juntos nesta jornada!



Mercado mundial de enzimas  
USD ~ 4.0bn

# Mercado Potencial

# Referências

CHRISTIE, W. W. **What is a lipid?** AOCS Lipid Library. James Hutton Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland. July, 2013.

COWAN, D.; OXENBØLL, K. M.; HOLM, H. C. Enzymatic bioprocessing of oils and fats. Inform 210, April, 2008.

FRANSSEN, M. C. R.; STEUNENBERGA P.; SCOTTB, E. L.; ZUILHOFAC, H.; SANDER, S. J. P. M.. **Immobilised enzymes in biorenewables production.** Chem. Soc. Rev., 2013, 42, 6491-6533.

OXENBØLL, K.; ERNST, S. **Environment as a new perspective on the use of enzymes in the food industry.** Department of Food Science & Technology of Novozymes, 2008.

OXENBØLL, K.; LI, Y.; AXELSEN, A. G. **Life Cycle Assessment of using Novamyl®Steam for industrial production of steamed bread in China.** Novozymes, 2010.





# Regulamentação internacional de enzimas

Vincent J.H. Sewalt, PhD  
Senior Director, Product Stewardship & Regulatory  
DuPont Industrial Biosciences  
Member of ETA & IECG

# Regulamentação Internacional de Enzimas



## Juridições

Codex Alimentarius

Estados Unidos

Canadá

México

Brasil

União Européia EU

China

Austrália/NZ

## Corpos de Avaliação

JECFA

FDA

Health Canada

COFEPRIS

ANVISA

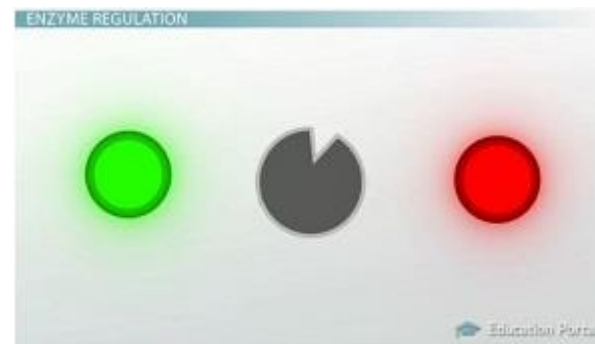
EFSA

NHFPC (formerly MOH)

FSANZ

# Regulamentação Internacional de Enzimas

- Status regulatório de enzimas como coadjuvante de tecnologia
- Processo de aprovação de enzimas
- Requerimento de dossiê



# Status da enzima como coadjuvante

Ingredientes alimentares exigem a aprovação em todas as jurisdições a menos que elas sejam...

Jurisdição	Isenção	Definição
Estados Unidos	1.100% removido ou GRAS	= não se torna componente no alimento Histórico de uso seguro (pré-1958)
Canadá	Coadjuvante de tecnologia	Não altera as características do alimento
EU - FIAP	Não é isento*	Coadjuvante de tecnologia incluído na lista FIAP





## Status da enzima como coadjuvante, cont.

Ingredientes alimentares exigem a aprovação em todas as jurisdições a menos que elas sejam...



Jurisdição	Isenção	Definição
México	Não é isento*	-
Brasil	Não é isento	-
China	Não é isento*	As enzimas são definidas como aditivos alimentares
Austrália e NZ	Não é isento*	As enzimas são definidas como aditivos alimentares

\* Exceto quando usado como coadjuvante de tecnologia para fazer um aditivo alimentar.

# Codex



- Inventário de coadjuvantes de tecnologia (IPA)
  - <http://ipa.ccfa.cc/IPA/>
  - 520 entradas. Não há uma “lista positiva”, mas muitos países que “Seguem o Codex” não tem requisitos de aprovação
- JECFA Avaliações – Banco de dados para pesquisa:
  - <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx#>
  - Enzimas: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx?fc=35#> 78 enzimas avaliadas através 78 reuniões JECFA(Nov 2013)
- JECFA especificações para enzimas alimentares
  - <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/A0691E03.htm>

# Estados Unidos



- As enzimas alimentares são consideradas aditivos alimentares, a menos que sejam Generally Recognized As Safe (GRAS).
- Precisam ser aprovadas como petição de aditivos alimentares (FAP) a menos GRAS
  - Lista de enzimas aprovadas em 21 CFR § 173 or 184
  - Conformidade com as especificações da FCC
- Processo GRAS para maioria das enzimas:
  1. Determinação própria -GRAS
  2. Acordo pelo (painel de) especialista(s)
  3. Nota opcional GRAS (GRN) arquivado no FDA

# Estados Unidos



Nota opcional GRAS (GRN) arquivado com FDA

- Para suportar requisitos de documentação do cliente dos EUA
- Para suportar a avaliação JECFA / aprovação internacional

Tempo necessário:

- FDA revisão de GRAS: 4-6 meses
- Se forem necessários novos testes de toxicologia, o processo todo (com GNR) leva 18-24 meses depois de ter produção organismo/processo
- Se baseado na segurança da linhagem da cepa, GRAS (com GRN) leva 9-12 meses depois de ter produção organismo/processo



# Estados Unidos



Ato de Modernização de Segurança Alimentar – regras que afetam as enzimas alimentares

- Registro de unidade fabril alimentar
  - 31 Dez, 2012, em seguida, a cada 2 anos
- Registros de acessos expandido
  - Abril 2014
- Regra controles preventivos
  - 30 Ago, 2015
- Programa de verificação de fornecedor estrangeiro e acreditação de terceiros
  - 31 Outubro, 2015
- Transporte sanitário / Adulteração intencional
  - Março/Maio, 2016



# Canadá



Enzimas reguladas como aditivos alimentares, a menos que seja coadjuvante de tecnologia

- Para ser coadjuvante de tecnologia, sua concentração deve ser insignificante no alimento e não afeta características do alimento acabado
  - Ajuda à transformação se uma enzima é considerada depende do uso
  - Pode obter Carta de Parecer da Health Canadá, mas não é obrigatório
  - Requisitos de segurança adequados a coadjuvante de tecnologia estabelecidos com a indústria (Associação Técnica Enzima)



# Canadá



- Aditivos alimentares: Enzimas na Tabela V da Divisão 16 da Food and Drug Regulations
  - Atualmente listadas pela atividade e espécies, muitas vezes até o número estirpe. Health Canada está considerando agrupamento. A Iso restringido por aplicação.
- Para aprovar nova enzima como aditivo alimentar:
  - Arquivo com a Health Canada: 2 anos para revisão de segurança
  - Avaliação Legal anterior ao listado foi eliminado (!) Em 2013, agora novo aditivo alimento é "incorporado por referência" no site.

<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/list/5-enzymes-eng.php>

- Além disso, deve estar na Lista de Substâncias Domésticas (DSL)!

# Europa



Até março 2015

- As enzimas usadas como aditivos alimentares devem ser aprovados de acordo com a Diretiva 89/107 da UE (2 a 4 anos)
- Novas enzimas usadas como coadjuvantes tecnológicos não precisam de aprovação, exceto na:
  - Dinamarca (processo 8 meses a 1,5 anos)
  - França (processo 1 a 2 anos)
    - Ambas submissão direta ou via de reconhecimento mútuo
  - Reino Unido (voluntária)
- Adicionalmente, existem “legislações verticais” a serem cumpridas (por exemplo, pão, sumo de fruta, vinho)





# Europa



## Em processo (FIAP)

- Novo pacote legislativo publicado em dezembro 2008: Food Improvement Agents Package
  - Inclui regulamento sobre enzimas alimentares (Reg. 1332/2008)
  - Abrange TODAS as enzimas alimentares, incluindo os utilizados como coadjuvantes de tecnologia.
- Uma enzima alimentar está incluído na lista da UE se:
  - Não traz preocupação para a saúde do consumidor;
  - Há uma necessidade tecnológica;
  - Seu uso não induz o consumidor ao erro/engano



# Europa



## Em processo (FIAP)

- Aplicação para as enzimas **ATUAIS** – apresentação de dossiês de Novembro/2011 - Março de 2015.
  - Apresentação agrupada por enzimas de cepas não-GM
  - Apresentação específica para as enzimas de cepas de linhagem não GM - lista positiva ainda em discussão
- Publicação da lista positiva após 2020; prevalecem legislações nacionais até publicação
- Novas enzimas após a publicação da lista positiva da UE: tudo terá de ser submetido para ganhar direito de vender (processo – 2 anos)
  - Período de transição 2015 → publicação



# Europa - O que é autorizado pela FIAP



Preparação Enzimática

Enzima Concentrada

= "enzima alimentícia"

**Autorizada pela FIAP**

**Enzima**

Substância pura

Laboratório

Cristais brancos

Extrato da fermentação

Produtores de enzimas

Líquido marrom

Formulação

Produtores de alimentos

Líquida ou granular

# China



Enzimas alimentares são reguladas como aditivos – São necessárias 2 aprovações:

- GB 2760 lista positiva de aditivos alimentares (atividade x espécie de produção x gene doador)
- Autorização de manufatura (licença de produção)
  - Além da conformidade com as normas nacionais: Norma geral de enzimas, norma de 'blending', normas de ensaio
- Para aprovar nova enzima:
  - Até 2010: enzima precisa ter aprovação prévia por 2 países "grandes" ou 1 país & JECFA.
  - Desde 2010: processo de aprovação interrompido por enzimas derivadas de GMM - falta de domínio de avaliação de GMMs / aprovação entre Ministério da Saúde e da Agricultura.

# Austrália



- Enzimas regulamentadas como aditivos alimentares (aprovação necessária), classificadas como coadjuvantes de tecnologia
  - Listada no Food Standards Code, Norma 1.3.3, Provisões 15-17
  - Se não está na lista positiva, então a aprovação é necessária (10 - 12 meses de processo)



# México



- Todas as enzimas alimentares devem ser aprovadas.
- Enzimas aprovadas são listadas no Diário Oficial, por atividade enzimática e organismo fonte
- Processo de aprovação por petição à COFEPRIS. Dossiê semelhante à determinação GRAS
  - Aprovação nos EUA ajuda (GRAS ou notificação GRAS).
  - Aprovação leva 3-9 meses
    - Publicação demora 1-2 anos
    - Mas pode importar/ vender com carta de aprovação
  - ETA defendendo a adoção de GRAS

# Brazil



Enzimas aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC53 / 2014

- Listado por enzima x gene doador x combinação de espécies hospedeiras.
- Ingredientes de formulação (conservantes) devem ser aprovados para uso em alimentos ou estar listado na lista positiva de ingredientes
- Para adicionar nova enzima, precisa de apresentação de dossiê com seguinte (RDC 54/2014):
  - Dados demonstrando a necessidade tecnológica
  - Inativação
  - Enzimas GMM-derivados:
    - dados sobre rDNA
    - Conformidade com a Lei de Biossegurança



# Requerimentos do dossiê



Item	Especificações	Países
Identidade da enzima	IUBMB	Todos
Identidade da cepa	Gênero/espécie	Todos
Detalhes da construção da cepa <ul style="list-style-type: none"> <li>Sem transferência de DNA</li> <li>Demonstrar estabilidade genética</li> </ul>		Todos, detalhes variam <ul style="list-style-type: none"> <li>Todos</li> <li>Todos (EU a nível genético)</li> </ul>
Marcadores de resistência	Nenhum permitido Sem relevância clínica	<ul style="list-style-type: none"> <li>EU – somente novas cepas</li> <li>US, CAN, BR, MX, CN, ANZ</li> </ul>
Aprovação específica para MGM		<ul style="list-style-type: none"> <li>JP, CN</li> </ul>
Detalhes do processo de produção Ausência de rDNA		<ul style="list-style-type: none"> <li>Todos, variam os detalhes</li> <li>EU, FR e BR</li> </ul>
Descrição do uso e justificativa técnica	Necessidade tecnológica Inativação Subprodutos	<ul style="list-style-type: none"> <li>EU, FR</li> <li>EU, BR</li> <li>EU, ANZ</li> </ul>
Dados toxicológicos da cepa Segurança da linhagem da cepa	Caso a caso	<ul style="list-style-type: none"> <li>CAN, FR</li> <li>US, DK, MX, BR, EU</li> </ul>



# Base de aprovações



Item	Especificações	Países
Lista identificando enzima e fonte	IUBMB Gênero e espécie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todos</li> </ul>
Aprovação específica por cepa Lista genérica		<ul style="list-style-type: none"> <li>• FR, JP, CAN</li> <li>• US, EU?, BR, MX, CN, ANZ</li> </ul>
Finalidade especificada Finalidade não especificada		<ul style="list-style-type: none"> <li>• US, CAN, EU</li> <li>• BR, MX, CN, ANZ</li> </ul>
Finalidade de acordo com as BPFs/princípio <i>quantum satis</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• US, CAN, EU, BR (JECFA: no ADI)</li> </ul>
Carry-over permitido	Desde que nenhum efeito nos alimentos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todos</li> </ul>
Lista de ingredientes de formulação		<ul style="list-style-type: none"> <li>• CN, BR</li> </ul>
Tempo para avaliação e uso	< 6 meses total (sem espera)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• US, MX</li> </ul>
	1 ano de avaliação (sem espera)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ANZ, BR</li> </ul>
	~2 anos (sem espera)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EU, CAN, CN</li> </ul>
Normas nacionais	Exemplo: lácteos, pão, sucos, cerveja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• US, EU, BR, CN</li> </ul>



# Conclusão

- Sistemas de regulamentação de enzimas variam globalmente, mas as exigências são muito similares
- A EFSA é mais conservadora do que a maioria das autoridades no que diz respeito a demonstrar a necessidade tecnológica e exigências de OGM
- Requisitos do Brasil estão alinhados com os do EUA, Canadá, México e ANZ, além de alguns dos requisitos adicionais da EFSA
- Requisitos de segurança alimentar vão convergir globalmente, devido a FSMA e outros regulamentos equivalentes



S  
O  
L  
T  
O  
S  
A  
L  
I  
M  
E  
N  
T  
O  
S

# Regulamentação de enzimas alimentares como coadjuvantes de tecnologia no Brasil

Renata de Araujo Ferreira  
Gerência Geral de Alimentos – GGALI  
Julho - 2015



**ANVISA**  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

# Coadjuvante de tecnologia

---

- *É toda substância, excluindo os equipamentos e os utensílios utilizados na elaboração e/ou conservação de um produto, que não se consome por si só como ingrediente alimentar e que se emprega intencionalmente na elaboração de matérias-primas, alimentos ou seus ingredientes, para obter uma finalidade tecnológica durante o tratamento ou fabricação. Deverá ser eliminada do alimento ou inativada, podendo admitir-se no produto final a presença de traços de substância, ou seus derivados.*

Item 1.3 da Portaria n. 540/97



**ANVISA**  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

# Enzima ou preparação enzimática

---

- Função de coadjuvante de tecnologia.
- *Enzima ou preparação enzimática: substância de origem animal, vegetal ou microbiana que atua favorecendo as reações químicas desejáveis.*

Item 4.11 da Portaria n. 540/97

# Resoluções vigentes

---

- Resolução RDC n. 53/2014: dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral;
- Resolução RDC n. 54/2014: dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral;
- Oriundas da CP n. 36/2011;
- Publicadas no DOU em 8/10/2014.



# www.anvisa.gov.br

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - www.anvisa.gov.br - Windows Internet Explorer

http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Favoritos Portal da Justiça Federal d... Conversão de Medidas O... Galeria do Web Slice Sites Sugeridos

Agência Nacional de Vi... http://portal.anvisa.gov.br... http://portal.anvisa.gov.br...

BRASIL Acesso à informação Participe

**ANVISA**  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Buscar

INÍCIO A AGÊNCIA SALA DE IMPRENSA SERVIÇOS ALERTAS E INFORMES REGULAÇÃO EDUCAÇÃO E PESQUISA CIDADÃO PROFISSIONAL DE SAÚDE SETOR REGULADO

TAMANHO DO TEXTO A- A A+ Contraste normal | Alto Contraste

**Proteção à Saúde**

- Agrotóxicos e Toxicologia
- Alimentos**
- Cosméticos
- Derivados do Tabaco
- Insumos Farmacêuticos
- Laboratórios
- Medicamentos
- Portos, Aeroportos e Fronteiras
- Produtos para a Saúde
- Saneantes
- Sangue, Tecidos e Órgãos
- Serviços de Saúde

**Pós - Comercialização / Pós - Uso**

- Vigipós
- Fiscalização
- Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos - CMED

**Destques**

**Notícias**

3/7 | 18h32

**Consulta Produtos**

Tire suas dúvidas sobre produtos e empresas.  
ACESSO AQUI

**Notificação - Notivisa**

Relate aqui problemas encontrados no uso dos produtos sob vigilância sanitária.  
ACESSO AQUI

**CICLO DE DEBATES EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA: DESAFIOS E TENDÊNCIAS**

**Click Saudável**

**CURSO DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS JÁ DISPONÍVEL**

**Acesso à Informação**

**Petições aguardando análise**

**DESCONTINUAÇÃO DE MEDICAMENTOS**

**twitter**

http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos

Intranet local | Modo Protegido: Desativado

100%

09:03 6/7/2015

# www.anvisa.gov.br

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - www.anvisa.gov.br - Windows Internet Explorer

http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Favoritos Portal da Justiça Federal d... Conversão de Medidas O... Galeria do Web Slice Sites Sugeridos

Agência Nacional de Vi... x http://portal.anvisa.gov.br... http://portal.anvisa.gov.br...

BRASIL Acesso à informação Participe

**ANVISA**  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Buscar

INÍCIO A AGÊNCIA SALA DE IMPRENSA SERVIÇOS ALERTAS E INFORMES REGULAÇÃO EDUCAÇÃO E PESQUISA CIDADÃO PROFSSIONAL DE SAÚDE SETOR REGULADO

TAMANHO DO TEXTO A- A A+ Contraste normal | Alto Contraste

### Assuntos de Interesse

- Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia
- Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde
- Alimentos Geneticamente Modificados
- Ações Fiscais
- Boas Práticas Nutricionais
- Certidão de Exportação
- Certificação de Boas Práticas de Fabricação
- Comitês e Grupos de Trabalho
- Câmara Setorial
- Embalagens
- Eventos
- Tabela de Conteúdo de Fenilalanina em Alimentos
- Informes Técnicos
- Legislação**
- Monitoramento e Pesquisa
- Novos Alimentos e Novas

### Início / Alimentos

A Gerência-Geral de Alimentos publicou nesta quarta-feira, (22/01), o Informe Técnico nº. 55/2014, que traz esclarecimentos sobre as situações passíveis de concessão de prazo para esgotamento de embalagens de alimentos.

### Destaques

**Aberta Consulta Pública sobre BPF para produtores de embalagens de alimentos**

Cidadãos, representantes da

**Enzimas Ativas: esclarecimentos para avaliação de alimentos e suplementos**

A Anvisa publicou o Informe

### Informes

29 de dezembro de 2010  
Informe Técnico nº 45, de 28 de dezembro de 2010

29 de dezembro de 2010  
Informe Técnico nº 45, de 28 de dezembro de 2010

MAIS INFOMES

**Categorização dos serviços de alimentação**

HotSite - Dicas de Alimentos para a Semana Santa

HotSite Festas de

http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Legislacao

Intranet local | Modo Protegido: Desativado 100%

09:04 6/7/2015



# www.anvisa.gov.br

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - www.anvisa.gov.br - Windows Internet Explorer

http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Legislacao

BRASIL Acesso à informação Participe

**ANVISA**  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Buscar

INÍCIO A AGÊNCIA SALA DE IMPRENSA SERVIÇOS ALERTAS E INFORMES REGULAÇÃO EDUCAÇÃO E PESQUISA CIDADÃO PROFISSIONAL DE SAÚDE SETOR REGULADO

TAMANHO DO TEXTO A- A A+ Contraste normal | Alto Contraste

**Assuntos de Interesse** *Início / Alimentos / Assuntos de Interesse / Legislação*

- Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia
- Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde
- Alimentos Geneticamente Modificados
- Ações Fiscais
- Boas Práticas Nutricionais
- Certidão de Exportação
- Certificação de Boas Práticas de Fabricação
- Comitês e Grupos de Trabalho
- Câmara Setorial
- Embalagens
- Eventos
- Tabela de Conteúdo de Fenilalanina em Alimentos
- Informes Técnicos
- Legislação
- Monitoramento e Pesquisa
- Novos Alimentos e Novos

- Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia
- Atos relacionados às Consultas Públicas
- Boas Práticas – Regulamentos Gerais e Específicos
- Normas Internacionais de Referência
- Promoção Comercial de Alimentos Infantis
- Legislação Geral
- ▶ **Legislação Horizontal**
- Legislação por Categoria de Produto

« < 1 > »

Intranet local | Modo Protegido: Desativado 100%

08:50 6/7/2015



**ANVISA**  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

# www.anvisa.gov.br

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - www.anvisa.gov.br - Windows Internet Explorer

http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Aditivos+Alimentares+e+Coadjuvantes+de+Tecnologia

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Favoritos Portal da Justiça Federal d... Conversão de Medidas O... Galeria do Web Slice Sites Sugeridos

Agência Nacional de Vi... http://portal.anvisa.gov.br... http://portal.anvisa.gov.br...

Resolução - RDC nº 7, de 20 de fevereiro de 2008  
Resolução - RDC nº 8, de 20 de fevereiro de 2008  
Resolução - RDC nº 69, de 22 de outubro de 2007  
Resolução - RDC nº 24, de 16 de fevereiro de 2005

**Coadjuvantes de Tecnologia**

Agente de controle de microrganismo  
Resolução - RDC nº 2, de 8 de janeiro de 2004  
Resolução - RDC nº 7, de 2 de janeiro de 2001  
Portaria nº 161 MS/SVS, de 28 de abril de 1997  
Portaria nº 72 MS/SVS, de 24 de agosto de 1995

Açúcar

Resolução - RDC nº 40, de 13 de setembro de 2011  
Resolução - RDC nº 13, de 07 de março de 2008  
Resolução - RDC nº 59, de 11 de setembro de 2007

Bebidas alcoólicas  
Resolução - RDC nº 64, de 29 de novembro de 2011  
Resolução - RDC nº 286, de 28 de setembro de 2005

Branqueamento de estômago, bucho, tripa e mocotó de bovino  
Portaria nº 235 - DETEN/MS, de 21 de maio de 1996

**Enzimas**

Resolução - RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014  
Resolução - RDC nº 54, de 07 de outubro de 2014

Óleos e Gorduras  
Resolução - RDC nº 248, de 13 de setembro de 2005

Lubrificante, agente de moldagem ou desmoldagem  
Resolução RDC n. 27 de 27/05/2009  
Resolução RDC nº 79, de 18 de março de 2002  
Resolução - RDC nº 77, de 17 de agosto de 2000

Intranet local | Modo Protegido: Desativado 100% 08:52 6/7/2015

# Resolução n. 54/2014

---



# Resolução n. 54/2014

---

- Apresenta os princípios gerais de uso de enzimas como coadjuvantes de tecnologia em alimentos, requisitos de composição da preparação enzimática e procedimentos administrativos relacionados.
- Âmbito de aplicação:

*Art. 2º Esta Resolução se aplica somente às enzimas e preparações enzimáticas utilizadas como coadjuvantes de tecnologia na produção de alimentos em geral destinados ao consumo humano.*

*Parágrafo único. Esta Resolução não se aplica a enzimas e preparações enzimáticas destinadas para fins terapêuticos ou medicamentosos ou destinadas para uso como ingredientes em suplementos e outros alimentos.*



# Resolução n. 54/2014

- Não se aplica:



- Regularizados como alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde;
- Segurança e eficácia devem ser comprovadas (RDCs n. 17, 18 e 19/99);
- Maiores informações: Informe Técnico n. 65, de 23 de fevereiro de 2015.



# Resolução n. 54/2014

---

- Definições:

*Art. 3º (...) II - enzimas: proteínas capazes de catalisar reações bioquímicas, aumentando sua velocidade, sem interferir no processo e resultando em alterações desejáveis nas características de um alimento durante o seu processamento;*

*III - preparação enzimática: formulação constituída por uma ou mais enzimas, com a incorporação de ingredientes ou aditivos alimentares, a fim de facilitar o seu armazenamento, comercialização, padronização, diluição ou dissolução;*



# Resolução n. 54/2014

---

- *Art. 4º As preparações enzimáticas para uso em alimentos devem ser elaboradas a partir das enzimas, ingredientes, aditivos alimentares e veículos autorizados pela Resolução de Diretoria Colegiada que dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral*



RDC n. 53/14 .



# Resolução n. 54/2014

---

*Art. 4º (...)*

*§1º. A solicitação de inclusão, exclusão ou alteração de enzimas, de fontes de produção, de métodos de obtenção ou fabricação, de aditivos alimentares e/ou de veículos no regulamento técnico que trata o caput deve ser realizada pela parte interessada (importador ou fabricante) por meio de petição específica.*

*§ 2º. A petição deve incluir relatório técnico-científico contendo a documentação e as informações listadas no Anexo I do presente Regulamento Técnico, para avaliação pela ANVISA conforme os princípios e critérios desta Resolução.*





# Resolução n. 54/2014

---

*Art. 4º (...)*

*§ 3º. Podem ser solicitados pela ANVISA dados adicionais para fins de comprovação de finalidade tecnológica e segurança.*

*§ 4º. A ANVISA publicará no Diário Oficial da União o resultado da avaliação da petição que trata o §1º, sendo permitido provisoriamente o uso da enzima e ou da preparação enzimática até que seja atualizado o Regulamento Técnico que trata o caput.*



# Resolução n. 54/2014

---

- Requisito básico:

*Art. 5º O emprego de enzimas e preparações enzimáticas na fabricação de um alimento deve ser tecnologicamente justificável e seguro à saúde.*



# Resolução n. 54/2014

---



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 2 - IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA E DA PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA:
  - 2.1. Nome comum da enzima e/ou da preparação enzimática;
  - 2.2. Marca comercial da enzima e/ou da preparação enzimática;
  - 2.3. Classificação da enzima no *International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB* (número e nome);
  - 2.4. Número da enzima no *Chemical Abstract Service –CAS*;
  - 2.5. Outros nomes da enzima (quando aplicável);
  - 2.6. Forma de apresentação da preparação enzimática;
  - 2.7. Formulação da preparação enzimática, incluindo os aditivos alimentares e veículos (g/100g ou 100ml).



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES DA ENZIMA E DA PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA:
  - 3.1. Massa molecular e sequência de aminoácidos da enzima;
  - 3.2. Especificações de pureza e identidade da preparação enzimática para: a. Chumbo; b. Salmonella; c. Coliformes totais; d. E. coli;
  - e. Atividade antimicrobiana;
  - f. Eventuais resíduos de solventes de extração;
  - g. Níveis de garantia da enzima, incluindo informações sobre variação lote a lote;
  - h. Percentual de sólidos orgânicos totais por unidade de peso (% T.O.S.);
  - i. Unidades de atividade enzimática por unidade de peso; e
  - j. Outros parâmetros relevantes.



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES DA ENZIMA E DA PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA:
  - 3.3. Laudos de análise laboratoriais, com identificação da metodologia analítica, que comprovem o atendimento às especificações do item 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;
  - 3.7. Dados de estabilidade durante o armazenamento antes do uso.



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 4 - MODELO DE RÓTULO
- Item 5 - FINALIDADE DE USO
  - 5.1. Finalidade tecnológica e mecanismo de ação da enzima no alimento;
  - 5.2. Uso proposto (alimentos em que a preparação enzimática será utilizada e limites de uso).
- Item 6. FONTE E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO
  - 6.1. PRODUÇÃO A PARTIR DE FONTES ANIMAIS
    - 6.1.1. Tecido animal utilizado e histórico de consumo seguro;
    - 6.1.2. Documentação que comprove que o tecido animal utilizado foi submetido à inspeção pelo órgão competente;



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 6. FONTE E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

- 6.1. PRODUÇÃO A PARTIR DE FONTES ANIMAIS

- 6.1.3. 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;

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

- 6.2. PRODUÇÃO A PARTIR DE FONTES VEGETAIS E BASIDIOMICETOS

- 6.2.1. Parte da planta ou do fungo utilizada para produção e histórico de consumo seguro;



**ANVISA**

Agência Nacional de Vigilância Sanitária



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 6. FONTE E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

- 6.2. PRODUÇÃO A PARTIR DE FONTES VEGETAIS E BASIDIOMICETOS

- 6.2.2. Documentação que comprove a ausência de substâncias que podem causar efeitos adversos em humanos;

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

- 6.3. PRODUÇÃO A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS (no caso de micro-organismos geneticamente modificados os dados devem ser fornecidos para o micro-organismo doador e o de expressão)

- 6.3.1. Identificação taxonômica;

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



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 6. FONTE E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

## 6.3. PRODUÇÃO A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS

- 6.3.3. Identificação do grupo ou classe de risco, com as respectivas referências;
- 6.3.4. Histórico de uso seguro;
- 6.3.5. Dados e estudos de estabilidade da cepa geneticamente modificada (cepa de produção);
- 6.3.6. Descrição detalhada do processo de produção e dos controles de qualidade utilizados;
- 6.3.7. Patogenicidade e toxigenicidade;
- 6.3.8. Dados de resistência microbiana;



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 6. FONTE E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

- 6.3. PRODUÇÃO A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS

- 6.3.9. Para micro-organismos 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;

- 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.



**ANVISA**

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 7. DADOS PARA AVALIAÇÃO DO RISCO (A apresentação de estudos toxicológicos pode ser dispensada mediante justificativa, para avaliação caso a caso).
  - 7.1. 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*);
  - 7.2. 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*);



# Relatório técnico - RDC n. 54/2014

---

- Item 7. DADOS PARA AVALIAÇÃO DO RISCO (A apresentação de estudos toxicológicos pode ser dispensada mediante justificativa, para avaliação caso a caso).
  - 7.3. Avaliação de exposição alimentar, com justificativa para a escolha do método utilizado;
  - 7.4. Caracterização do risco (margem de exposição ou percentual da ingestão diária aceitável – IDA).
  
- Item 8. APROVAÇÃO EM OUTROS PAÍSES OU ORGANISMOS INTERNACIONAIS
  - 8.1. Dados de aprovação em outros países e/ou organismos internacionais, quando disponíveis.



# Resolução n. 53/2014

---



# Resolução n. 53/2014

---

- Aprova a lista de enzimas com suas respectivas fontes de obtenção, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso como coadjuvante de tecnologia na produção de alimentos em geral.
- Anexo I: enzimas e suas respectivas fontes de obtenção autorizada.
- Anexo II: aditivos alimentares autorizados para uso nas preparações enzimáticas (limite *quantum satis* - q.s).
- Anexo III: veículos alimentares autorizados para uso nas preparações enzimáticas.



# Resolução n. 53/2014

- Enzimas aprovadas no Brasil:
  - 234 provisões de 58 enzimas elaboradas a partir de 138 fontes diferentes.

Alfa-acetolactato decarboxilase	Dextranase	Isomaltulose sintase	Pectinaliase
Alfa-amilase	Enzima ramificadora	Lacase	Pectinase
Alfa-galactosidase	Esterase	Lactase ou beta-galactosidase	Pepsina
Amilase maltogênica	Ficina	Lactoperoxidase	Peroxidase
Amiloglucosidase ou glucoamilase	Fitase	leucina	Poligalacturonase
Aminopectidase	Fosfatidilcolina esterol o-aciltransferase	Lipase	Protease
Arabinofuranosidase	Fosfolipase A1	Lipase	Pululanase
Asparaginase	Fosfolipase A2	Lipoxigenase	Quimosina
Beta-amilase	Fosfolipase C	Lisofosfolipase	Renina
Beta-glucanase	Glucose isomerase ou xilose isomerase	Lisozima	Tanase
Beta-glucosidase ou celobiose	Glucose-oxidase	Maltase ou alfa-glucosidase	Transglutaminase
Bromelina	Hemicelulase	Nitrato redutase	Tripsina ou quimotripsina
Catalase	Hexose oxidase	Pancreatina	Xilanase
Celulase	Inulinase	Papaína	
Coagulase vegetal	Invertase ou beta-frutofuranosidase	Pectina esterase	





# Resolução n. 53/2014

---

- Enzimas aprovadas no Brasil:
  - Fontes de origem animal, vegetal e microbiana:
    - 10 de origem animal (1 expressa em *A. niger*);
    - 9 de origem vegetal;
    - 119 de origem microbiana sendo 44 organismos geneticamente modificados (37%).



# Tendências

---

- Avaliação caso a caso (cepa específico, empresa específica?);
- Necessidade de reavaliação das enzimas aprovadas antes de 2014?
- Enzimas como aditivos alimentares;
- Rotulagem.



S  
O  
L  
O  
S  
T  
R  
U  
M  
E  
N  
T  
A  
L

**Obrigada!**



[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)



**ANVISA**  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária



# Avaliação de Segurança de Enzimas em Alimentos

Peter Hvass  
Science Senior Manager  
Novozymes Regulatory Affairs  
AMFEP Member

# Conteúdo

## Características das enzimas e produção

- Enzimas utilizadas como coadjuvantes de tecnologia em produção de alimentos
- Como e por que MGM são utilizados na produção de enzimas?

## Requisitos para conformidade de segurança e regulatória

- Requisitos regulatórios e implementação
- Pacote de documentação de segurança
- RDC54/2014 Relatório Técnico-Científico para avaliação de segurança de enzimas

## Pacote de documentação para enzimas grau alimentício

- O caso da Lipase – benefícios do uso da enzima
- Características da enzima
- Exposição estimada
- Construção e produção da cepa
- Estudos de segurança e Margem de segurança

## Tendências e desafios

## Resumo



# Conteúdo

## Características das enzimas e produção

- Enzimas utilizadas como coadjuvantes de tecnologia em produção de alimentos
- Como e por que MGM são utilizados na produção de enzimas?

## Requisitos para conformidade de segurança e regulatória

- Requisitos regulatórios e implementação
- Pacote de documentação de segurança
- RDC54/2014 Relatório Técnico-Científico para avaliação de segurança de enzimas

## Pacote de documentação para enzimas grau alimentício

- O caso da Lipase – benefícios do uso da enzima
- Características da enzima
- Exposição estimada
- Construção e produção da cepa
- Estudos de segurança e Margem de segurança

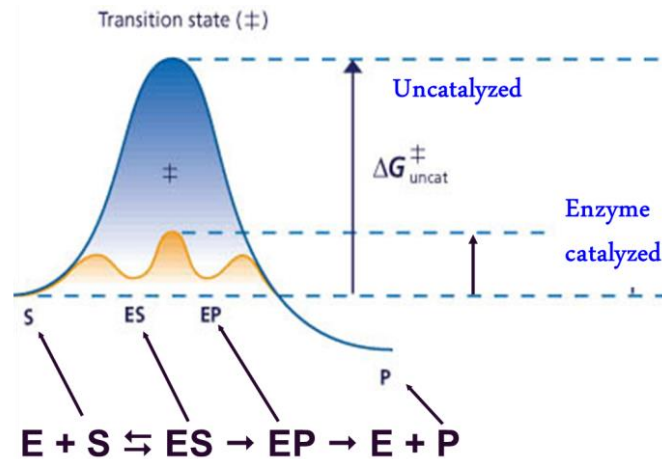
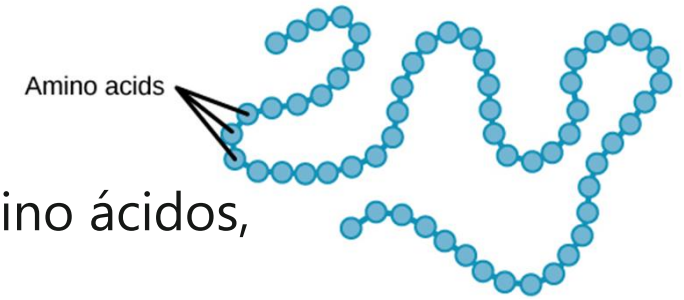
## Tendências e desafios

## Resumo



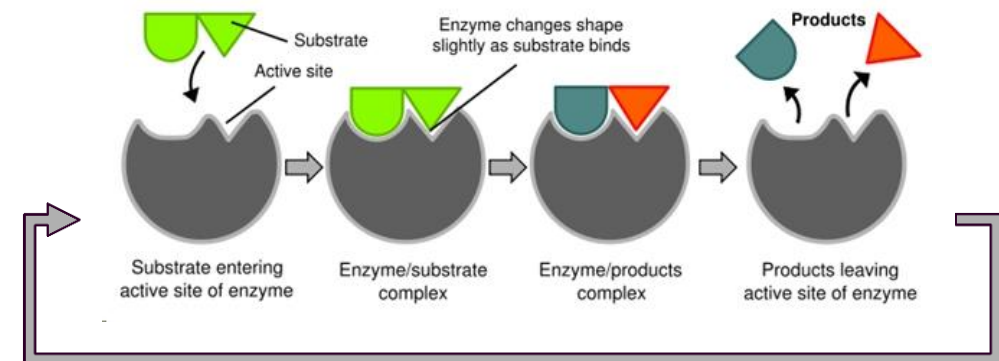
# Características das Enzimas

- Enzimas são proteínas
- Todas as proteínas são baseadas em 20 diferentes amino ácidos, arranjados em diferente ordem e sequência
- A sequência de amino ácidos determina a estrutura bem como a função e as propriedades das enzimas



- Apenas ativas em substratos específicos devido à sua especificidades de ligação

- As enzimas são capazes de catalisar processos bioquímicos, isto, sem serem consumidas



# Uso das enzimas e seus benefícios

## Uso

- As enzimas existem em todos os organismos – presente em todos os lugares
- Longa história de uso seguro
- Qualquer fermentação é essencialmente facilitada por enzimas microbianas
- Utilizada em produção de alimentos como coadjuvante de tecnologia – NÃO há função no produto final



## Benefícios

- Alimentos mais saudáveis – p. ex. eliminação de gorduras trans
- Ambientalmente amigável
  - As enzimas são biodegradáveis
  - Podem ser utilizadas para reduzir o consumo de água e energia e substituir o uso de químicos convencionais





# Enzimas produzidas por microrganismos

- Industrial, enzimas do tipo selvagem podem ser produzidas a partir de plantas, animais ou microrganismos
- Entretanto, volumes controlados em larga escala de uma enzima específica pode ser difícil de se atingir com organismos nativos



- Enzimas produzidas por microrganismos geneticamente modificadas (MGMs)
  - Pode ser a única opção de produção de alguns produtos especiais
  - Tem frequentemente um custo benefício melhor que enzimas convencionais
  - Podem ser geralmente produzidas com menos energia, matérias-primas e desperdícios, levando à redução do impacto ambiental

# Desenvolvimento da cepa de produção

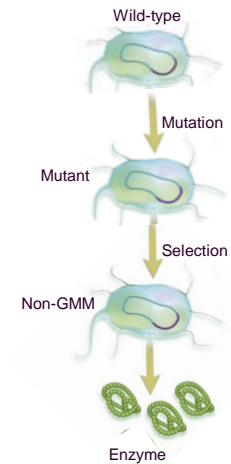
Um **não-MGM**, é desenvolvido de uma cepa tipo selvagem por um ou mais rodadas de mutação clássica (p. ex. NTG e/ou irradiação UV) seguida de seleção por produção ótima da enzima de interesse.

## Desafios

Número limitado de microrganismos capazes de crescer em escala industrial

Melhoria limitada na expressão da enzima

Variação natural limitada das características das enzimas (pH ótimo, temperatura de estabilidade, etc.)



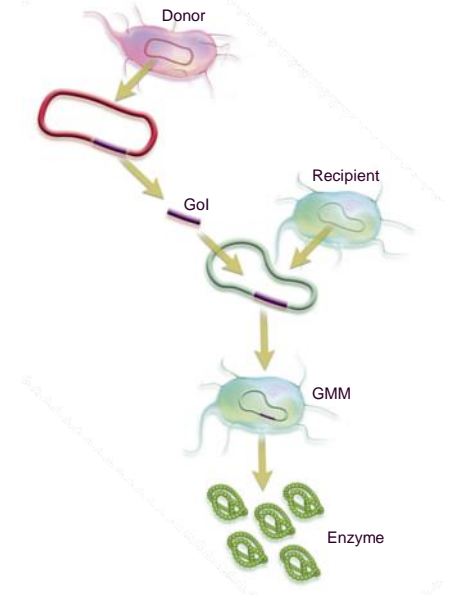
Um **MGM clássico** é construído pela inserção do gene de interesse (GoI) de um tipo de microrganismo (a cepa doadora) em outro tipo de microrganismo (a cepa receptora).

## Benefícios

Expressão da enzima em um hospedeiro seguro selecionado

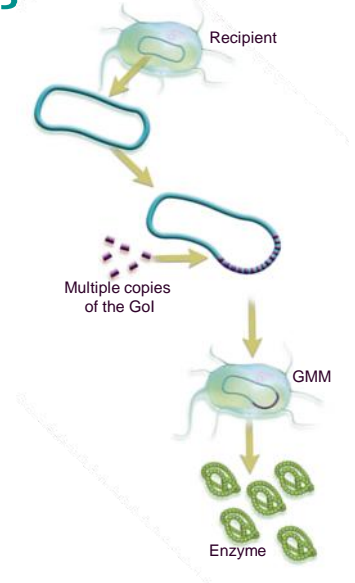
Melhoria no rendimento e pureza da enzima

Disponibiliza uma ampla diversidade de enzimas encontradas na Natureza

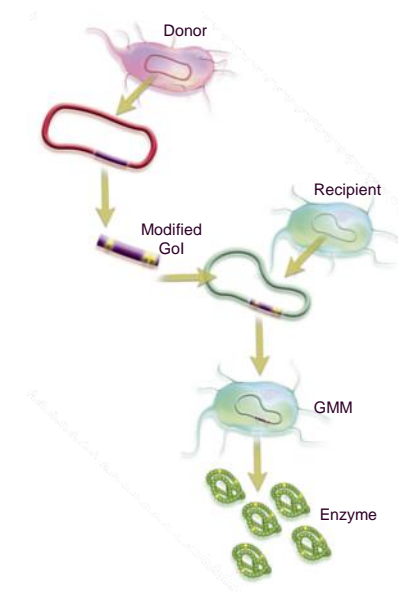


# Desenvolvimento da cepa de produção, cont.

Uma **auto clonagem de MGM** é um caso especial de MGM, onde o gene de interesse é multiplicado e reinsertido no mesmo organismo.



Uma enzima de um MGM pode ser melhorada pelo processo de **Proteína engenheirada**. Neste caso, o gene de interesse é modificada para alterar ligeiramente a enzima expressa, resultando em propriedades melhoradas.



# Conteúdo

## Características das enzimas e produção

- Enzimas utilizadas como coadjuvantes de tecnologia em produção de alimentos
- Como e por que MGM são utilizados na produção de enzimas?

## Requisitos para conformidade de segurança e regulatória

- Requisitos regulatórios e implementação
- Pacote de documentação de segurança
- RDC54/2014 Relatório Técnico-Científico para avaliação de segurança de enzimas

## Pacote de documentação para enzimas grau alimentício

- O caso da Lipase – benefícios do uso da enzima
- Características da enzima
- Exposição estimada
- Construção e produção da cepa
- Estudos de segurança e Margem de segurança

## Tendências e desafios

## Resumo



# Requisitos legais para alimentos – uma visão geral

## Legislação geral de alimentos

- Substância segura e adequada
- Não induzir em erro o consumidor

## Coadjuvante de tecnologia

- Nenhuma função tecnológica no produto final

## Padrões específicos de alimentos

- Detalhes do processo
- Lista positiva de ingredientes



# Requisitos legais podem ser divididos em 3 categorias

Requisitos gerais de segurança de alimentos atendido

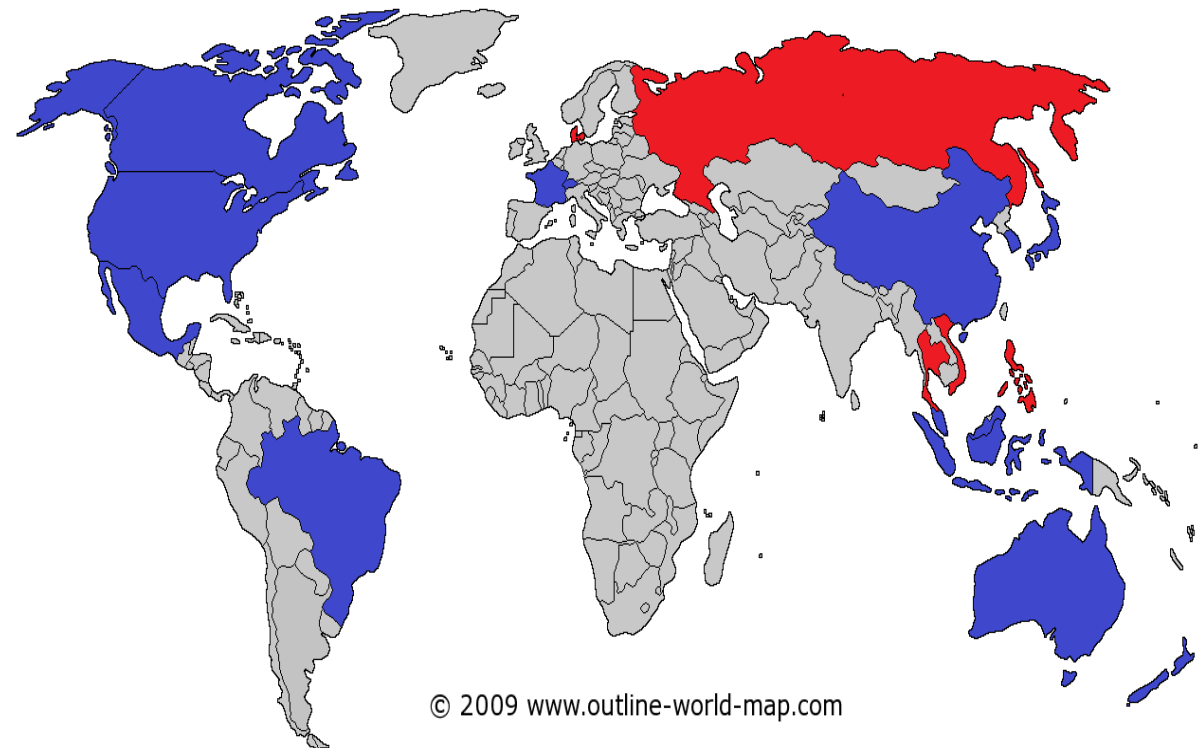
✓ Não há restrições para o uso de enzimas

■ Lista positiva(+/-)

✓ Enzima/microrganismo

■ Aprovação por produto (registro)

✓ Aprovação comercial por produto



# Pacote de documentação de segurança, alimentos

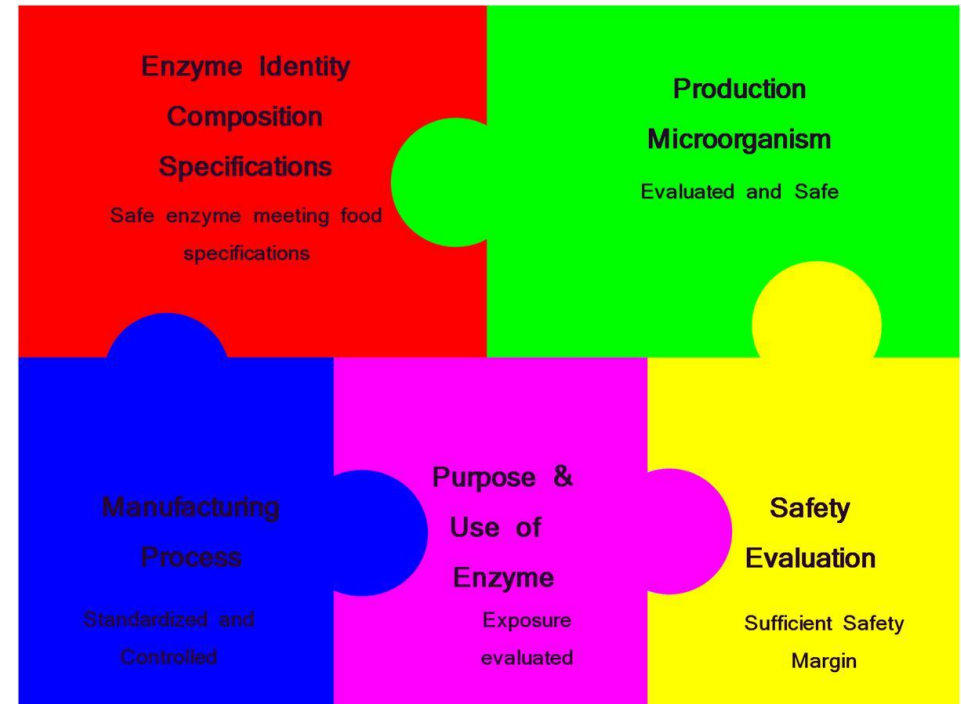
Documentação de segurança constitui a base para o cumprimento regulamentar para utilização de enzimas na aplicação em alimentos

As diretrizes do Comitê Científico de Alimentos (SCF) abrange:

- Produção do microrganismo
- Processo de produção
- Identidade da enzima, composição e especificações
- Propósito e uso das Enzimas
- Avaliação de segurança



**Reports of the Scientific Committee  
for Food**  
*(Twenty-seventh series)*  
Guidelines for the presentation of data on food enzymes  
*(Opinion expressed on 11 April 1991)*



# Requisitos do SFC versus RDC 54/2014



<b>RDC54/2014</b> <b>Information needed in the technical scientific report for the assessment of the safety of enzymes</b>	<b>SCF Guidelines</b> <b>Guidelines for the presentation of data on food enzymes, cf. Reports of the Scientific Committee of Food, 27th Series, EUR 14181, 1992</b>
<b>1. ADMINISTRATIVE DATA</b> 1.1. Business name and full address of the manufacturer or importer; 1.2. Effective permit or sanitary license; 1.3. Identification of the technician in charge and/or legal representative; 1.4. Details of the application's subject (enzyme inclusion/exclusion, change in the method or source, etc.).	ADMINISTRATIVE DATA
<b>2. IDENTIFICATION OF THE ENZYME AND OF THE ENZYME PREPARATION</b> 2.1. Common name of the enzyme and/or of the enzyme preparation; 2.2. Commercial brand enzyme and/or of the enzyme preparation; 2.3. Classification of the enzyme as per the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB (number and name); 2.4. Number of the enzyme in the Chemical Abstract Service - CAS; 2.5. Other names of the enzyme (if applicable); 2.6. Form of the presentation of the enzyme preparation; 2.7. Formulation of the enzyme preparation, including food additives and vehicles (g/100g or 100ml).	<b>TECHNICAL DATA</b> 1. Active components 1.1. Primary enzyme activity 1.2. The activity of the enzyme preparation 1.3. Subsidiary enzymatic activities  4. Carrier and other additives and ingredients 4.1. Formulation - Ingredients and additives 4.2. Immobilized enzyme preparation 4.3. TOS and composition

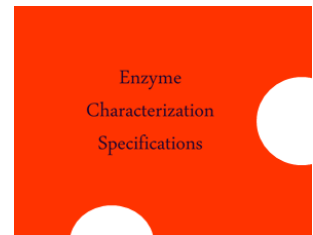




# Requisitos do SFC versus RDC 54/2014, cont.



<b>RDC54/2014</b>  <b>Information needed in the technical scientific report for the assessment of the safety of enzymes</b>	<b>SCF Guidelines</b>  <b>Guidelines for the presentation of data on food enzymes, cf. Reports of the Scientific Committee of Food, 27th Series, EUR 14181, 1992</b>
<p>3. CHEMICAL COMPOSITION AND PROPERTIES OF THE ENZYME AND OF THE ENZYME PREPARATION</p> <p>3.1. Molecular mass and amino acid sequence of the enzyme;</p> <p>3.2. Purity and identity specifications of the enzyme preparation to:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Lead;</li> <li>b. Salmonella;</li> <li>c. Total coliform;</li> <li>d. Escherichia coli;</li> <li>e. Antimicrobial activity;</li> <li>f. Eventual residual of extraction solvents;</li> <li>g. Warranty levels of the enzyme, including information on variations batch by batch;</li> <li>h. Percent of total organic solid per unit of weight (% T.O.S.);</li> <li>i. Units of enzyme activity per unit of weight; and</li> <li>j. Other relevant parameters.</li> </ul> <p>3.3. Reports of lab analysis, identifying the analytical methodology that evidence the compliance with the specification in the item 3.2;</p> <p>3.4. Enzyme activity, substrates and reaction products, co-factors necessary for the main activity of the enzyme, optimal pH and temperature, inhibiting factors, and activators;</p> <p>3.5. Characterization of possible adverse effects related to the enzyme activity and eventual formations of toxic metabolites, if proper;</p> <p>3.6. Allergenicity data;</p> <p>3.7. Storage stability data prior to use.</p>	<p>GENERAL REQUIREMENTS AND SPECIFICATIONS</p> <p>4. Carrier and other additives and ingredients</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>4.1. Formulation - Ingredients and additives</li> <li>4.2. Immobilized enzyme preparation</li> <li>4.3. TOS and composition</li> </ul> <p>7. Hygiene</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>7.1. Good Manufacturing Practice (GMP)</li> <li>7.2. Influence on total microbial count in final foodstuff</li> </ul> <p>8. Purity specifications/absence of contaminants</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>8.1. Heavy metals</li> <li>8.2. Microbiological contaminants</li> <li>8.3. Production organism</li> <li>8.4. Antibiotic activity</li> <li>8.5. Toxins</li> </ul>



# Requisitos do SFC versus RDC 54/2014, cont.



<b>RDC54/2014</b> <b>Information needed in the technical scientific report for the assessment of the safety of enzymes</b>	<b>SCF Guidelines</b> <b>Guidelines for the presentation of data on food enzymes, cf. Reports of the Scientific Committee of Food, 27th Series, EUR 14181, 1992</b>
4. LABEL TEMPLATE	
5. PURPOSE OF USE 5.1. Technological purpose and mechanism of action of the enzyme in food; 5.2. Proposed use (food in which the enzyme preparation will be used and use limitations).	5. Usage 5.1. Technological function 5.2. Types of foodstuffs 5.3. Maximum dosage of the enzyme preparation  6. Stability and fate in the food 6.1. Amount of enzyme in the final food preparation 6.2. Main reaction products 6.3. Possible effects on nutrients <div data-bbox="2084 1011 2346 1236" style="text-align: right; margin-top: 20px;"> </div>

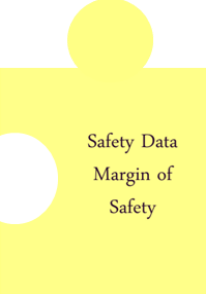
# Requisitos do SFC versus RDC 54/2014, cont.



<b>RDC54/2014</b>  <b>Information needed in the technical scientific report for the assessment of the safety of enzymes</b>	<b>SCF Guidelines</b>  <b>Guidelines for the presentation of data on food enzymes, cf. Reports of the Scientific Committee of Food, 27th Series, EUR 14181, 1992</b>
<p>6. PRODUCTION SOURCE AND PROCESSES</p> <p>6.1. PRODUCTION FROM ANIMAL SOURCES</p> <p>6.2. PRODUCTION FROM PLANTS SOURCES AND BASIDIOMYCETES</p> <p>6.3. PRODUCTION FROM MICROORGANISMS (in the instances of genetically modified microorganisms the data must be from the donor and the expression microorganism)</p> <p>6.3.1. Taxonomy identification;</p> <p>6.3.2. Identification of the strain and storage place. If there is none, justify;</p> <p>6.3.3. Identification of the group and class of risk, with respective references;</p> <p>6.3.4. History of safe use;</p> <p>6.3.5. Data and stability studies of the genetically modified microorganisms strain (production strain);</p> <p>6.3.6. Detailed description of the production process and quality controls used;</p> <p>6.3.7. Pathogenicity and toxigenicity;</p> <p>6.3.8. Microbial resistance data;</p> <p>6.3.9. For genetically modified microorganisms:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Microbial resistance data and identification of the antibiotic for which eventual resistance markers were used;</li> <li>Description of genetic modification, including the characterization of the DNA introduced and the method of integration of the recombinant DNA to the chromosome;</li> <li>Data on eventual toxins and other unsafe metabolite synthesized as a result of the modification;</li> <li>Documentation that evidences the purification of the enzyme so it does not have the microorganism or traces of its recombinant genetic material.</li> </ol>	<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 20px;"> <div style="margin-right: 10px;">2.</div> <div> <p>Source materials</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1. Animal sources</li> <li>2.2. Plant sources</li> <li>2.3. Microbial sources</li> <li>2.4. Genetically modified organisms</li> </ol> </div> </div> <div style="margin-bottom: 20px;"> </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">3.</div> <div> <p>Manufacturing Process</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3.1. Fermentation</li> <li>3.2. Purification</li> </ol> </div> </div> <div> </div> </div>

# Requisitos do SFC versus RDC 54/2014, cont.



<b>RDC54/2014</b> <b>Information needed in the technical scientific report for the assessment of the safety of enzymes</b>	<b>SCF Guidelines</b> <b>Guidelines for the presentation of data on food enzymes, cf. Reports of the Scientific Committee of Food, 27th Series, EUR 14181, 1992</b>
<p>7. DATA FOR RISK ASSESSMENT (The presentation of toxicology studies might be excused upon justification for individual assessment).</p> <p>7.1. Mutagenicity and genotoxicity studies carried out in accordance with the Good Laboratory Practices and with the parameters established by the Organization for Economic Development Cooperation (OECD -Guidelines for the Testing of Chemicals);</p> <p>7.2. Oral sub chronic studies that allow the derivation of a NOEL (No Observed Effect Level) or NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), carried out in accordance with Good Laboratory Practices and with the parameters set forth by the Organization for Economic Development Cooperation (OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals);</p> <p>7.3. Evaluation of food exposure, with justification for the choice of the method used;</p> <p>7.4. Characterization of the risk (margin of exposure or percentage of acceptable daily ingestion – IDA)</p>	<p>DOCUMENTATION FOR SAFETY IN USE</p> <p>9. Basic toxicological requirements</p> <p>9.1. Enzymes derived from edible animals or plants</p> <p>9.2. Enzymes derived from micro-organisms</p> <p>10. Exemptions from the basic toxicological requirements if relevant</p> <p>EVALUATION OF SAFETY IN USE</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimate of human consumption</li> <li>• Safety margin</li> </ul> 
<p>8. APPROVAL IN OTHER COUNTRIES OR INTERNATIONAL ENTITIES.</p> <p>8.1. Data of approval in other countries and/or international entities, if available.</p>	



# Conteúdo

## Características das enzimas e produção

- Enzimas utilizadas como coadjuvantes de tecnologia em produção de alimentos
- Como e por que MGM são utilizados na produção de enzimas?

## Requisitos para conformidade de segurança e regulatória

- Requisitos regulatórios e implementação
- Pacote de documentação de segurança
- RDC54/2014 Relatório Técnico-Científico para avaliação de segurança de enzimas

## Pacote de documentação para enzimas grau alimentício

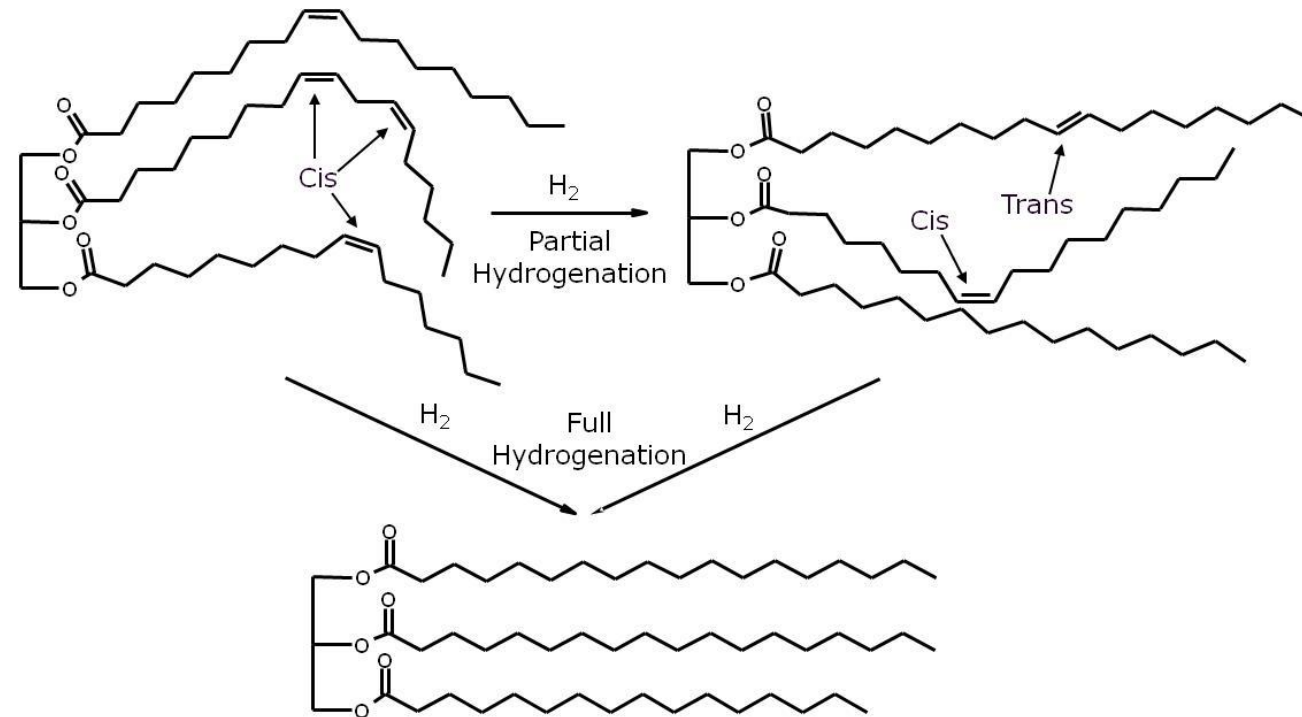
- O caso da Lipase – benefícios do uso da enzima
- Características da enzima
- Exposição estimada
- Construção e produção da cepa
- Estudos de segurança e Margem de segurança

## Tendências e desafios

## Resumo

# Eliminação de gordura trans

- As gorduras trans não são metabolizadas e normalmente são relacionadas a doenças do coração
- Produzido quando óleos vegetais são modificados por hidrogenação



- A hidrogenação é banida ou regulamentada em alimentos em muitos países

# Interesterificação em óleos e gorduras - como alternativa à hidrogenação

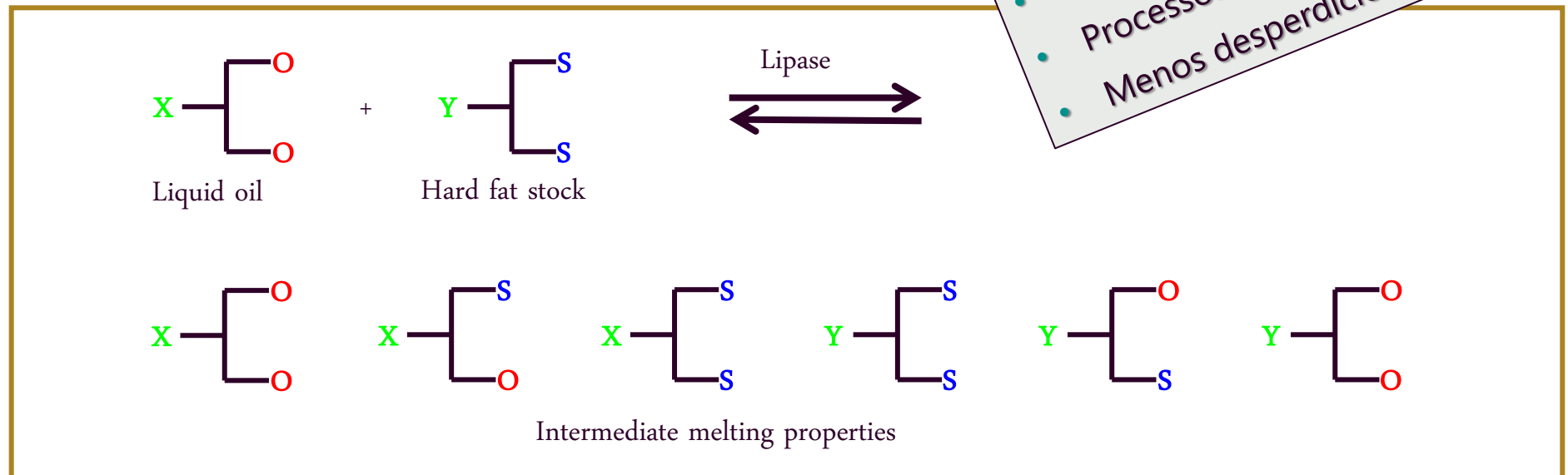
O rearranjo dos ácidos graxos em gorduras e óleo líquido

Químicos

- Condições de reação duras - necessidade de etapas de purificação extensas
- Interesterificação aleatória

Enzimático

- 1,3 Interesterificação específica usando lipase



# Identidade da enzima, composição e especificações



## Enzyme Identity

## Composition

## Specifications

Safe enzyme meeting food specifications

## Identificação da enzima

- Classificação: Lipase
- IUB No.: 3.1.1.3
- CAS No.: 9001-62-1

## Formulação

- Ingredientes grau alimentício e aditivos aprovados
  - Atividade Lipase, 100 KLU/g
  - Enzima TOS\*, 2 %
  - Propileno glicol, 25 %
  - Água, 73 %

\*TOS: Enzyme dry matter = 100 – (diluent, water, ash)

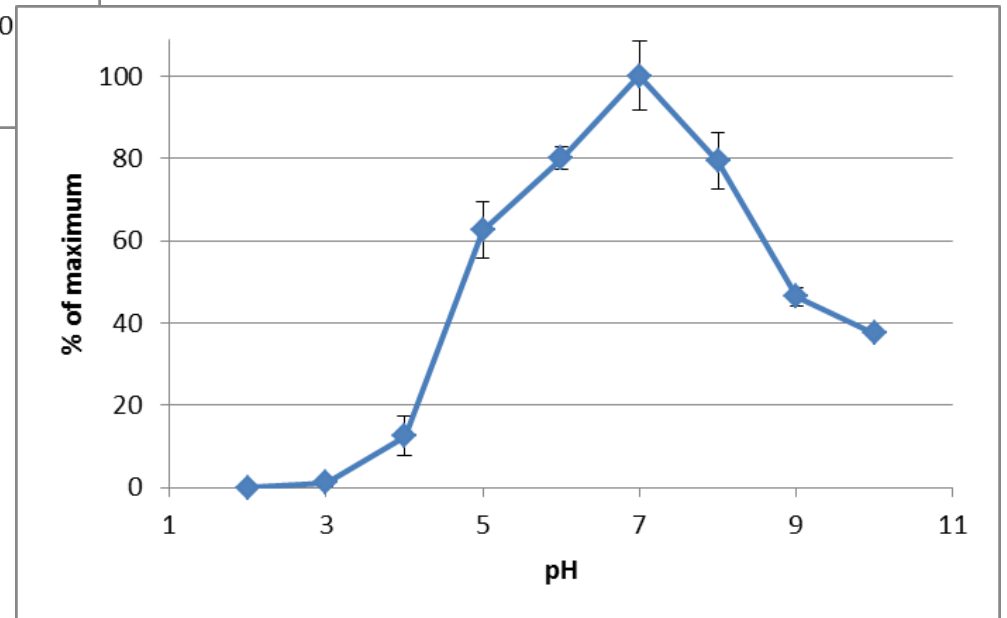
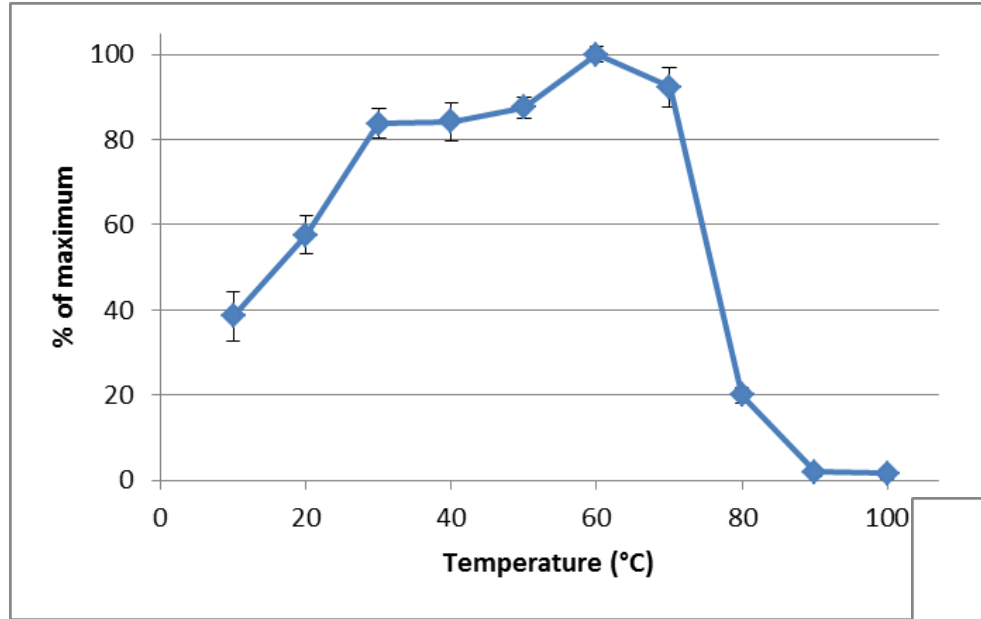
## Especificações de pureza

- Food Chemicals Codex (FCC)
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)

Chumbo:	< 5 mg/kg
Salmonella sp.:	Ausência 25 g de amostra
Coliformos Totais:	Não mais que 30/g
Escherichia coli:	Ausência 25 g de amostra
Antimicrobial act.:	Não detectado
Micotoxinas:	Não detectado



# Lipase – temperatura/pH atividade



# Avaliação de alergenicidade

## Investigation on possible allergenicity of 19 different commercial enzymes used in the food industry

Carsten Bindslev-Jensen <sup>a,\*</sup>, Per Stahl Skov <sup>b</sup>, Erwin L. Roggen <sup>c</sup>,  
Peter Hvass <sup>c</sup>, Ditte Sidelmann Brinch <sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Department of Dermatology and Allergy Center, Odense University Hospital, DK 5000 Odense C, Denmark*

<sup>b</sup> *RefLab, National University Hospital, Tagensvej 20, Dep. 7512, 2200 Copenhagen N, Denmark*

<sup>c</sup> *Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK 2880 Bagsvaerd, Denmark*

Received 28 October 2005; accepted 9 June 2006

Food and Chemical Toxicology 44 (2006) 1909–1915

### Abstract

The aim of the study was to investigate the safety to allergic patients of 19 commercially available and authority-approved enzymes used in the food industry. Enzymes produced by genetically modified organisms were included. Four hundred consecutive adult patients with a diagnosed allergy to inhalation allergens, food allergens, bee or wasp were included. All had at least one positive skin prick test to the above allergens.

Skin prick testing with the 19 enzymes was performed on the forearm and if positive (in 13 patients), in vitro histamine release from blood basophils were performed. Patients with positive results in skin prick test were subsequently reinvestigated with further purified enzymes and finally challenged orally with the enzymes in a double-blind, placebo-controlled protocol. Only one reaction to a placebo challenge was seen.

In some instances a positive skin prick test result or a positive histamine release was seen elicited by the enzymes, but since none of the patients were positive to any of the commercial enzymes in the subsequent oral challenges using exaggerated dosages of the enzymes compared to normal daily intake, the findings are without clinical relevance.

A wide variety of enzyme classes and origins was included in the study. Because there were no allergenic findings of clinical relevance it is concluded that ingestion of food enzymes in general is not considered to be a concern with regard to food allergy.



# Avaliação de alergenicidade

## Considerações gerais

A ingestão da proteína enzimática não traz preocupação com alergia alimentar:

- Histórico longo de uso seguro de enzimas
- Grande variedade de classes de enzimas presentes em diversos alimentos
- A exposição enzimática é tipicamente baixa:
  - As enzimas são utilizadas como coadjuvantes de tecnologia em baixa quantidade
  - As enzimas são tipicamente desnaturadas e/ou removidas durante o processamento do alimento
  - Enzimática residual será facilmente digerido no sistema gastro-intestinal

## Pesquisa de homologia

Busca de sequência homóloga para alergênicos em alimentos em banco de dados:

- Sem combinações > 35% de identidade de aminoácidos em uma janela de 80 aminoácidos



# Propósito e uso da enzima

## Tipo de alimento

- Alimento processado
  - Óleos e gorduras processadas
  - Produtos de panificação

## Dosagem do produto enzimático

- Até 200 KLU por kg alimento processado, correspondendo a 2g de enzima comercial por kg de alimento processado ou 40 mg TOS/kg alimento processado

## Consumo

- Método Budget\* usado para estimativa de consumo humano porque a enzima pode ser utilizada para uma variedade de aplicações em alimentos.
- De acordo com o método Budget, o consumo máximo de energia ao longo de uma vida é de 50 kcal/kg de peso corporal/dia ~ 25 g de alimento/kg de peso corporal/ dia
- Alimentos processados é de 50% da ingestão de alimentos ~ 12,5 g/kg de peso corporal / dia



## Purpose & Use of Enzyme

Exposure evaluated

## Exposição

- Ingestão diária estimada =  $40 \times 0.0125 = 0.5$  mg TOS/kg peso corporal/dia

\* ILSI (1997) Uma avaliação do método Budget para o rastreamento de consumo de aditivos alimentares. Relatório de síntese elaborado sob a responsabilidade da ILSI Europe Food Chemical Intake Task Force, 1-12

# Produção do Microrganismo

*Aspergillus oryzae* expressando o gene para lipase de *Thermomyces lanuginosus*



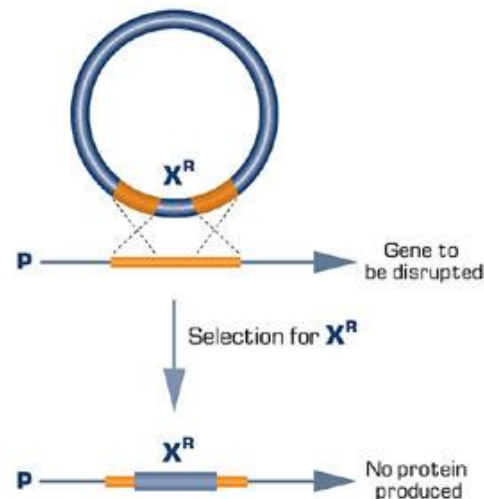
Taxonomia (*Genus species*) da cepa hospedeira

- Histórico de uso seguro
- Não patogênico e não toxigênico



## Modificações genéticas do hospedeiro

- Metabólicos
- Não há atividades colaterais indesejadas

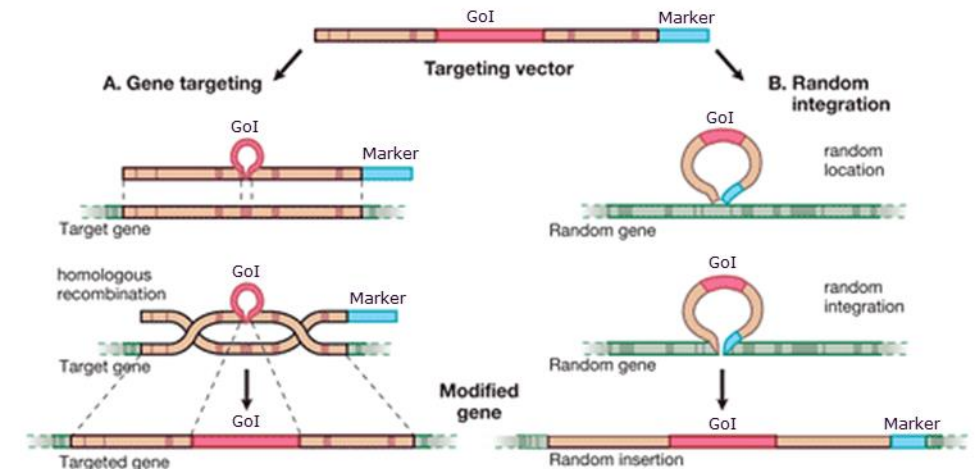


A. oryzae (A 1560)	wild type strain
A. oryzae (JaL 228)	alp-, amy-, Npl-
A. oryzae (BECh 2)	alp-, amy-, Npl-, CPA-, KA deficient
Gene deletions:	Gene mutation:
Alp- : alkaline protease	KA- : Kojic acid
Amy- : alpha-amylase	
Npl- : neutral metallo protease I	
CPA- : Cycloplazonic acid	

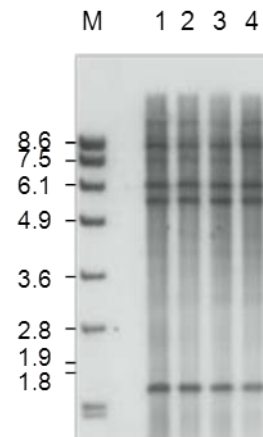
# Produção do microrganismo, cont

## DNA introduzido

- Doador do gene de lipase não patogênico e não toxigênico
- Plasmídeos amplamente conhecidos
- Expressão da enzima
- Marcador selecionável



## Estabilidade da cepa



## Cepa de linhagem segura

- Segurança repetidamente demonstrado por estudos sobre estirpes semelhantes

# Cepa de produção – Linhagem Segura<sup>1</sup>



Products derived from <i>A. oryzae</i> strains	IUB no	Host strain	Donor strain	Safety studies <sup>2</sup>
Triacylglycerol lipase (GRN No. 43)	3.1.1.3	<i>Aspergillus oryzae</i> (A 1560)	<i>Humicola</i> (now <i>Thermomyces</i> ) <i>lanuginosa</i>	Yes (published)
Mucorpepsin (GRN No. 34)	3.4.23.23	<i>Aspergillus oryzae</i> (A 1560)	<i>Rhizomucor miehei</i>	Yes
Triacylglycerol lipase (GRASP 7G0323)	3.1.1.3	<i>Aspergillus oryzae</i> (A 1560)	<i>Rhizomucor miehei</i>	Yes (published)
Triacylglycerol lipase (GRN No. 75)	3.1.1.3	<i>Aspergillus oryzae</i> (JaL 228)	<i>Fusarium oxysporum</i>	Yes
6-phytase	3.1.1.26	<i>Aspergillus oryzae</i> (JaL 228)	<i>Peniophora lycii</i>	Yes
Xylanase	3.2.1.8	<i>Aspergillus oryzae</i> (BECh2)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Yes
Glucose oxidase (GRN No. 106)	1.1.3.4	<i>Aspergillus oryzae</i> (BECh2)	<i>Aspergillus niger</i>	Yes
Triacylglycerol lipase (GRN No. 103)	3.1.1.3	<i>Aspergillus oryzae</i> (BECh2)	<i>Thermomyces lanuginosus</i> / <i>Fusarium oxysporum</i>	Yes
Phospholipase (GRN No. 142)	3.1.1.32	<i>Aspergillus oryzae</i> (BECh2)	<i>Fusarium venenatum</i>	Yes

<sup>1</sup> e.g. Pariza and Johnson, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33, 173-186 (2001), Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century

<sup>2</sup> At least the following: 13 week acute oral toxicity in rats; Ames test; In vitro human lymphocyte cytogenetic assay

# Processo de produção



## Boas Práticas de Produção(GMP)

- Matérias primas e coadjuvantes de tecnologia
  - Grau alimentício ou seguro
- Fermentação de cultura pura

## Sistema de Gestão da Qualidade

- Certificação ISO 9001

## Processo de produção Padronizado\*

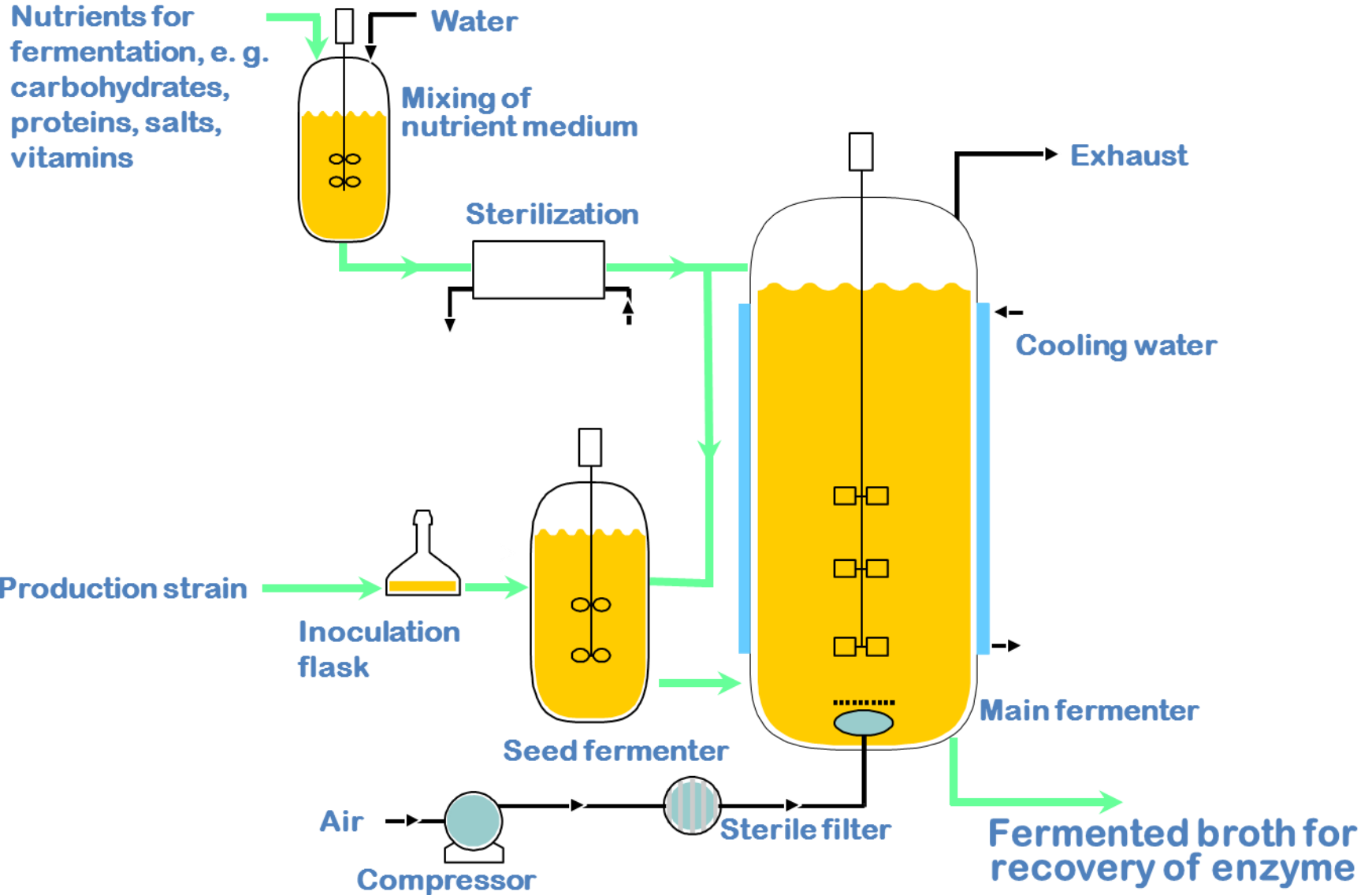
- Fermentação
- Purificação
- Formulação
- Controle de qualidade do produto final



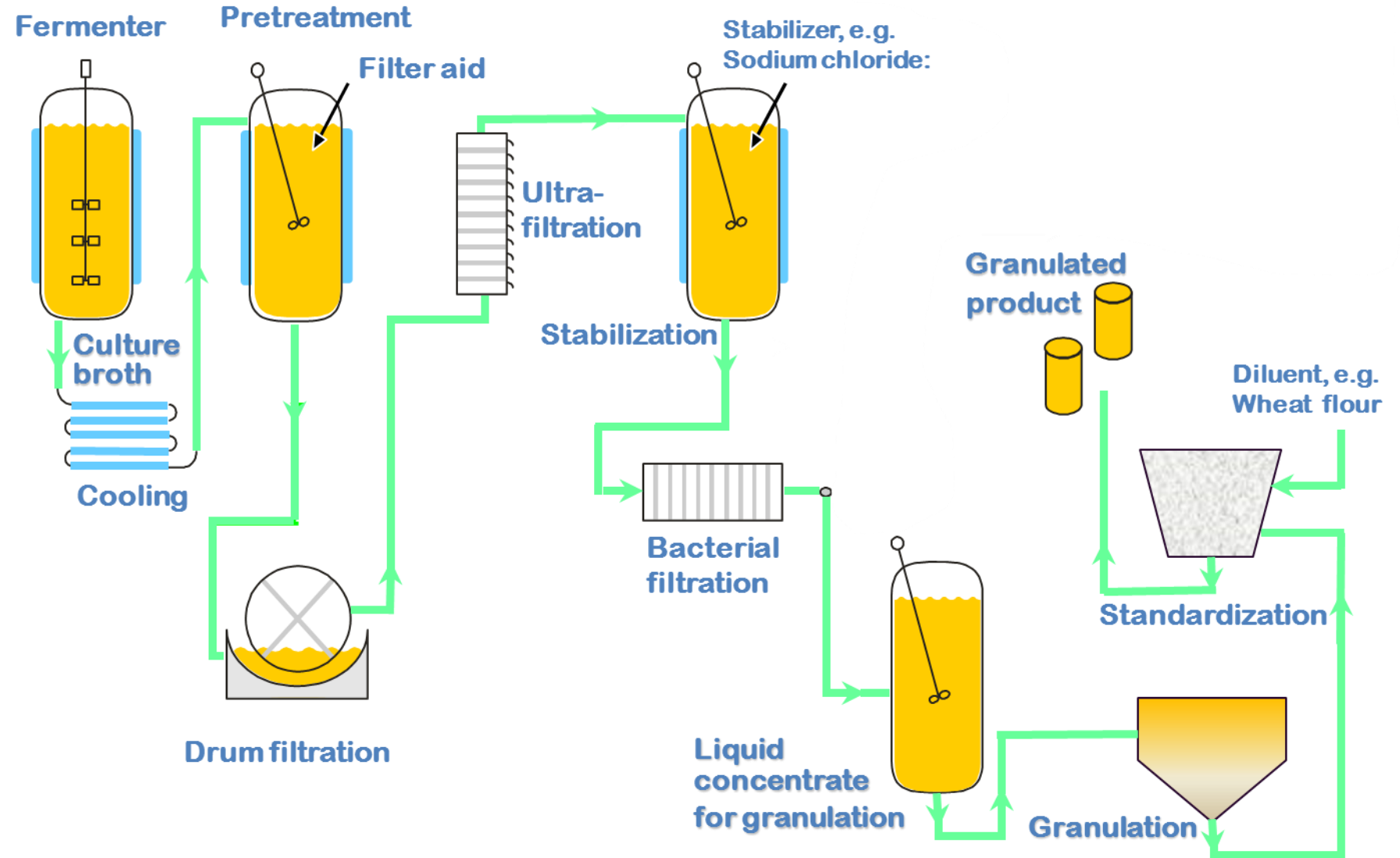
\* Aunstrup, K. et al., 1979, Production, Isolation, and Economics of Extracellular Enzymes in Applied Biochemistry and Bioengineering, Volume 2, Enzyme Technology, Eds. Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E. and Goldstein, L, pp. 28-68.



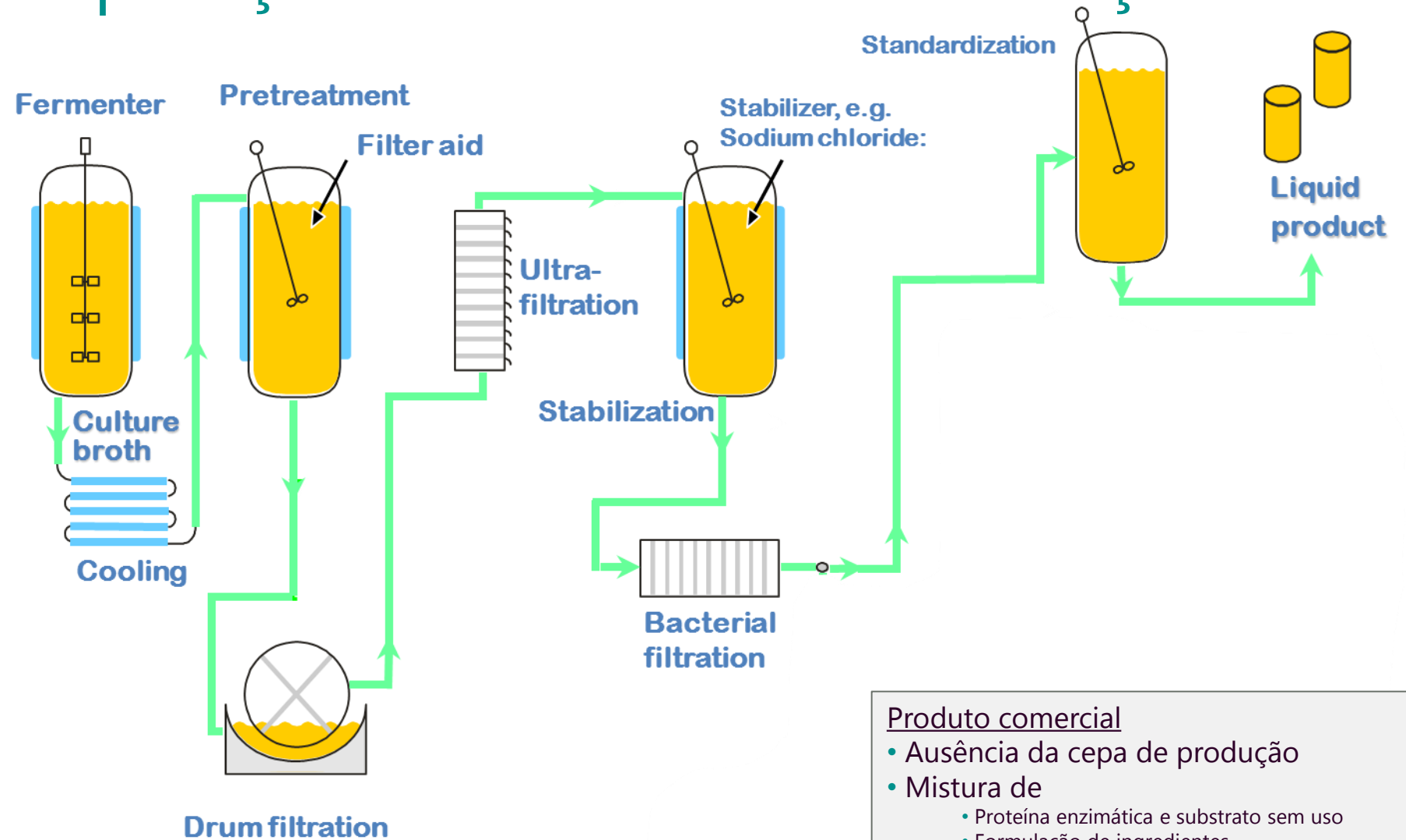
# Produção da Enzima - Fermentação



# Recuperação da enzima e estabilização



# Recuperação da enzima e estabilização



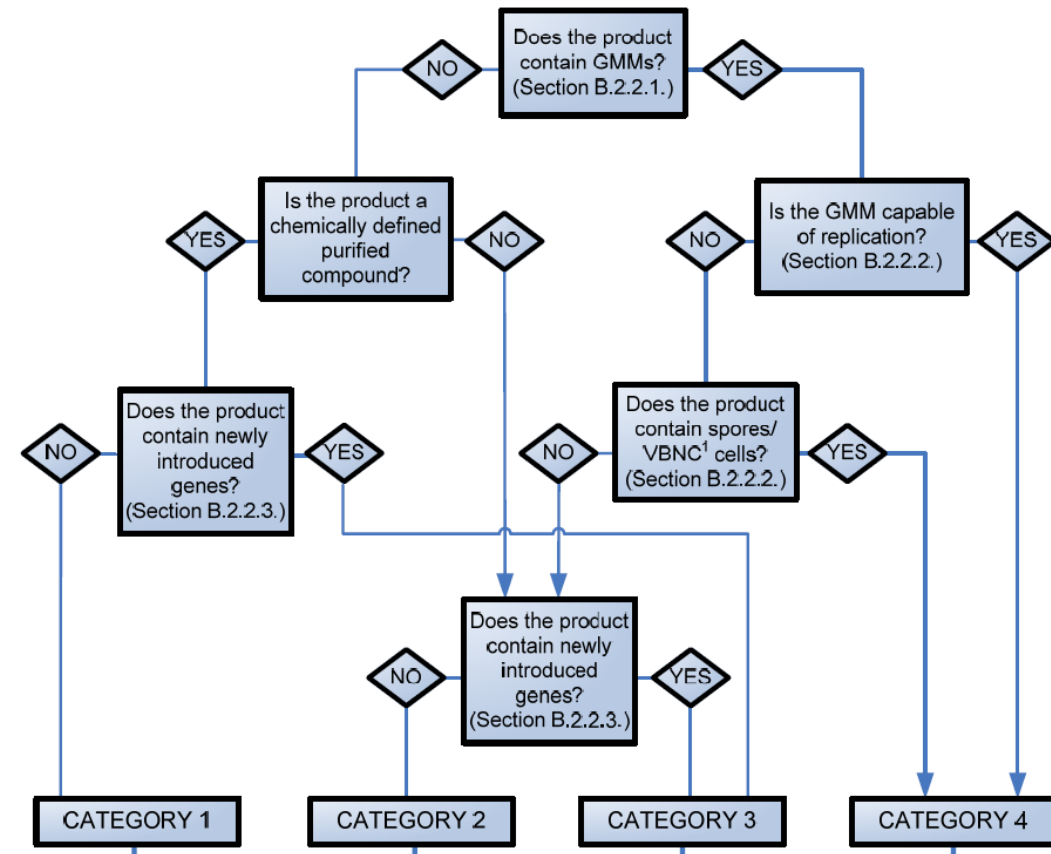
## Produto comercial

- Ausência da cepa de produção
- Mistura de
  - Proteína enzimática e substrato sem uso
  - Formulação de ingredientes

## Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use

**Category 2:** Complex products in which both GMMs and newly introduced genes are no longer present (e.g. cell extracts, most enzyme preparations);

**Figure 1:** Flow diagram showing the approach to the categorisation of GMM and/or their products and associated risk assessment



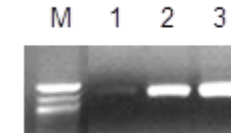
## B.2.2. Informação relacionada ao processo de preparação do produto

### 2.2.3. Information on the possible presence of recombinant DNA

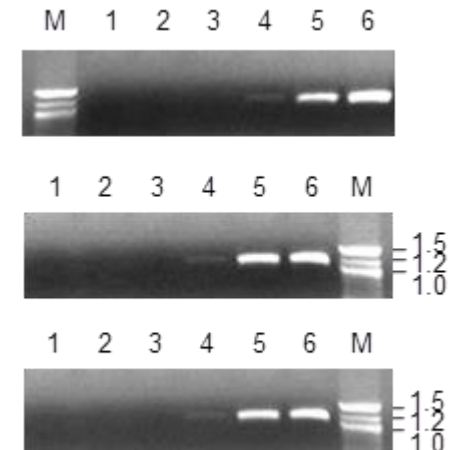
Information on the possible presence of recombinant DNA is required in products belonging to Categories 1, 2 and 3. If recombinant DNA corresponding to full-length coding sequences is found, the likelihood of gene transfer must be assessed (See Section B.4.). All the methods should be documented in detail.

- All DNA present in the product should be extracted. Therefore, a cell lysis step must be included in the protocol to extract DNA from products belonging to Categories 2 or 3. Special attention should be given to the detection of DNA present in microorganisms that are resistant to cell lysis, like those capable of forming spores. To verify the efficacy of the lysis step, intact cells of the GMM must be added in different dilutions before DNA extraction as a positive control.
- Control DNA should be added to the sample in different dilutions until DNA extinction before commencing the DNA extraction process, in order to check the limit of detection of recombinant DNA in the sample.
- The presence of DNA should be assessed using a PCR-based method. The reliability, efficacy and sensitivity of the DNA detection method should be documented. Positive and negative controls must be included to ensure functional PCR and to exclude PCR inhibition. As control DNA, total DNA of the GMM must be used. Should PCR inhibition be encountered when testing the product, samples taken before formulation may be used.
- At least one functional gene has to be targeted. Because DNA degradation can be sequence-dependent, all functional genes, if of concern (e.g. antimicrobial resistance genes, virulence genes, genes encoding toxic compounds), inserted into the GMM should be targeted specifically. The PCR should span the full length of the coding sequences but should not exceed it.
- At least three independent batches of product preparations should be sampled, each analysed in triplicate. A proper sampling method should be chosen and documented (see point 2.2.1).

MGM controle positivo



3 lotes, +/- DNA controle



# Estudos toxicológicos

## Documentation for safety in use

### 9. Basic toxicological requirements

- 9.1 For enzymes derived from edible parts of animals or plants no toxicological tests are normally required. Where parts which are not generally considered as a normal part of the diet are used, some toxicological testing may be required unless other satisfactory documentation for safety in use is provided.
- 9.2 For enzyme preparations derived from microorganisms the following tests are normally required:

- (a) 90-day oral toxicity test in a rodent species;
- (b) Two short-term tests:
  1. a test for gene-mutations in bacteria,
  2. a test for chromosomal aberrations (preferably *in vitro*).

The toxicological tests shall, where possible, be performed on a batch from the final purified fermentation product, before addition of carriers, diluents, etc. They should, as a general rule, be performed in accordance with established guidelines (EC/OECD; see also references <sup>8</sup> and <sup>11</sup>) although, because of the effects exerted at the cellular level by the proteinaceous nature and/or enzymatic activities of certain enzyme preparations, some modifications of the standard test protocols, particularly in the case of *in vitro* tests, may be necessary. Such deviations will be acceptable if accompanied by adequate supporting arguments.

The test system is designed to uncover unspecified toxic reactions and to reveal genotoxic effects. The combined information from the general specifications and this test battery make it possible to evaluate the product for the presence of both specific, well known toxins and unknown toxic compounds.

The toxicological report shall contain satisfactory documentation that the tests have been performed on the material which forms the basis of the commercial product as described in the technological dossier.

## Reports of the Scientific Committee for Food

(Twenty-seventh series)

### Guidelines for the presentation of data on food enzymes

(Opinion expressed on 11 April 1991)



**Safety  
Evaluation**

**Sufficient Safety  
Margin**

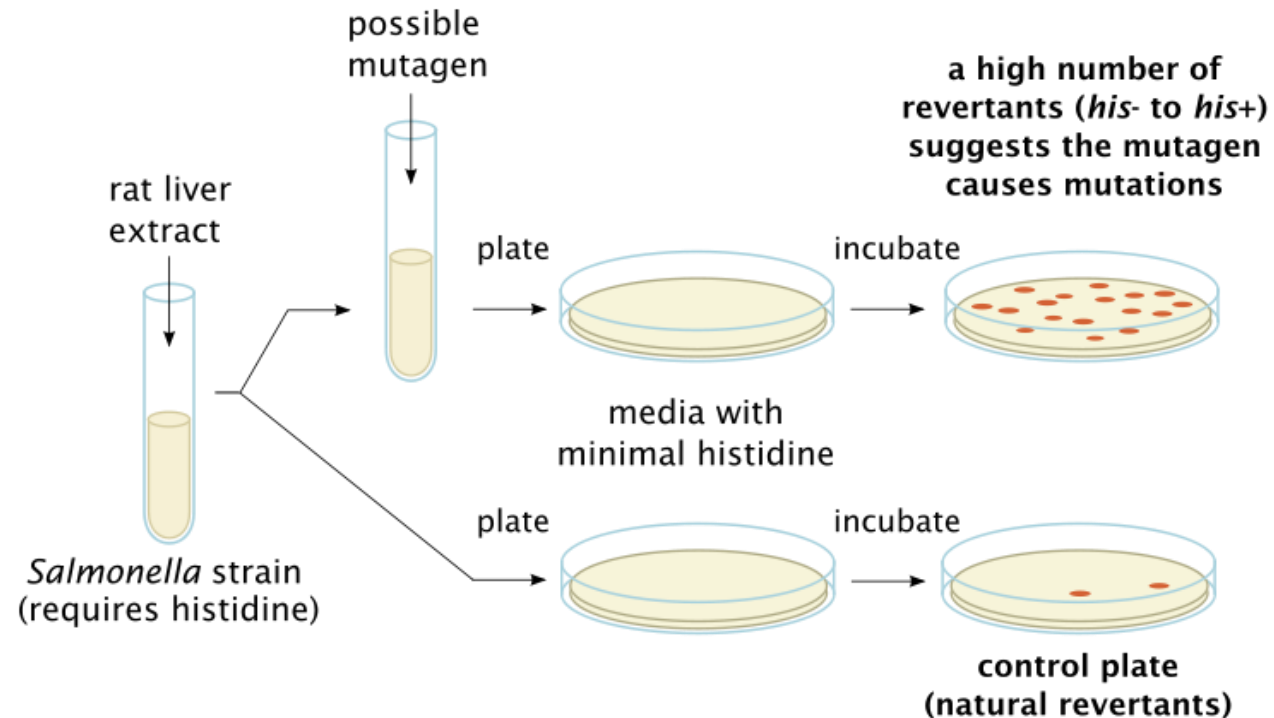
# Ames test – mutações genéticas

5 cepas de bactérias - *Salmonella* og *E. coli*

Requerendo Histidina ou Triptofano

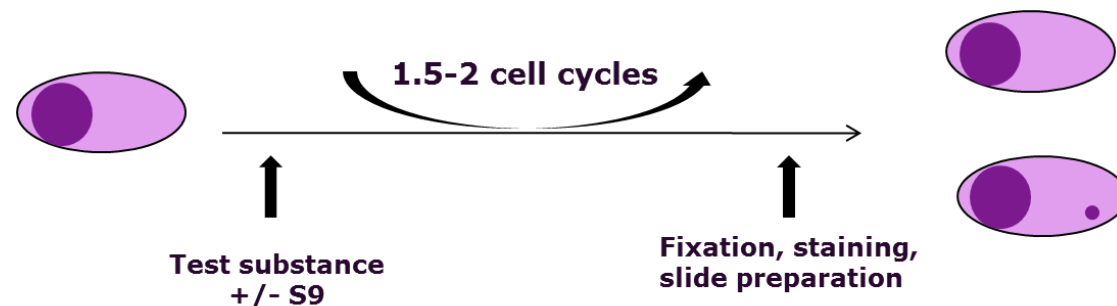
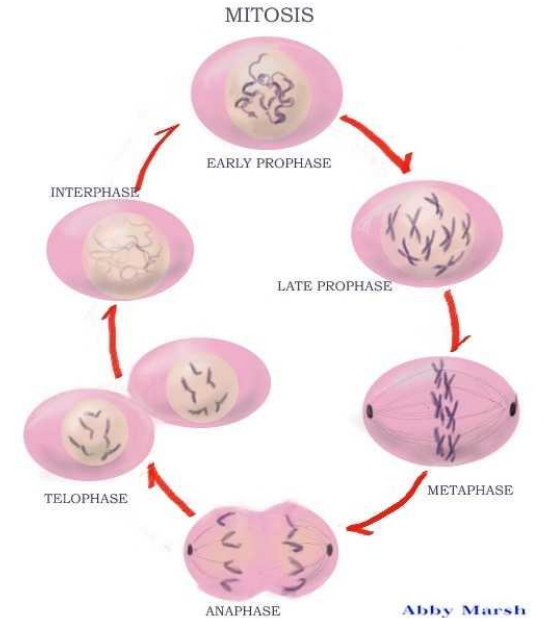
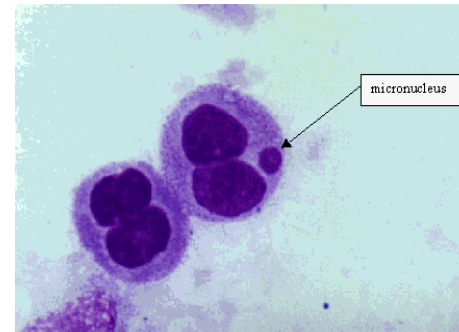
Diferentes tipos de mutações na histidina operon

→ detecção de diferentes tipos de mutagenis



# No testes in vitro de micronúcleo de aberrações cromossômica

- Micronúcleo: Cromossomos inteiros ou fragmentos que não foram integrados na célula filha durante a mitose
- Aparecem como pequenos corpos de coloração escura após a divisão celular



- O número de micronúcleos comparados ao estado do nível de base do nível de lesões cromossômicas e dá a indicação do potencial de dano do cromossoma da substância teste

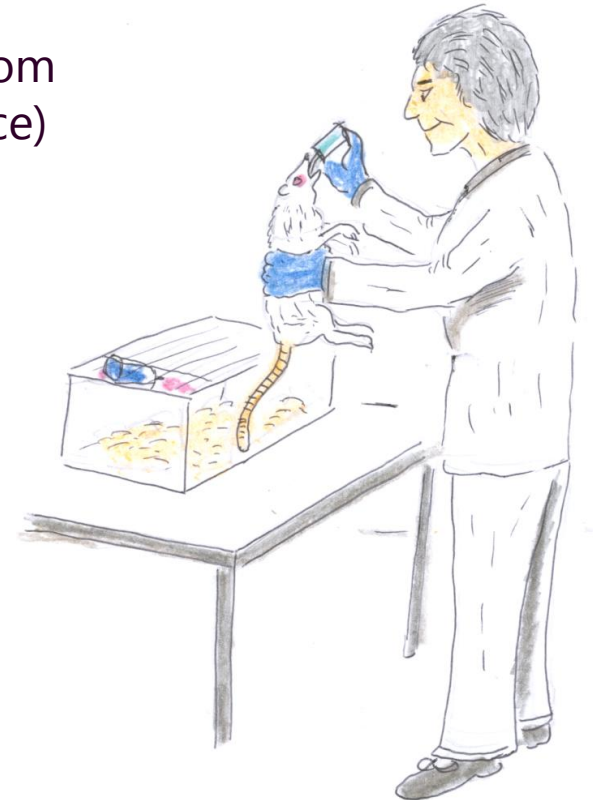


# 13 semanas por via oral em ratos

- Estudo de toxicidade regulatória de acordo com a OECD TG 408\*
- Para alimentos e alimentação animal – realizado de acordo com as Boas Práticas de Laboratório GLP (Good Laboratory Practice)
- 80 ratos (40 machos e 40 fêmeas) – divididos em 4 grupos
- Dose diária por sonda gástrica por 13 semanas
- Concentrações muitas vezes baseadas em DRF prévia (determinação de dose-range) estudo ou experiência, normalmente:

0%	lote teste(água)	Controle
10%	lote teste	Baixa dosagem
33%	lote teste	Média dosagem
100%	lote teste	Alta dosagem

- Dose volume por exemplo 5 ou 10 mL / kg de peso corporal



# 13 semanas por via oral em ratos, cont

## Durante a fase viva

- Observações diárias para sinais clínicos e sinais de doença e de mudança de comportamento
- Pesagem semanal

## Para fins do estudo

- Investigação neurotóxica:
  - Arena padrão
  - Forças de aderência
  - Resposta a estímulos
- Exame dos olhos

## Sacrifício

- Necropsia e órgãos retirados
- Pesado, examinado, fixado para análises posteriores



# 13 semanas por via oral em ratos, cont

- Exame macro e microscópico (histopatológica) de pelo menos 32 órgãos por animal
- Química do sangue e hematologia
- Avaliação de >25.000 dados, coletados durante o estudo
- Comparação com os animais de controle e dados históricos para a mesma cepa e idade de animais
- Resultados e conclusão – pontos finais
  - Máxima tolerância em doses repetidas
  - Sinais clínicos
  - Toxicidade para órgãos alvo
  - No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)



NOAEL é usado para calcular a margem de segurança onde o consumo diário estimado é comparado com o NOAEL



## **Definições:**

Dose: é a quantidade da substância administrada. A dose é expressa em peso (g ou mg) ou como peso da substância teste por unidade de peso do animal teste (ex. m/kg), ou uma concentração constante da dieta (ppm)

Dosagem: é um termo geral de uma dose composta, sua frequência e duração.

NOAEL: é a abreviação para nível de efeito-adverso-não-observado e é a mais alta dose onde não são observados efeitos adversos do tratamento.

# AMFEP - Levantamento de estudos de toxicidade realizados em enzimas alimentícias



## Biological origin

163 strain lineages were compiled, among which:

83 of GM origin  
80 non-GM

68 *Aspergillus*  
44 *niger (aculeatus)*  
23 *oryzae*

35 *Bacillus*  
15 *licheniformis*  
20 *subtilis (amyloliquefaciens)*

22 *Trichoderma*

38 (others genera)

## Toxicity studies and evaluations by expert panels (overall)

Number of studies performed:

169 sub-chronic oral toxicity studies on rodents (90 days)  
217 mutagenicity studies on bacterial cells (*aka* Ames test)  
226 mutagenicity studies on mammal cells

Number of evaluations by official expert panels in the European Union:

18 by the EFSA FEEDAP Panel  
54 by the Danish Fødevarestyrelsen  
87 by the French AFSSA / ANSES

# AMFEP - Levantamento de estudos de toxicidade realizados em enzimas alimentícias, cont



## Sub-chronic oral toxicity studies on rodents (90 days)

### Number of sub-chronic studies - per enzyme class:

- 23 Amylase (alpha)
- 11 Glucanase (beta)
- 12 Lipase
- 20 Protease
- 18 Xylanase
- 85 (others)

### Number of sub-chronic studies - per biological origin:

- 77 *Aspergillus*
  - 44 *niger (aculeatus)*
  - 32 *oryzae*
- 42 *Bacillus*
  - 22 *licheniformis*
  - 20 *subtilis (amyloliquefaciens)*
- 21 *Trichoderma*
- 29 (others)



# AMFEP - Levantamento de estudos de toxicidade realizados em enzimas alimentícias, cont



## Mutagenicity studies on bacterial cells (aka Ames test)

Number of mutagenicity studies on bacterial cells - per enzyme class:

- 30 Amylase (alpha)
- 12 Glucanase (beta)
- 11 Lipase
- 27 Protease
- 20 Xylanase
- 117 (others)

Number of mutagenicity studies on bacterial cells - per biological origin:

- 106 *Aspergillus*
  - 69 *niger (aculeatus)*
  - 36 *oryzae*
- 50 *Bacillus*
  - 23 *licheniformis*
  - 27 *subtilis (amyloliquefaciens)*
- 22 *Trichoderma*
- 39 (others)

## Mutagenicity studies on mammal cells

Number of mutagenicity studies on mammal cells - per enzyme class:

- 31 Amylase (alpha)
- 8 Glucanase (beta)
- 12 Lipase
- 32 Protease
- 23 Xylanase
- 120 (others)

Number of mutagenicity studies on mammal cells - per biological origin:

- 112 *Aspergillus*
  - 69 *niger (aculeatus)*
  - 42 *oryzae*
- 47 *Bacillus*
  - 22 *licheniformis*
  - 25 *subtilis (amyloliquefaciens)*
- 22 *Trichoderma*
- 45 (others)

# Estudos de segurança e Margem de Segurança

## Caracterização do lote teste

- Representativo para o produto comercial

## Ames test

## Ensaio de *in vitro* de micronúcleo

## 13 semanas de estudo de dosagem oral tóxica em ratos

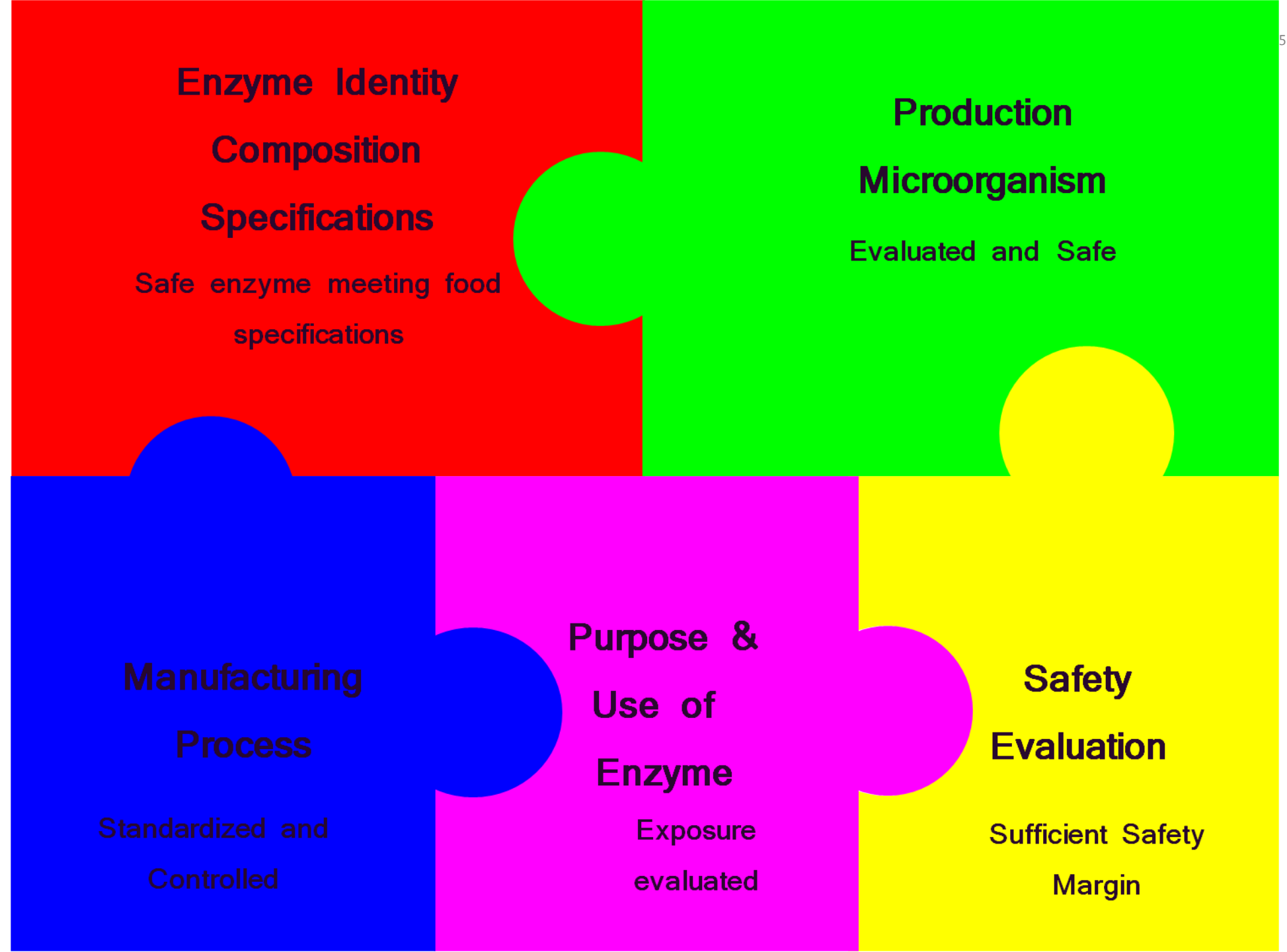
- NOAEL\* - 491 mg TOS/kg/dia

## Margem de segurança

- NOAEL / Exposição = 491/0.5 ~ 980

\* NOAEL – No Observable Adverse Effect Level (efeito-adverso-não-observado)





**Enzyme Identity**

**Composition**

**Specifications**

Safe enzyme meeting food specifications

**Production**

**Microorganism**

Evaluated and Safe

**Manufacturing Process**

**Process**

Standardized and Controlled

**Purpose &**

**Use of**

**Enzyme**

Exposure evaluated

**Safety**

**Evaluation**

Sufficient Safety Margin



# Conclusão

A Enzima expressada pela cepa de produção MGM pode ser usada com segurança para a aplicação pretendida na fabricação de alimentos



# Status regulatório

O produto lipase tem sido positivamente avaliado por um número grande de autoridades regulatórias, resultando em aprovações específicas de produto ou inclusão em relevantes listas positivas nos seguintes países:

<u>País</u>	<u>Ano de aprovação</u>
Australia/Nova Zelândia	1996
Brasil	2000
Canadá	2001
China	1999
Dinamarca	1999
França	2000
Japão	2003
México	2003
Rússia	2007
Coréia do Sul	2005
EUA	2000





# Conteúdo

## Características das enzimas e produção

- Enzimas utilizadas como coadjuvantes de tecnologia em produção de alimentos
- Como e por que MGM são utilizados na produção de enzimas?

## Requisitos para conformidade de segurança e regulatória

- Requisitos regulatórios e implementação
- Pacote de documentação de segurança
- RDC54/2014 Relatório Técnico-Científico para avaliação de segurança de enzimas

## Pacote de documentação para enzimas grau alimentício

- O caso da Lipase – benefícios do uso da enzima
- Características da enzima
- Exposição estimada
- Construção e produção da cepa
- Estudos de segurança e Margem de segurança

## Tendências e desafios

## Resumo

# Tendências e desafios

## Tendências

- A segurança de enzimas alimentícias tem sido bem fundamentada
  - Baixa toxicidade intrínseca
  - Linhagens seguras utilizadas como cepas de produção
  - Aumento da segurança devido à deleções de substâncias não desejadas
- Tempode de desenvolvimento de novas enzimas está constantemente diminuindo -> a inovação pode chegar ao mercado com mais rapidez



## Desafios

- **Industria:** implementar a inovação em escala global
  - Requisitos de autoridades alinhados e proporcionais
  - Processos de aprovação previsíveis
- **Sociedade:** para assegurar o rápido acesso ao benefício vindo da inovação
  - Aprovações rápidas e previsíveis -> um maior reconhecimento mútuo das avaliações de segurança?



## Resumo

- As enzimas são substâncias naturais que podem ser utilizadas para substituir processos químicos
- As enzimas podem levar a processos mais amigáveis ao meio ambiente
  - Especialmente enzimas produzidas por MGM
- As enzimas podem ajudar a fazer produtos mais saudáveis
  - A tecnologia de GM pode ser necessária
- Os princípios das orientações do SCF proveem uma documentação de segurança adequada
  - Liberação interna de segurança na empresa
  - Aprovações nacionais globais
- Sociedade e indústria dividem um interesse em comum em um rápido acesso à inovação