

LEONARDO DE SOUZA LOPES

**OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA COMO
METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS DE
USO RESTRITO EM ESTABELECIMENTOS DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA
QUALIDADE DE PRODUTOS, AMBIENTES E SERVIÇOS
VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

**PPGVS/INCQS
FIOCRUZ/INCQS
2009**

**OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA COMO
METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS DE
USO RESTRITO EM ESTABELECIMENTOS DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

LEONARDO DE SOUZA LOPES

Curso de Especialização em Controle da Qualidade
de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à
Vigilância Sanitária.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Me. Adriana Sant'Ana da Silva

Rio de Janeiro

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Otimização da determinação de atividade enzimática como metodologia para avaliação em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde

Autor: Leonardo de Souza Lopes

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária

Aprovado:

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Filipe Soares Quirino da Silva

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Sônia Ribeiro Doria

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Rosaura de Farias Pesgrave

Orientadora: _____ (INCQS/FIOCRUZ)

Me. Adriana Sant'Ana da Silva

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Leonardo de Souza

Otimização da determinação de atividade enzimática como metodologia para avaliação em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde./ Leonardo de Souza Lopes. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xi, 58 f.; il., tab.

Monografia (Especialização) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009. Orientadora: Me. Adriana Sant'Ana da Silva

1. Vigilância sanitária. 2. Detergentes enzimáticos. 3. Atividade enzimática. 4. Amilase. 5. Lipase. 6. Protase. I. Título.

“Optimization of enzymatic activity determination as a methodology for evaluation of restricted use in enzymatic detergents in health care establishments”.

Agradecimentos

A Deus, segundo sua riqueza e graça, tem suprido todas as minhas necessidades e me presenteado com toda sorte de bênçãos, entre elas a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã, pela compreensão, apoio e estímulo recebidos durante todo o projeto.

A minha esposa Izabela Gimenes, pela companhia e dedicação.

Aos meus avós, familiares e amigos que a todo o momento me incentivaram para a realização deste trabalho.

A minha orientadora Adriana Sant'Ana da Silva, pelas orientações precisas em todos os momentos solicitados. A ela minha admiração e respeito pelo trabalho e atuação no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS.

Aos integrantes do curso de Especialização e toda coordenação da Pós-Graduação do INCQS.

Aos meus amigos Sônia, Paulo Jorge, Cláudio Tadeu, pela cooperação.

*“O que adquire entendimento ama a sua alma;
o que conserva a inteligência acha o bem.”*

Provérbio de Salomão

RESUMO

Saneantes Domissanitários são produtos controlados pela Vigilância Sanitária / ANVISA e utilizados com os mais diferentes objetivos. Alguns desses saneantes são classificados como detergentes e, de acordo com o DECRETO Nº 79.094 de 5 de janeiro de 1977, são aqueles destinados a dissolver gorduras e à higiene de recipientes e vasilhas e à aplicação em ambientes domiciliar, coletivo e público. Para ambientes hospitalares, alguns detergentes são formulados com adição de enzimas que facilitam a remoção de sujidade, pois agem de forma específica, não danificando os materiais constituintes dos equipamentos e instrumentos, são atóxicos, biodegradáveis e de fácil manipulação. As enzimas mais utilizadas são basicamente de três tipos: amilases, proteases e lipases. Para manter a atividade as enzimas necessitam de condições ideais de temperatura e pH, o que torna necessário o controle da qualidade por parte do fabricante e do laboratório do sistema de vigilância sanitária no produto acabado. Atualmente os laboratórios do sistema de vigilância sanitária não possuem metodologias de controle da qualidade de produtos com atividade enzimática. O presente trabalho tem como objetivo verificar as formulações de detergentes enzimáticos disponíveis no mercado e otimizar métodos de análise das atividades amilolítica, proteolítica e lipolítica para atender a demanda da Vigilância Sanitária. As informações dos fabricantes de detergentes enzimáticos não mostraram uniformidade em relação à especificidade e nomenclatura das enzimas. Os métodos apresentaram bons resultados nos parâmetros de linearidade e repetibilidade, contribuindo assim para posterior validação.

Palavras-chaves: vigilância sanitária, controle de qualidade, detergentes enzimáticos, atividade enzimática, amilase, protease, lipase.

ABSTRACT

Sanitary Products Household Cleaning are controlled by surveillance / ANVISA and used with many different goals. Some of these sanitizing classified as detergents, that according to Decree N° 79.094 of 5 January 1977, are those designed to dissolve fat and hygiene of containers and vessels, and the application in home environments, collective and public. In hospital environments, some detergents are formulated with added enzymes which facilitate the removal of dirt and are most effective on organic matter that detergents in that they act in a specific way, not damaging the material composition of the equipment and instruments, are nontoxic, biodegradable and easy manipulation. The enzymes most commonly used are of three types: amylases, proteases and lipases. To maintain the activity of enzymes need to ideal conditions of temperature and pH from manufacturing to product handling, which calls for quality control by the manufacturer and laboratory surveillance system in the finished product. Currently the laboratories of health monitoring system does not have methods for quality control of products with enzymatic activity. This study aims to verify the enzymatic detergent formulations available and optimize methods for analysis of activities amylolytic, proteolytic and lipolytic to meet the demand of the Health Surveillance. The information from the manufacturers of enzymatic detergents showed no uniformity regarding the specificity and nomenclature of enzymes. The methods showed good results in the parameters of linearity and repeatability, thus contributing to further validation.

Keywords: surveillance, quality control, enzymatic detergents, enzymatic activity, amylase, protease, lipase.

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CP	Consulta Pública
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DQ	Departamento de Química
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IUBMB	International Union of Biochemistry And Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
POP	Procedimento Operacional Padronizado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TCA	Ácido tricloro acético
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VISA	Vigilância Sanitária

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais.....	23
Tabela 02: Dados para construção da curva analítica de glicose	29
Tabela 03: Dados para construção da curva analítica de <i>p</i> -nitrofenol	38
Tabela 04: Enzimas presentes em amostras de detergentes enzimáticos	43
Tabela 05: Valores da curva analítica para determinação de atividade amilolítica	44
Tabela 06: Valores da curva analítica para determinação de atividade lipolítica	46
Tabela 07: Parâmetros da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida por Souza & Junqueira	48
Tabela 08: Repetibilidade dos métodos enzimáticos para amilase, protease e lipase	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Efeito da concentração de enzima sobre V_0 em reações catalisadas por enzimas	20
Figura 02: Efeito da concentração de substrato sobre V_0 em reações catalisadas por enzimas.....	20
Figura 03: Representação gráfica da curva analítica de atividade amilolítica contendo a equação da reta e coeficiente de correlação	44
Figura 04: Representação gráfica da curva analítica de atividade lipolítica contendo a equação da reta e coeficiente de correlação	46
Figura 05: Planilha de avaliação de linearidade para atividade amilolítica	49
Figura 06: Planilha de avaliação de linearidade para atividade proteolítica	50
Figura 07: Planilha de avaliação de linearidade para atividade lipolítica	51

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	Abordagem normativa e controle da qualidade de produtos sob regime de vigilância sanitária	12
1.2	Produtos saneantes	13
1.3	Detergentes com ação enzimática	14
1.4	Enzimas	16
1.5	Atividade enzimática	18
1.6	Fatores que influenciam a atividade enzimática	18
1.7	Uso industrial das enzimas	21
2.	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3.	METODOLOGIA	26
3.1	Verificação das formulações de detergentes enzimáticos	26
3.2	Otimização de metodologia analítica para determinação de atividade amilolítica	26
3.3	Otimização de metodologia analítica para determinação de atividade proteolítica	31
3.4	Otimização de metodologia analítica para determinação de atividade lipolítica.....	35
3.5	Análise preliminar estatística das metodologias	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Verificação das formulações de detergentes enzimáticos	42
4.2	Otimização de metodologia analítica para determinação de atividade amilolítica	44
4.3	Otimização de metodologia analítica para determinação de atividade proteolítica	45
4.4	Otimização de metodologia analítica para determinação de atividade lipolítica.....	45
4.5	Análise preliminar estatística das metodologias	47
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 ABORDAGEM NORMATIVA E CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS SOB REGIME DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.

O aumento no crescimento do comércio de mercadorias gerou uma necessidade de regulamentar e controlar a circulação de produtos que pudessem causar danos à saúde. Com o propósito de atender esta e outras necessidades relacionadas à saúde da população foi criado, no ano de 1953, o Ministério da Saúde, órgão federal ao qual incumbe o estudo, a pesquisa e a orientação dos problemas médico-sanitários e a execução de medidas de sua competência que visem à promoção, proteção e recuperação da saúde (SILVA, 2008).

Atualmente o controle de produtos sob regime de vigilância sanitária é feito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelos órgãos de vigilância estaduais e municipais (VISAs), estaduais em conjunto com os laboratórios oficiais, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e os Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos Estados (LACENs), que atuam como fonte geradora de informação capaz de gerar uma ação de vigilância sanitária. A análise realizada por estes laboratórios gera dados capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde (SILVA, 2006).

O INCQS com a missão de contribuir para a promoção, recuperação da saúde e prevenção de doenças desempenha o papel de principal órgão nacional para as questões tecnológicas e normativas relativas ao controle de qualidade de insumos, produtos, ambiente e serviços (BRASIL, 2004).

A vigilância sanitária de produtos está definida como um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo assim, o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo e o

controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

O Setor de Saneantes e Cosméticos do Departamento de Química (DQ) do INCQS vêm realizando ensaios em amostras desde sua formação, que foram enviadas por demanda espontânea ou pela realização de Programa de Monitoramento realizado em parceria com Vigilâncias Municipais, Estaduais e ANVISA.

1.2 PRODUTOS SANEANTES

Os saneantes domissanitários, segundo o DECRETO Nº 79.094 de 05 de Janeiro de 1977, são aqueles destinados a dissolver gorduras e à higiene de recipientes e vasilhas e à aplicação em ambientes domiciliar, coletivo e público. Também estão definidos como: “substâncias ou preparações destinadas à higienização, desinfecção, desinfestação, desodorização, odorização, de ambientes domiciliares, coletivos e/ou públicos, para utilização por qualquer pessoa, para fins domésticos, para aplicação ou manipulação por pessoas ou entidades especializadas, para fins profissionais” (BRASIL, 2001).

O registro de Saneantes Domissanitários é efetuado levando-se em conta a avaliação e o gerenciamento do risco e devendo ser considerados os seguintes itens (BRASIL, 2001d):

- toxicidade das substâncias e suas concentrações no produto;
- finalidade e condições de uso dos produtos;
- ocorrência de problemas antecedentes;
- população provavelmente exposta;
- frequência de exposição e sua duração;
- formas de apresentação.

As considerações referentes a estes itens refletem a importância do uso correto do produto tanto em relação à ação (limpeza, desinfecção de ambiente ou material, esterilização de artigos, etc) quanto à segurança do indivíduo no

manuseio diário com o saneante. Como produto destinado ao uso em estabelecimentos de assistência à saúde é preciso haver eficácia.

Para efeito de registro, os produtos são classificados como de Risco I ou Risco II. Os produtos de Risco I compreendem os saneantes formulados com substâncias que não apresentem efeitos comprovadamente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos em mamíferos e cujo valor de pH, em solução a 1% (p/p) à temperatura de 25°C, seja maior que 2 e menor que 11,5.

Atualmente os produtos de Risco I são notificados junto ao Órgão competente de Vigilância Sanitária e somente podem ser comercializados após publicação em Diário Oficial da União.

Os produtos de Risco II compreendem os saneantes que sejam cáusticos, corrosivos, aqueles com atividade antimicrobiana, os desinfestantes e os produtos biológicos (produtos à base de microrganismo vivo e cultivável nos meios de cultura e nas condições ambientais específicas que têm a propriedade de degradar a matéria orgânica e reduzir odores provenientes de sistemas sépticos, tubulações sanitárias e outros sistemas semelhantes). E o valor de pH, em solução a 1% (p/p) à temperatura de 25°C, deve ser igual ou menor que 2,0 e igual ou maior que 11,5 (BRASIL, 2001).

1.3 DETERGENTES COM AÇÃO ENZIMÁTICA

Alguns detergentes são formulados com adição de enzimas que facilitam a remoção de sujidade e são mais eficientes sobre a matéria orgânica que os detergentes comuns, pois agem de forma específica, não danificando os materiais constituintes dos equipamentos e instrumentos, são atóxicos, biodegradáveis e de fácil manipulação. O uso de detergentes enzimáticos no ambiente hospitalar é uma realidade e fato que vem apresentando contínuo crescimento. Os instrumentais utilizados em diversas especialidades, e que entram em contato com material orgânico crítico do ponto de vista sanitário, como sangue e outros fluidos corporais, necessitam de uma limpeza eficiente antes de sofrer os processos de esterilização (MITIDIÈRE, 2003).

De acordo com a Resolução N° 40 de 05 de Junho de 2 008 os saneantes domissanitários com ação de limpeza estão definidos como:

Sabão: é um produto para lavagem e limpeza doméstica, formulado à base de sais alcalinos de ácidos graxos associados ou não a outros tensoativos.

Detergente: é um produto destinado à limpeza de superfícies e tecidos através da diminuição da tensão superficial.

Detergente enzimático: é aquele que contém como ingrediente ativo os catalisadores biológicos que atuam por degradação específica de graxas, proteínas e outros, fragmentando os mesmos de forma a promover o processo de limpeza.

Fica ainda estabelecido que: “Nos produtos enzimáticos, cujo ativo principal seja os catalisadores biológicos, a atividade enzimática deve ser comprovada”. Entretanto, por falta de metodologia, esta comprovação ainda não é exigida no ato de registro/notificação do produto.

Em 21 de maio de 2009 foi publicada a Consulta Pública (CP) N° 27 em que dispõe sobre o regulamento técnico para produtos detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde e são adotadas as seguintes definições:

Detergente Enzimático: Produto cuja formulação contém como substâncias ativas, além de um tensoativo, uma ou mais enzimas hidrolíticas das subclasses EC 3.1, EC 3.2 e EC 3.4 em sua composição.

Atividade enzimática: Capacidade que a enzima possui em catalisar uma reação.

Enzimas hidrolíticas (EC 3): Enzima capaz de catalisar uma reação de hidrólise.

Enzima Lipolítica (EC 3.1): Enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações ésteres de ácidos graxos.

Enzima Glicolítica (EC 3.2): Enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas.

Enzima Proteolítica (EC 3.4): Enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas.

Substrato: moléculas ou substâncias-alvo as quais a enzima é capaz de catalisar sua hidrólise.

Produtos de Aplicação/Manipulação Profissional: São os produtos que, por sua forma de apresentação, toxicidade ou uso específico, devem ser aplicados ou manipulados exclusivamente por profissional devidamente treinado, capacitado ou por empresa especializada.

Esta CP adota algumas características gerais:

- Os produtos abrangidos são considerados de Risco II e estão sujeitos a Registro na ANVISA.
- Todos os laudos exigidos com finalidade de registro devem ser emitidos por Laboratórios Oficiais.
- Os detergentes enzimáticos devem apresentar composição condizente com a sua finalidade, não podendo conter substâncias que comprometam a atividade das enzimas ou que danifiquem os materiais que entrem em contato com estes produtos.
- Os detergentes enzimáticos não podem conter enzimas que comprometam a saúde da população conforme as normas vigentes.
- O valor de pH do produto puro para os detergentes enzimáticos deve estar entre 6 (seis) e 8 (oito).

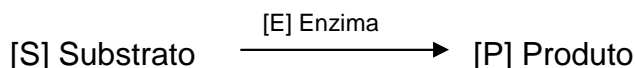
1.4 ENZIMAS

As enzimas são proteínas com a função específica de acelerar reações químicas que ocorrem sob condições termodinâmicas não favoráveis. São substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas devido à complexidade de suas estruturas químicas. São inativadas por temperaturas altas, são solúveis em água e álcool diluído, e quando em solução sofrem precipitação pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético (KIELING, 2002).

As enzimas aceleram consideravelmente a velocidade das reações químicas em sistemas biológicos quando comparadas com as reações correspondentes não catalisadas. Para ser classificada como enzima, uma proteína deve:

- Apresentar extraordinária eficiência catalítica.
- Demonstrar alto grau de especificidade em relação a seus substratos (reagentes) e aos seus produtos.
- Acelerar a velocidade das reações em 10^6 a 10^{12} vezes mais do que as reações correspondentes não-catalisadas.
- Não ser consumida ou alterada ao participar da catálise.
- Não alterar o equilíbrio químico das reações.
- Ter sua atividade regulada geneticamente ou pelas condições metabólicas.

A reação catalisada por enzima pode ser esquematizada como segue:



K_1 = constante de formação do complexo

K_2 = constante de reação

A molécula sobre a qual a enzima atua é o substrato [S] que se transforma em produto [P] da reação, passando pelo complexo enzima-substrato [E . S]. Na ausência de enzima pouco ou nenhum produto é formado, mas em presença da mesma, a reação se processa em alta velocidade.

As enzimas são os catalisadores mais específicos que se conhece, tanto para o substrato como para o tipo de reação efetuada sobre o substrato. A especificidade inerente da enzima reside em uma cavidade ou fenda de ligação do substrato, que está situada em sua superfície (MOTTA, 2009).

1.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As enzimas apresentam capacidade de reagir com determinados compostos, os substratos, formando complexos e este fato é denominado atividade biológica.

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade de reação. Segundo a “ENZYME COMMISSION” da “International Union of Biochemistry And Molecular Biology (IUBMB)”, juntamente com a “International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)”, uma Unidade Internacional (U.I.) de atividade é a quantidade de enzima capaz de catalisar a transformação de um micromol do substrato ou produzir um micromol de produto, por um determinado período de tempo em condições padrões (IUBMB, 2009).

A velocidade das reações enzimáticas varia com fatores diversos como concentração de enzima ou de substrato, temperatura e pH (KIELING, 2002).

1.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

TEMPERATURA

As reações químicas são afetadas pela temperatura. Em reações catalisadas por enzimas, a velocidade é acelerada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima na qual a enzima opera com a máxima eficiência, considerando os outros fatores constantes. Em baixas temperaturas as enzimas encontram-se muito rígidas e quando se atinge um valor consideravelmente elevado a atividade enzimática declina bruscamente porque, como proteína, a enzima se desnatura (MOTTA, 2009).

pH

A concentração de íons hidrogênio pode afetar as enzimas de várias maneiras. Primeiro, o sítio ativo pode conter aminoácidos com grupos ionizáveis nas cadeias laterais. Por exemplo, as carboxilas $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; imidazol, etc. Além disso, os substratos também podem ser afetados. Se um substrato contém um grupo ionizável, as mudanças no pH afetam a capacidade de ligação ao sítio ativo. Segundo, alterações nos grupos ionizáveis podem modificar a conformação da enzima. Como a conformação das proteínas dependem das cargas elétricas dos grupos químicos ionizáveis, haverá um pH em que a conformação será mais adequada para a atividade enzimática. Este é o chamado pH ótimo. Mudanças drásticas no pH promovem a desnaturação de muitas enzimas. Apesar de algumas enzimas tolerar grandes mudanças no pH, a maioria delas são ativas somente em intervalos muito estreitos. Por essa razão, os organismos vivos empregam tampões que regulam o pH. Por exemplo, o pH ótimo da pepsina, enzima proteolítica produzida no estômago é, aproximadamente, 2. Para a quimotripsina, que digere as proteínas no intestino delgado, o pH ótimo é, aproximadamente, 8 (MOTTA, 2009).

CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

A velocidade máxima da reação é uma função da quantidade de enzima disponível, aumentando proporcionalmente pela introdução de mais enzima ao sistema. Assim, existindo substrato em excesso, a velocidade inicial (V_0) da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de enzima. A figura 02 mostra o gráfico de V_0 em função de diferentes concentrações de enzimas, onde, $E_1 < E_2 < E_3 < E_4$.

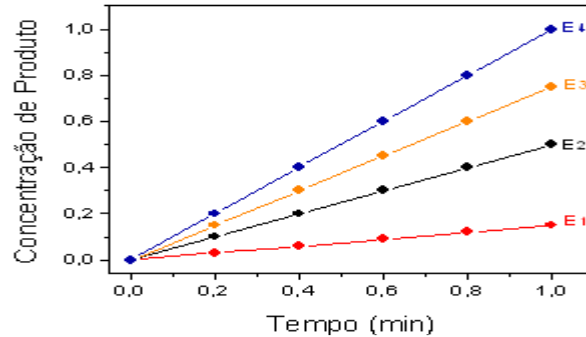


Figura 01: Efeito da concentração de enzima sobre V_0 em reações catalisadas por enzimas.
(Fonte: http://www.bioqmed.ufrj.br/enzimas/concn_enz.htm)

CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

A velocidade de uma reação de atividade enzimática é expressa em termos de formação de produto ou pelo consumo de substrato por unidade de tempo. Para uma determinada concentração de enzima, o aumento da concentração de substrato $[S]$ causa um aumento gradual na velocidade inicial da reação catalisada. A figura 03 mostra o gráfico de V_0 em função de diferentes concentrações de substrato.

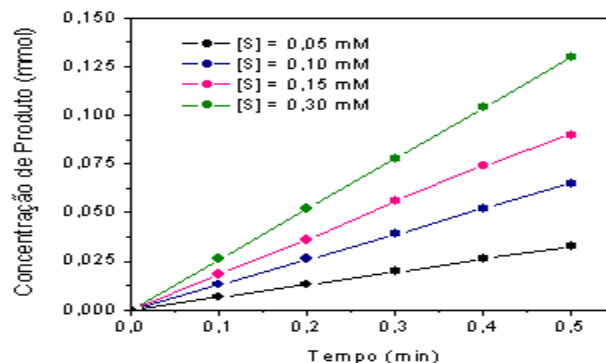


Figura 02: Efeito da concentração de substrato sobre V_0 em reações catalisadas por enzimas.
(Fonte: http://www.bioqmed.ufrj.br/enzimas/concn_subst.htm)

1.7 USO INDUSTRIAL DAS ENZIMAS

Os detergentes modernos apresentam um espectro de ação e utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, necessidade de especialização das formulações. A principal vantagem da formulação de detergentes que contenha enzimas é a substituição de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos. O uso diversificado das enzimas deve-se a sua característica de atuar como biocatalisadores especializados. As enzimas adicionadas à formulações de detergentes de uso hospitalar, doméstico e Industrial agem digerindo e dissolvendo resíduos orgânicos (sangue, fezes, urina, vômitos, manchas diversas) higienizando as partes externas e internas de instrumentos cirúrgicos, desobstruindo canais com resíduos e coagulados, eliminando resíduos fecais dos canais e superfícies dos fibroscópios e removendo contaminantes da roupa hospitalar (GODFREY apud MITIDIÈRE, 2002).

A preocupação crescente com o ambiente é outro fator que tem levado os fabricantes a reavaliar as formulações já existentes. Nas formulações mais recentemente utilizadas, muitos ingredientes impróprios, até então empregados, foram substituídos por enzimas, mantendo o mesmo desempenho dos antigos produtos. As enzimas como princípios ativos dos detergentes apresentam a grande vantagem de serem totalmente biodegradáveis (MITIDIÈRE 2003).

A indústria biotecnológica produz várias enzimas para diferentes usos. O uso de proteases em detergentes melhora a remoção de manchas de origem biológica, como o sangue e molhos. O termo “biológico” empregado nas embalagens de detergente em pó reflete a presença de proteases. As proteases são também utilizadas em restaurantes para amaciar a carne, por cervejeiros para eliminar a turvação nas cervejas, por padeiros para melhorar a textura do pão e em indústrias de luvas para amaciar o couro.

Outras enzimas também apresentam uso industrial. Por exemplo, a lipase é adicionada a detergentes líquidos para degradar graxas (lipídeos) e em alguns

queijos para desenvolver aroma. A pectinase é usada na indústria de geléias para promover a máxima extração de líquido das frutas. As amilases são empregadas para degradar o amido em certos removedores de papel de parede para facilitar a sua retirada. Na tabela 01 são indicados os principais usos de importantes enzimas produzidas em escala industrial (MOTTA, 2009).

Apesar dos detergentes enzimáticos já serem utilizados há muitos anos, o seu uso no Brasil é mais recente. Como as enzimas possuem ação direta sobre determinada substância, devemos considerá-la como uma substância ativa em uma formulação, apesar de muitas formulações indicá-las como agentes coadjuvantes.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA define ingrediente ativo como: “Ingrediente ativo ou princípio ativo – substância presente na formulação para conferir eficácia ao produto, segundo sua destinação” (BRASIL, 2001).

Os ativos químicos são definidos em percentual, massa ou volume. Em uma formulação contendo enzimas não se deve especificar concentração enzimática dessa forma, visto que esses produtos são freqüentemente constituídos de misturas heterogêneas de diversas proteínas, além de serem passíveis de sofrerem inúmeras interferências, alterando, assim, sua atividade enzimática. Além disso, uma parte da quantidade de enzima pode estar presente na preparação, mas inativada ou desnaturada, ou seja, parcialmente desprovida de sua atividade original (MITIDIÈRE 2002).

Outros fatores presentes na formulação final do produto também podem provocar uma diminuição da atividade enzimática. Devido a essas dificuldades, a IUBMB vem recomendando, para expressar a concentração enzimática, a utilização da Unidade Internacional (U.I.) de atividade enzimática. Essas recomendações têm o caráter de Convenção Internacional e inclui o Brasil como signatário (MITIDIÈRE 2002).

Segmento Industrial	Enzima	Aplicação
Detergentes	proteases, amilases, celulase, lipases,	Remoção de manchas, lavagem e clarificação de cores.
Alcool combustível	Amilase, Amidoglucosidase, Glucose isomerase.	liquefação do amido; sacarificação e conversão da glicose a frutose.
Alimentos	proteases, amilases, lactases, transglutaminase, lipoxigenase.	Coagulação do leite, queijo, remoção da lactose, branqueamento e amolecimento do pão, etc.
Bebidas	Amilase, β -glucanase, Acetolactato descarboxilase, lacase.	Tratamento de sucos, maturação de cervejas.
Textil	Celulase, Amilase, Catalase.	Amolecimento do algodão, remoção de tintas em excesso.
Higiene pessoal e beleza	Amiloglicosidase, Glicose oxidase, Peroxidase.	Atividade antimicrobiana.

Tabela 01: Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais.

Fonte: (adaptado de <http://www.bioqmed.ufrj.br/enzimas/biotecnoaplica.htm>)

Os principais tipos de enzimas utilizadas em detergentes incluem: a) amilases – degradam amido e outros glicídios de carboidratos; b) proteases – degradam ligações peptídicas; c) lipases – degradam lipídeos; d) celulases – degradam celulose (BON apud MITIDIÈRE, 2002).

As amilases são as enzimas capazes de degradar especificamente as ligações glicosídicas do amido (amilose, amilopectina) e de seus produtos de degradação (maltodextrinas) até o estágio de oligossacarídeos. São amplamente distribuídas na natureza, onde participam em vários processos biológicos tais como a digestão de alimentos por animais e microrganismos, e na germinação e maturação de grãos. São também empregadas em outros segmentos industriais, para despolimerização controlada do amido, originando substratos importantes em processos fermentativos, e na preparação de xaropes de glicose, maltose ou

mistos; panificação; cervejaria; e produção de etanol. Na formulação de detergentes, são utilizadas para a remoção de resíduos insolúveis de alimentos ricos em amido, tornando-os solúveis e, portanto, facilmente removíveis (MITIDIÈRE 2002).

As proteases são as enzimas mais utilizadas na indústria de detergentes para a remoção de resíduos protéicos ou proteínas, como sangue, manchas de ovo, suor humano, entre outros. Esse grupo inclui uma larga variedade de enzimas que clivam ligações peptídicas em substratos menores (peptídeos) ou maiores (proteínas), atuando na porção central dos substratos protéicos (endopeptidases) ou nas porções externas (exopeptidases). O grupo mais comumente empregado na indústria de detergentes é o das endopeptidases de especificidade não restrita, as quais degradam substratos protéicos a peptídeos solúveis (MITIDIÈRE 2002).

Lipases são enzimas que hidrolisam as ligações éster das gorduras, produzindo alcoóis e ácidos graxos. Este tipo de enzima é de grande importância industrial devido a hidrólise de óleos vegetais, como o azeite ou óleo de coco, para a produção de gordura aminoácidos e glicerol, os quais encontram aplicações generalizadas, principalmente em sabões e detergentes, cosméticos, produtos farmacêuticos, e alimentos (GANDHI, 1997).

A celulase utilizada em detergentes enzimáticos traz ao produto propriedades que possibilitam a modificação da estrutura de fibras de celulose encontradas no algodão. Quando esse complexo é adicionado a um detergente mantém a vivacidade das cores com um efeito amaciante, provavelmente devido à remoção das microfibras (WAINWRIGHT e PEBERDY apud MITIDIÈRE, 2002).

Considerando o grande número desta categoria de produtos disponíveis no mercado e a demanda para implementação de ensaios de controle da atividade enzimática, o presente trabalho tem como proposta a otimização de metodologias para determinação das atividades proteolítica, lipolítica e amilolítica em detergentes de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi otimizar metodologias analíticas para determinação de atividade enzimática em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificação das formulações de detergentes enzimáticos disponíveis no mercado;
- Otimização de uma metodologia analítica para determinação da atividade proteolítica;
- Otimização de uma metodologia analítica para determinação da atividade lipolítica;
- Otimização de uma metodologia analítica para determinação da atividade amilolítica;
- Realização de testes de validação analítica nas três metodologias propostas.

3. METODOLOGIA

A metodologia para realização deste estudo foi dividida em duas etapas. Na primeira, foram avaliados teores de diversas formulações de detergentes enzimáticos. Na segunda etapa realizou-se otimizações de metodologias para determinação de atividades enzimáticas, juntamente com a realização de alguns parâmetros de validação analítica.

3.1 VERIFICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS

Realizou-se uma verificação qualitativa das enzimas utilizadas nas formulações dos principais detergentes enzimáticos disponíveis no mercado de diversos fabricantes de detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde através dos dados enviados pela ANVISA.

3.2 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE AMIOLÍTICA

O desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de atividade amilolítica empregou-se a técnica espectrofotométrica, onde ocorreu liberação de açúcar redutor, havendo formação de cor utilizando o reagente DNS.

A determinação da atividade amilolítica foi realizada utilizando-se amido solúvel como substrato. Nesse ensaio, a atividade foi expressa em $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Para o ensaio foi empregada a mistura de reação contendo amostra, tampão citrato-fosfato e substrato. Para o branco da amostra substituiu-se o amido solúvel por água destilada. Transcorrido o tempo de incubação dos tubos, foi adicionado o reagente contendo ácido dinitrosalicílico (DNS). Após a fervura das amostras os tubos foram resfriados e homogeneizados. Os ensaios com as amostras foram realizados em triplicata e a leitura foi realizada em espectrofotômetro. Para a determinação da atividade amilolítica utilizou-se de uma

curva analítica construída com glicose P.A. As amostras utilizadas foram preparadas de acordo com a diluição de uso informada pelo fabricante.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

A) EQUIPAMENTOS:

- a) Espectrofotômetro UV-VIS;
- b) Banho-termostático;
- c) Placa de aquecimento.

B) MATERIAL UTILIZADO:

- a) Béqueres;
- d) Balões volumétricos;
- e) Pipetas volumétricas;
- f) Provetas;
- g) Pipetas Pasteur;
- h) Micropipetas de 10, 20, 40, 50, 100, 200 e 5000 μ L;
- i) Tubos de ensaio de 25mL com tampa;
- j) Cubetas para espectrofotômetro com 1cm de caminho óptico.

C) REAGENTES:

- a) Amido solúvel;
- b) Ácido cítrico;
- c) Fosfato de sódio dibásico;
- d) Glicose;

- e) Hidróxido de sódio;
- f) Tartarato de sódio e potássio;
- g) Metabissulfito de sódio;
- h) Fenol;
- i) Ácido 3,5-dinitrosalicílico;

D) PREPARO DE SOLUÇÕES:

- a) Solução de ácido cítrico 0,05M:

Dissolver 1,05g de ácido cítrico em 100mL de água destilada.

- b) Solução de fosfato de sódio dibásico 0,05M:

Dissolver 1,38g de fosfato de sódio dibásico em 100mL de água destilada.

- c) Sistema tamponante (tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0):

Em um balão de 100 mL, adicionar 36 mL de ácido cítrico 0,05M e juntar com 64 mL de fosfato de sódio dibásico 0,05M. Se necessário, corrigir o pH com uma destas soluções. Estocar a de 5°C por no máximo uma semana.

- d) Solução de amido solúvel 1% (m/v):

Dissolver 1g de amido em 100 mL de água destilada, aquecer até a fervura, esfriar e completar o volume novamente para 100mL. Estocar a de 5°C por no máximo uma semana.

- e) Solução stock de glicose $55,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (1% m/v):

Dissolver 1g de glicose em 100mL de água destilada.

- f) Reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (reagente DNS):

Em 236mL de água destilada adicionar 3,0g de hidróxido de sódio, 51g de tartarato de sódio e potássio, 1,38g de metabissulfito de sódio, 0,63g de fenol e 1,77g de ácido 3,5-dinitrosalicílico.

E) MÉTODO DE ENSAIO.

a) Curva analítica de glicose:

Tubo N°	Volume da solução de glicose 1% (μL)	Volume de tampão (μL)	Conc. final de glicose ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$)
0	0	600	0,000
1	20	580	0,06515
2	40	560	0,1303
3	60	540	0,1954
4	80	520	0,2609
5	100	500	0,3257
6	120	480	0,3909
7	140	460	0,4560

Tabela 02. Dados para construção da curva analítica de glicose.

Transferir 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 μL da solução glicose a 55,6 $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ para tubos de ensaio de 25mL com tampa. Adicionar respectivamente 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480 e 460 μL de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0, conforme tabela 1. Adicionar 1,5 mL de reagente DNS e em seguida ferver por 5 minutos em banho-termostático. Adicionar 15 mL de água destilada, resfriar a temperatura ambiente e ler em espectrofotômetro a 550nm. Construir uma curva analítica para glicose (concentração de glicose [μmol] vs. absorbância) utilizando o primeiro ponto como zero do equipamento.

NOTA 1: A concentração de açúcares redutores será expressa em $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ de glicose.

b) Ensaio da amostra:

Em um tubo de ensaio de cerca de 25mL com tampa, adicionar 200 μ L de tampão citrato-fosfato 0,05M e 300 μ L de solução de amido solúvel 1%. Incubar em banho-termostático a $40^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos).

NOTA 2: A amostra também deve ser acondicionada previamente em banho-termostático a $40^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para atingir o equilíbrio térmico antes de ser adicionada ao sistema de reação.

Adicionar 100 μ L de amostra e deixar no banho por 30 minutos na mesma temperatura. Essa seqüência deve ser seguida para os tubos seguintes em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos). Parar a reação adicionando 1,5 mL de reagente DNS, observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (30 minutos) seja o mesmo em todos os tubos. Em seguida ferver por 5 minutos em banho-termostático e adicionar 15 mL de água destilada. Realizar um branco para cada replicata, com adição de amostra sem substrato. Realizar um branco sem adição de amostra, como zero do equipamento. Resfriar e ler em espectrofotômetro a 550nm. Determinar a concentração de açúcares redutores utilizando a curva de calibração de glicose.

NOTA 3: Se necessário, realizar diluição da amostra em tampão citrato-fosfato 0,05M.

F) RESULTADO.

a) Definição da Unidade de Atividade Amilolítica (UA.mL⁻¹.min⁻¹):

Definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcares redutores por mL de amostra por minuto, sob condições padrões.

b) Cálculos:

Cálculo da concentração na curva analítica ($\mu\text{mol/mL}$):

$$x = \frac{y - b}{a} \quad \Rightarrow \quad C = \frac{(ABS_{AM} - ABS_{BR}) - b}{a}$$

Onde:

- C = concentração, em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$
- (ABS_{AM}) = valor da leitura na amostra, em nm
- (ABS_{BR}) = valor da leitura no branco, em nm
- b = coeficiente linear
- a = coeficiente angular

Cálculo da atividade amilolítica:

$$\text{Atividade Amilolítica [UA.mL}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}] = \frac{C * 10 * fd}{30}$$

Onde:

- C = Concentração de açúcares redutores na amostra (μmol), determinada através da curva analítica de glicose
- fd = Fator de diluição da amostra, quando houver.

3.3 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de atividade proteolítica utilizou-se da técnica de espectrofotometria, onde ocorreu a liberação do grupamento azo pela hidrólise do substrato cromogênico azocaseína.

A determinação da atividade proteolítica foi realizada utilizando-se azocaseína como substrato. Nesse ensaio, a atividade foi expressa em $\text{ABS.mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Para o ensaio foi utilizada uma mistura de reação que continha: amostra, tampão Tris-HCl e substrato. Transcorrido o tempo de incubação dos

tubos, foi adicionado o reagente contendo ácido tricloroacético (TCA). Os tubos foram resfriados, e após a centrifugação, os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro. Para o branco da amostra, além da mistura reacional, adicionou-se TCA. Os ensaios com as amostras foram realizados em triplicata. As amostras utilizadas foram preparadas de acordo com a diluição de uso informada pelo fabricante.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

A) EQUIPAMENTOS:

- a) Espectrofotômetro UV-VIS;
- b) Centrífuga para microtubos;
- c) Banho termostático;
- d) Balança analítica.

B) MATERIAL UTILIZADO:

- a) Béqueres;
- b) Balões volumétricos;
- c) Provetas;
- d) Pipetas Pasteur;
- e) Micropipetas de 100, 200, 1000 μL ;
- f) Microtubos de 2 mL;
- g) Cubetas para espectrofotômetro com 1cm de caminho óptico.

C) REAGENTES:

- a) Tris-HCl;
- b) Ácido tricloroacético (TCA);

c) Azocaseína.

D) PREPARO DAS SOLUÇÕES:

a) Solução de ácido clorídrico 1 M:

Diluir 8,5mL de ácido clorídrico ($d = 1,18 \text{ g/mL}$ e concentração de 37%) em água destilada e completar o volume para 100mL.

b) Sistema tamponante: Tampão tris-HCl 0,05M pH 8,0:

Dissolver 0,605g de tris em 80mL de água destilada. Adicionar HCl 1M até atingir o pH 8,0. Completar o volume para 100mL. Estocar a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ por no máximo uma semana.

c) Substrato:

Solução de azocaseína a 2% (m/v): dissolver 1g de azocaseína em 50 mL de água destilada. Preparar somente na hora do ensaio a quantidade necessária.

d) Reagente de parada:

Solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v): dissolver 20g de ácido tricloroacético em 100 mL de água destilada. Estocar a 5°C .

E) MÉTODO DE ENSAIO.

a) Ensaio da amostra:

Em um microtubo de 2 mL, adicionar 200 μL de tampão tris-HCl 0,05 M e 100 μL do substrato (azocaseína 2%). Incubar em banho-termostático a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos);

NOTA 1: A amostra também deve ser acondicionada previamente em banho-termostático a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, para atingir o equilíbrio térmico antes de ser adicionada ao sistema de reação.

Adicionar 100 μL da amostra e deixar no banho por mais 15 minutos a mesma temperatura. Essa seqüência deve ser seguida para os demais tubos em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos). Parar a reação adicionando 800 μL de TCA 20% observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (15 minutos) seja o mesmo em todos os tubos. Em seguida centrifugar os microtubos a 9000 g por 5 minutos, recolher o sobrenadante. Ler em espectrofotômetro a 400 nm e utilizar a solução tampão tris-HCl para zerar o equipamento;

NOTA 2: Se necessário, realizar diluição da amostra em tampão tris-HCl 0,05 M.

b) Preparo do branco da reação/amostra:

Preparar um branco adicionando em um microtubo de 2 mL, 200 μL de tampão tris-HCl 0,05 M, 100 μL de azocaseína 2% e 800 μL de TCA 20%. Acondicionar em banho-termostático a 40 ± 1 °C, deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos). Adicionar 100 μL de amostra e deixar no banho por 15 minutos a mesma temperatura. Em seguida centrifugar os microtubos a 9000 g por 5 minutos, recolher o sobrenadante e ler em espectrofotômetro a 400 nm.

F) RESULTADO.

a) Definição da Unidade de Atividade Enzimática Proteolítica ($\text{UP} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$):

Definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de uma unidade de Densidade Óptica (DO) em uma cubeta de 1cm de caminho óptico por mL de amostra por minuto, sob condições padrões descritas anteriormente.

b) Cálculo do resultado:

$$\text{Atividade Enzimática Proteolítica [UP.mL}^{-1}.\text{min.}^{-1}] = \frac{(ABS_{AM} - ABS_{BR}) * 10 * fd}{15}$$

Onde: ABS_{AM} = Absorbância da amostra.
 ABS_{BR} = Absorbância do branco da amostra.
 fd = Fator de diluição da amostra, quando houver.

3.4 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA

O desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de atividade lipolítica utilizou-se da técnica de espectrofotometria em que ocorre a reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato, liberando *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

A determinação da atividade lipolítica foi realizada utilizando-se *p*-nitrofenilpalmitato como substrato. Nesse ensaio, a atividade foi expressa em $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Para o ensaio foi utilizada uma mistura de reação contendo: amostra, tampão Tris-HCl e uma emulsão contendo o substrato. Neste ensaio não utilizou-se uma solução de parada, onde as absorbâncias foram lidas num tempo inicial (T_i) e num tempo final (T_f). A diferença destas leituras foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática. Para o branco utilizou-se tampão tris-HCl no lugar da amostra. Para a determinação da atividade lipolítica utilizou-se de uma curva analítica construída com *p*-nitrofenol P.A. Os ensaios com as amostras foram realizados em triplicata. As amostras utilizadas foram preparadas de acordo com a diluição de uso informada pelo fabricante.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

A) EQUIPAMENTOS:

- a) Espectrofotômetro UV-VIS;
- b) Banho termostático;
- c) Balança analítica;

B) MATERIAL UTILIZADO:

- a) Béqueres;
- b) Balões volumétricos;
- c) Provetas;
- d) Pipetas Pasteur;
- e) Micropipetas de 100, 200 e 1000 μ L;
- f) Cubetas para espectrofotômetro com 1cm de caminho óptico.

C) REAGENTES:

- a) *p*-nitrofenilpalmitato P.A.;
- b) *p*-nitrofenol P.A.;
- c) Isopropanol P.A.;
- d) Tris-HCl;
- e) Triton X-100 P.A.;
- f) Goma arábica P.A.;

D) PREPARO DE SOLUÇÕES:

- a) Solução de ácido clorídrico 1 M:

Diluir 8,5mL de ácido clorídrico ($d = 1,18 \text{ g/mL}$ e concentração de 37%) em água destilada e completar o volume para 100mL.

b) Sistema tamponante: Tampão tris-HCl 0,05M pH 8,0:

Dissolver 0,605g de tris em 80mL de água destilada. Adicionar HCl 1M até atingir o pH 8,0. Completar o volume para 100mL. Estocar a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ por no máximo uma semana.

Tampão tris-HCl 0,05 M pH 8,0: dissolver 12,1g de tris-HCl em 2000 mL de água destilada. Se necessário, corrigir o pH com uma solução de HCl 0,2 M. Estocar a 5°C .

c) Solução I – 3mg/mL *p*-nitrofenilpalmitato em isopropanol:

Dissolver 30mg de *p*-nitrofenilpalmitato em 10mL de isopropanol. Armazenar à -20°C .

d) Solução II:

Em um becker de 500 mL pesar 2g de Triton X-100, adicionar 0,5g de goma arábica e 450mL de tampão Tris HCl 0,05M pH 8,0. Armazenar de 2 a 8°C por até uma semana.

e) Emulsão contendo o substrato:

Gotejar vagarosamente a solução I na solução II sob forte agitação na proporção de 1:9. Ambas as soluções devem estar previamente equilibradas a 40°C .

f) solução padrão de *p*-nitrofenol 3,594 μM :

Dissolver 48,7 mg de *p*-nitrofenol em 100mL de água destilada. Após, diluir 10 vezes esta solução.

E) MÉTODO DE ENSAIO.

a) Curva analítica de *p*-nitrofenol:

Tubo N°	Volume da solução de <i>p</i> -nitrofenol 0,3594 μM (μL)	Volume de tampão (μL)	Conc. final de <i>p</i> -nitrofenol ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$)
0	0	1000	0,000
1	5	995	0,00175
2	30	970	0,0105
3	55	945	0,01925
4	80	920	0,0280
5	105	895	0,03675
6	130	870	0,0455
7	155	845	0,05425

Tabela 03. Dados para construção da curva analítica de *p*-nitrofenol.

Transferir 0, 5, 30, 55, 80, 105, 130 e 155 μL da solução *p*-nitrofenol a 0,3594 μM para cubetas com 1 cm de caminho óptico. Adicionar respectivamente 1000, 995, 970, 945, 920, 895, 870 e 845 μL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0, conforme tabela 1. Homogeneizar e ler em espectrofotômetro a 400nm. Construir uma curva analítica para *p*-nitrofenol (concentração de *p*-nitrofenol [μmol] vs. absorvância) utilizando o primeiro ponto como zero do equipamento.

NOTA 1: A concentração de *p*-nitrofenol será expressa em $\mu\text{mol. mL}^{-1}$.

b) Ensaio da amostra:

Em uma cubeta de 1,5 mL, adicionar 900 μ L da emulsão contendo o substrato. Incubar em banho-termostático a $40^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos).

NOTA 2: A amostra também deve ser acondicionada previamente em banho-termostático a $40^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para atingir o equilíbrio térmico antes de ser adicionada ao sistema de reação.

Adicionar 100 μ L da amostra na cubeta contendo 900 μ L de emulsão, misturar e ler imediatamente em espectrofotômetro a 410nm (tempo zero). Incubar no banho por 30 minutos e ler em espectrofotômetro a 410nm (tempo final). Realizar um branco para cada replicata, com adição de tampão ao invés da amostra. Utilizar apenas tampão Tris-HCl como zero do equipamento.

NOTA 3: Se necessário, realizar diluição da amostra em tampão Tris-HCl 0,05M.

F) RESULTADO.

a) Definição da Unidade de Atividade Lipolítica (UL.mL⁻¹.min.⁻¹):

É definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

b) Cálculos:

Cálculo da concentração na curva analítica (μ mol/mL):

$$x = \frac{y - b}{a} \quad \Rightarrow \quad C = \frac{[(T_F - T_Z) - (T_{FB} - T_{ZB})] - b}{a}$$

Onde:	C	=	concentração, em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$
	T_F	=	tempo final na leitura da amostra
	T_Z	=	tempo zero na leitura da amostra
	T_{FB}	=	tempo final na leitura da branco
	T_{ZB}	=	tempo zero na leitura da branco
	b	=	coeficiente linear
	a	=	coeficiente angular

Cálculo da atividade lipolítica:

$$\text{Atividade Lipolítica [UL.mL}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}] = \frac{C * 10 * fd}{30}$$

Onde: C = Concentração de *p*-nitrofenol na amostra (μmol), determinada através da curva analítica.

fd = Fator de diluição da amostra, quando houver.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA PRELIMINAR DAS METODOLOGIAS

Na análise estatística preliminar das metodologias foram escolhidos os parâmetros de linearidade e repetibilidade.

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra, em uma dada faixa de concentração. A linearidade pode ser observada por meio da curva analítica, e é avaliada por intermédio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito em que o método pode ser aplicado. Segundo RE nº 899, de 29/05/03 da ANVISA a curva de calibração, ou melhor, curva analítica (por se tratar de uma substância), representa a relação entre o sinal (resposta) e a concentração conhecida do analito.

Foram realizadas 3 curvas analíticas para cada enzima, utilizando padrão SIGMA® contendo 7 níveis de concentração. As medidas das absorbâncias obtidas através das análises foram utilizadas para a construção da curva. Os métodos foram avaliados separadamente pelo tratamento dos dados da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida pelo setor de alimentos e contaminantes do departamento de química do INCQS baseada no trabalho de Souza & Junqueira (SOUZA, 2005).

A repetibilidade (*precisão intra-corrída*) é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, com o mesmo procedimento, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. Sugere-se sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão de repetibilidade (DPRr) (INMETRO, 2007). Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

$$DPRr = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde: *DP* = Desvio padrão
 CMD = Concentração média determinada

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VERIFICAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS

Para a investigação qualitativa das enzimas mais utilizadas no mercado em detergentes de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde, verificou-se 20 formulações de produtos, que são mostrados na tabela 03.

A partir destes dados observou-se que as enzimas mais utilizadas são: amilase, protease e lipase, embora Bon (1995) cite também a celulase. Nota-se que dois produtos apresentam em sua formulação subtilinase. Esta enzima é considerada uma protease. Nenhum produto apresentou a celulase em sua formulação. Três produtos apresentaram em sua formulação a carboidrase. Convém salientar que a carboidrase é uma nomenclatura que engloba um grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações de carboidratos. Esse termo utilizado na rotulagem de um detergente não é apropriado, visto que as amilases e as celulases são, por definição, carboidrases (MITIDIÈRE, 2002).

Pode-se destacar que a variação de percentual de enzimas foi de 0,009% a 25% p/p. Segundo Mitidiere (2002) o fato dos produtos apresentarem em suas formulações este tipo de variação, isto pode não resultar uma atividade enzimática proporcional, o que, na prática, vale dizer que apresentam uma variação no rendimento.

Observou-se que, em relação à protease, dois produtos apresentaram uma concentração de enzima de 25%. Isso significa a presença de 250 g de protease por litro de detergente, e de acordo com Mitidiere (2002), este fato torna-se biologicamente improvável, pois não estaria totalmente solúvel.

Tabela 04: Enzimas presentes em amostras de detergentes enzimáticos
Dados fornecido pela ANVISA.

N ^o	FABRICANTE	ENZIMAS PRESENTES	CONC. (%)
1	A	PROTEASE	5,5%
2	B	PROTEASE	1%
3	C	PROTEASE	2,5%
		AMILASE	2,5%
4	D	PROTEASE	14%
		LIPASE	4%
		AMILASE	4%
5	E	PROTEASE	6,25%
		LIPASE	1,25%
		AMILASE	0,25%
6	F	PROTEASE	8%
		LIPASE	5%
		AMILASE	1%
		CARBOIDRASE	5%
7	G	PROTEASE	7%
		LIPASE	1,5%
		DUAS AMILASES	0,75% e 0,75%
8	H	PROTEASE	10%
		LIPASE	12%
		AMILASE	10%
		CARBOIDRASE	7%
9	I	DUAS PROTEASES	12% e 5%
		LIPASE	12%
		DUAS AMILASES	7% e 10%
10	J	PROTEASE	25%
		AMILASE	25%
11	K	AMILASE	25%
		PROTEASE	25%
12	L	PROTEASE	4%
13	M	DUAS PROTEASES	6,25% e 18,75%
		PROTEASE	0.037%
		LIPASE	0.009%
14	N	AMILASE	0.014%
		PROTEASE	4%
		LIPASE	2,5%
15	O	AMILASE	0,5%
		PROTEASE	7.5%
		LIPASE	5%
16	P	AMILASE	7,5%
		CARBOIDRASE	---
		PROTEASE	1%
		LIPASE	5%
17	Q	AMILASE	1%
		PROTEASE	---
		SUBTILINASE	---
18	R	LIPASE	---
		AMILASE	---
		PROTEASE	---
19	S	SUBTILINASE	---
		LIPASE	---
		AMILASE	---
20	T	PROTEASE, LIPASE, AMILASE	---

4.2 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE AMILOLÍTICA

Para a determinação da atividade amilolítica fez-se necessário a construção de uma curva analítica, utilizando glicose anidra como padrão. Os valores da curva e sua representação estão contidos na tabela 05 e na figura 03, respectivamente.

Pontos da Curva Analítica	Conc. Final de Glicose ($\mu\text{mol/mL}$)	Leitura em λ à 550nm
0	0,000	0,0000
1	0,06515	0,1099
2	0,1303	0,2427
3	0,1954	0,3735
4	0,2609	0,5091
5	0,3257	0,6452
6	0,3909	0,7678
7	0,4560	0,9037

Tabela 05: Valores da curva analítica para determinação de atividade amilolítica

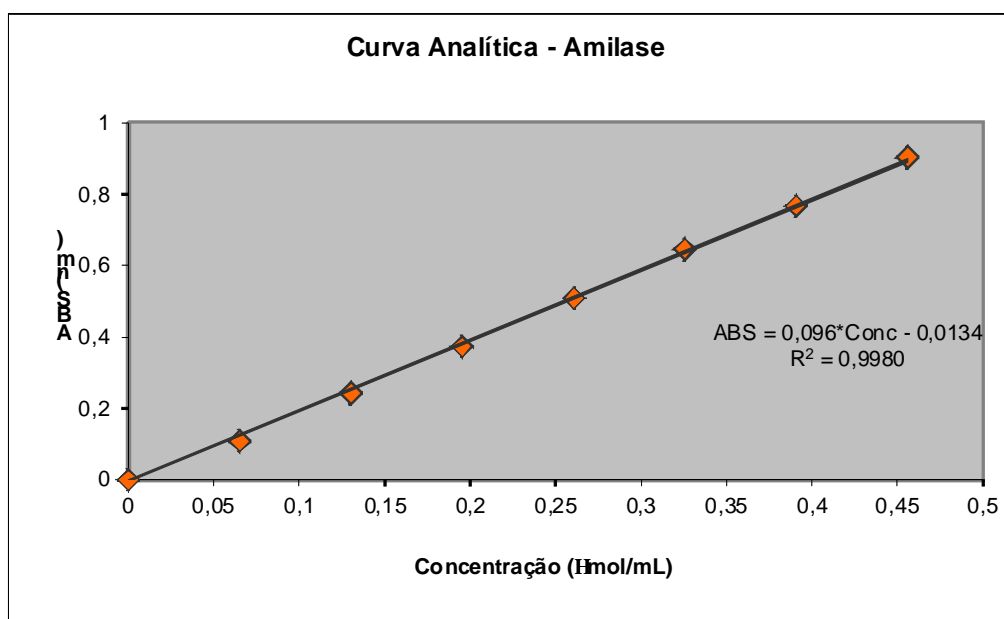


Figura 03: Representação gráfica da curva analítica de atividade amilolítica contendo a equação da reta e coeficiente de correlação.

4.3 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Na metodologia de atividade proteolítica não há a utilização de uma curva analítica. Uma vez que isto é constatado, a IUBMB determina a atividade enzimática em U.I. quando se trata de substratos bem definidos e baseados em uma padronização e possibilita perfeitas comparações entre diferentes formulações. Alternativamente, quando se trata de reações mais complexas, onde os substratos ou os produtos são menos definidos, como as proteases, a “ENZYME COMMISSION” recomenda a adoção de critérios quantitativos para definir a unidade enzimática, levando sempre em consideração a necessidade de identificar a ação catalítica típica da enzima, igualmente em condições padronizadas de ensaio (IUBMB apud MITIDIÈRE, 2002). Por isso a necessidade de expressar a unidade de atividade proteolítica em $\text{ABS.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.4 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para a determinação da atividade lipolítica fez-se necessário a construção de uma curva analítica, utilizando *p*-nitrofenol como padrão. Os valores da curva e sua representação estão contidos na tabela 06 e na figura 04, respectivamente.

Pontos da Curva Analítica	Conc. Final de <i>p</i> -nitrofenol ($\mu\text{mol/mL}$)	Leitura em λ à 400nm
0	0,000	0,0000
1	0,00175	0,0253
2	0,0105	0,1805
3	0,01925	0,2986
4	0,0280	0,449
5	0,03675	0,562
6	0,0455	0,6793
7	0,05425	0,8

Tabela 06: Valores da curva analítica para determinação de atividade lipolítica

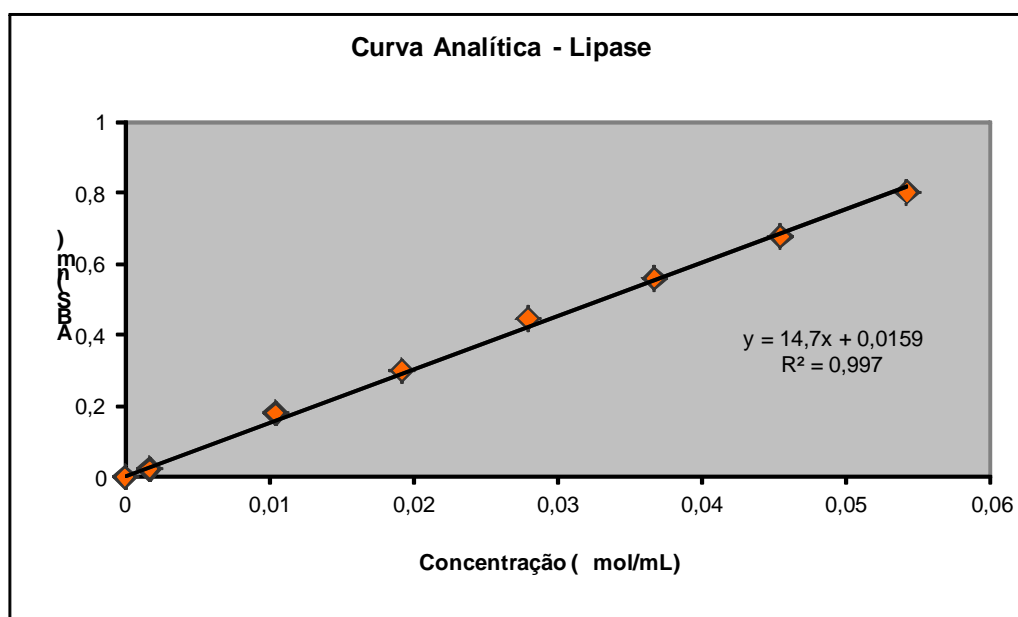


Figura 04: Representação gráfica da curva analítica de atividade lipolítica contendo a equação da reta e coeficiente de correlação.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA PRELIMINAR DAS METODOLOGIAS

A avaliação da linearidade foi realizada através da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida pelo setor de alimentos e contaminantes do departamento de química do INCQS baseada no trabalho de Souza & Junqueira (SOUZA, 2005).

Esta planilha consiste em ferramenta para a verificação da linearidade de uma curva analítica. A avaliação é realizada pelo MMQO. Seu ajuste se baseia nas seguintes hipóteses:

- Os resíduos são variáveis aleatórias com média zero e variância constante e desconhecida;
- Os resíduos são variáveis normalmente distribuídas;
- Os resíduos são homocedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X;
- Os resíduos não são correlacionados e independentes;
- A relação entre X_i e Y_i é linear.

Os parâmetros envolvidos na avaliação, além da linearidade pelo coeficiente de correlação são:

- Homocedasticidade (Teste de Brown-Forsythe);
- Significância da regressão e o desvio de linearidade;
- Verificação da dispersão dos resíduos;
- Autocorrelação dos resíduos (Teste de Durbin-Watson);
- Normalidade dos resíduos (Teste de Ryan-Joiner); e
- Limite de detecção e o limite de quantificação (SOUZA, 2005; AGUIAR, 2008).

A tabela 07 descreve os parâmetros envolvidos na avaliação da linearidade, a justificativa de sua utilização e avaliação realizada.

Teste	Justificativa	Avaliação
Significância da regressão	Verificar se a regressão é significativa	$p < 0,01$
Desvio de linearidade	Verificar a adequação do modelo estatístico	$p > 0,05$
Coeficiente de correlação linear	Verificar a correlação entre os resultados e a concentração do analito	$r > 0,90$ (Inmetro) $r > 0,99$ (Anvisa)
Gráfico de resíduos	Observar a dispersão de resíduos nos limites estabelecidos	Desejável que estejam o mais próximo possível da linha central
Normalidade de resíduos	Verificar se as tendências dos resíduos obedecem a distribuição normal	$R_{eq} > R_{crit}$
Autocorrelação de resíduos	Verificar a independência dos resíduos	Independentes: $d_{calc} > d_U$ Dependentes: $d_{calc} < d_L$ Inconclusivo: $d_L < d_{calc} < d_U$
Homogeneidade	Verificar a homogeneidade das variâncias dos resíduos	$p > 0,05$

Tabela 07: Parâmetros da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida por Souza & Junqueira

As avaliações dos dados das curvas de amilase, protease e lipase apresentam-se descritas nas figuras 05, 06 e 07.



AValiação de Linearidade de Curva Analítica

Dados da Curva Analítica

Análise:	Curva analítica - Teste de linearidade- amilase		
Data de Confeção da Curva:	16/09/2010	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Espectrofotometro Cary 6	Responsável:	Leonardo Lopes

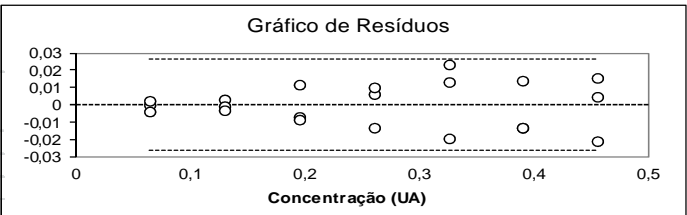
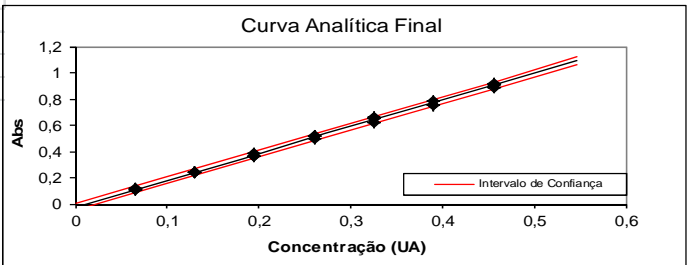
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. UA	Resposta Abs
1	01	0,06515	0,1102
	02	0,06515	0,1131
	03	0,06515	0,1063
2	04	0,1303	0,2458
	05	0,1303	0,2423
	06	0,1303	0,2399
3	07	0,1954	0,3867
	08	0,1954	0,3677
	09	0,1954	0,3662
4	10	0,2609	0,4949
	11	0,2609	0,5145
	12	0,2609	0,5179
5	13	0,3257	0,6199
	14	0,3257	0,6632
	15	0,3257	0,6526
6	16	0,3909	0,7587
	17	0,3909	0,7862
	18	0,3909	0,7584
7	19	0,456	0,8831
	20	0,456	0,9195
	21	0,456	0,9084

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,99
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,57
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coefficiente Angular (b):	2,03E+00	Coefficiente Linear (a):	-2,17E-02
r	0,9990	R ²	0,9980
N	21	Graus de Liberdade	19

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,65E-04
t _L calculado	-1,59E+00
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	1,28E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,44E-02	Limite de Quantificação	4,30E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,47E+00	1,47E+00	9,32E+03	4,88E-27
resíduos	19	3,00E-03	1,58E-04		
Ajuste	5	1,61E-04	3,22E-05	1,59E-01	9,74E-01
erro puro	14	2,83E-03	2,02E-04		
total	20	1,47E+00			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

Figura 05: Planilha de avaliação de linearidade para atividade amilolítica

AValiação de Linearidade de Curva Analítica

Dados da Curva Analítica

Análise: Curva analítica - Teste de linearidade- protease			
Data de Confeção da Curva:	08/03/2010	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Espectrofotometro Cary 6	Responsável:	Leonardo Lopes

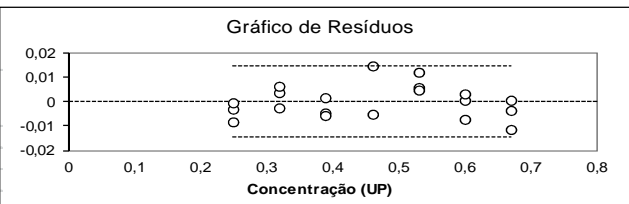
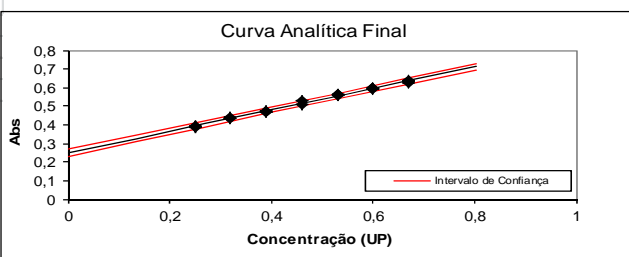
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. UP	Resposta Abs
1	01	0,25	0,3905
	02	0,25	0,3927
	03	0,25	0,3852
2	04	0,32	0,4376
	05	0,32	0,4314
	06	0,32	0,4402
3	07	0,39	0,4698
	08	0,39	0,4758
	09	0,39	0,4684
4	10	0,46	0,5095
	11	0,46	0,5294
	12	0,46	0,5334
5	13	0,53	0,5611
	14	0,53	0,5597
	15	0,53	0,567
6	16	0,6	0,5884
	17	0,6	0,5961
	18	0,6	0,5985
7	19	0,67	0,6246
	20	0,67	0,6323
	21	0,67	0,6367

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,99
Rcrit (α = 0,05)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,11
dL (Limite Inferior) α = 0,05	1,20
dU (Limite Superior) α = 0,05	1,41

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bx)

Coefficiente Angular (b):	5,78E-01	Coefficiente Linear (a):	2,49E-01
r	0,9970	R ²	0,9939
N	20	Graus de Liberdade	18

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	4,92E-05
t _L calculado	-1,52E-01
t _{tabelado} (α = 0,05)	2,10E+00
p	8,81E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	3,10E-02	Limite de Quantificação	9,18E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,37E-01	1,37E-01	2,95E+03	2,06E-21
resíduos	18	8,38E-04	4,66E-05		
Ajuste	5	3,78E-04	7,56E-05	2,14E+00	1,26E-01
erro puro	13	4,60E-04	3,54E-05		
total	19	1,38E-01			

Observações

--

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

Figura 06: Planilha de avaliação de linearidade para atividade proteolítica



AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Curva analítica - Teste de linearidade- Lipase		
Data de Confeção da Curva:	12/09/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Espectrofotometro Cary 6	Responsável:	Leonardo Lopes

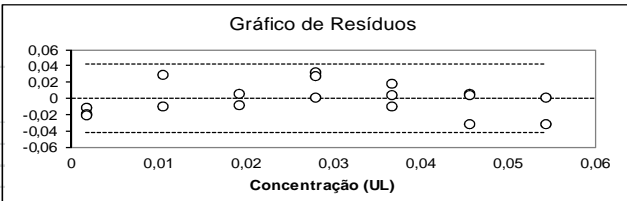
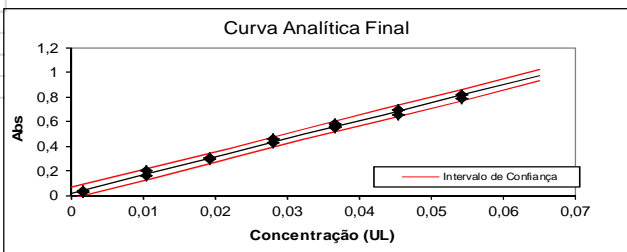
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. UL	Resposta Abs
1	01	0,00175	0,031
	02	0,00175	0,023
	03	0,00175	0,022
2	04	0,0105	0,205
	05	0,0105	0,2
	06	0,0105	0,161
3	07	0,01925	0,291
	08	0,01925	0,306
	09	0,01925	0,348
4	10	0,028	0,461
	11	0,028	0,456
	12	0,028	0,43
5	13	0,03675	0,576
	14	0,03675	0,562
	15	0,03675	0,548
6	16	0,0455	0,692
	17	0,0455	0,691
	18	0,0455	0,655
7	19	0,05425	0,784
	20	0,05425	0,816
	21	0,05425	0,742

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,43
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,16
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,39

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	4,26E-04
t_f calculado	3,62E-01
$t_{tabelado}$ ($\alpha = 0,05$)	2,12E+00
p	7,22E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coefficiente Angular (b):	1,47E+01	Coefficiente Linear (a):	1,59E-02
r	0,9973	R ²	0,9947
N	18	Graus de Liberdade	16

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	3,11E-03	Limite de Quantificação	9,25E-03
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,16E+00	1,16E+00	2,99E+03	1,25E-19
resíduos	16	6,20E-03	3,88E-04		
Ajuste	5	2,94E-03	5,87E-04	1,98E+00	1,61E-01
erro puro	11	3,27E-03	2,97E-04		
total	17	1,17E+00			

Observações

Responsável: _____ Data: ____/____/____ Verificado por: _____ Data: ____/____/____

Figura 07: Planilha de avaliação de linearidade para atividade lipolítica

Cabe ressaltar que na construção da curva analítica para a linearidade da atividade proteolítica foi utilizado um padrão enzimático Sigma® de origem microbiológica a partir do *Bacillus licheniformis*. De acordo com o fornecedor o padrão possui 792 U/mL de atividade proteolítica. A atividade enzimática foi expressa em mU / ml após verificar que havia uma correlação linear entre esta unidade de atividade da enzimática (a partir das informações comerciais) e concentração da enzima em mg / ml usando o método avaliado. Os padrões de protease contendo 25, 32, 39, 46, 53, 60 e 67 mU / ml de atividade proteolítica foram preparados para validar o método.

Os resultados das repetibilidades das análises efetuadas em três amostras de cada fabricante de detergente enzimático por um mesmo analista (usando o mesmo equipamento e no mesmo dia) estão indicados na Tabela 08. Os limites estabelecidos de DPRr em função da atividades das enzimas não podem ultrapassar 5% (BRASIL, 2003).

Atividade – primeiro fabricante (mUA.mL⁻¹.min⁻¹)	Atividade – segundo fabricante (mUP.mL⁻¹.min⁻¹)	Atividade – terceiro fabricante (UL.mL⁻¹.min⁻¹)
Amilase	Protease	Lipase
26,99	44,242	10,93
26,70	44,192	10,87
26,39	42,617	10,74
27,84	44,033	11,19
27,32	42,925	10,82
26,04	42,058	10,62
27,12	46,417	10,87
26,62	40,642	10,95
26,67	44,675	10,67
26,95	46,242	10,71
Média = 26,86	Média = 43,80	Média = 10,84
DPRr = 1,877 %	DPRr = 3,522%	DPRr =1,544

Tabela 08: Repetibilidade dos métodos enzimáticos para amilase, protease e lipase

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações dos fabricantes de detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde, em sua maioria contidas nos rótulos, não apresentaram uma homogeneidade nas formulações de seus produtos. Além disso, há a falta de conhecimento em relação à especificidade e nomenclatura das enzimas.

Os métodos de determinação enzimática para amilase, protease e lipase desenvolvidos neste trabalho, através dos resultados dos ensaios, mostraram-se eficientes e aplicáveis.

Na análise estatística preliminar das metodologias os resultados mostraram-se satisfatórios em relação à linearidade e repetibilidade. Os valores dos resultados das curvas analíticas e os desvios padrão relativos (DPRr) encontrados atestam a linearidade e a repetibilidade do método, respectivamente.

Vale destacar que a avaliação correspondeu apenas a dois parâmetros de validação e para maiores conclusões a respeito das metodologias propostas, outras etapas deverão ser realizadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BON, E. P. S., A tecnologia enzimática no Brasil. **ENZITEC 95**, v. 1, p. 9-14,1995.
2. AGUIAR, J. L. N. **Validação interlaboratorial de um novo método analítico por cromatografia em fase líquida do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
3. BRASIL. Consulta Pública nº 27, de 21 de maio de 2009. Informa a proposta de resolução que dispõe sobre o Regulamento Técnico para Produtos Detergentes Enzimáticos de Uso Restrito em Estabelecimentos de Assistência à Saúde. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2009.
4. BRASIL. Decreto nº 79.094 de 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, Brasília, DF, 1977.
5. BRASIL. Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.
6. BRASIL. Resolução (RDC) nº 184, de 22 de outubro de 2001. Altera a Resolução 336, de 30 de julho de 1999. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2001d.
7. BRASIL. Resolução (RDC) nº 40, de 05 de junho de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Limpeza e Afins harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC Nº 47/07. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008.
8. BRASIL., Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1990.

9. BRASIL., Portaria nº 2.031 de 23 de setembro de 2004. Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2004.
10. COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; SANTOS, T. M., Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungus from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 22, p. 881 – 885, 2006.
11. CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B., Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 57 – 61, 2002.
12. Determinação de atividade de proteases em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. In: **COMUNICADO técnico 62**. São Paulo: EMBRAPA, ANO. 1ª ed., 2005.
13. Determination of α -amylase activity. In: **ANALYTICAL Method**. Denmark: Novozymes® A/S, ANO. p. 1 – 7, (2000-10338-01), 2001.
14. Determination of lipase/esterase activity. In: **ANALYTICAL Method**. Denmark: Novozymes® A/S, ANO. p. 1 – 17, (2003-32137-04), 2004.
15. Determination of protease activity using the substrate azocasein. In: **ANALYTICAL Method**. Denmark: Novozymes® A/S, ANO. p. 1 – 9, (2004-11076-01), 2001.
16. FRIEDMAN, S. D.; BARKIN, S. M., Enzymic activity of protease in detergent systems: comparison of assay methods and the role of interfering substances. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 46, p. 81 – 84, 1969.
17. FUWA, H., A new method for microdetermination of amylase activity by use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583 – 603, 1954.
18. Gandhi, N. N. Applications of lipase-Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 74, n. 6, p. 621 – 634, 1997. Disponível em: www.springerlink.com/content/w744h2751757w077/>. Acesso em: 16 set. 2009.
19. GODFREY, T. Industrial Enzymology. **Stockton Press**, New York, p. 609, 1996.

20. INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007.
21. IUBMB, **Enzyme Nomenclature**: Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology Academic Press, San Diego, 1992.
22. KIELING, D. D., **Enzimas - Aspectos Gerais**. Santa Catarina: UFSC. Desenvolvimento de material didático ou instrucional – Apostila, p. 1 – 13, 2002.
23. LABORATÓRIO virtual. **Instituto de bioquímica médica UFRJ**. Disponível em <www.bioqmed.ufrj.br/enzimas/lab.htm> . Acesso em: 16 set. 2009.
24. LABORATÓRIO virtual. **Instituto de bioquímica médica UFRJ**. Disponível em <www.bioqmed.ufrj.br/enzimas/biotecnoaplica.htm> . Acesso em: 16 set. 2009.
25. LUZ, F. F., **Desenvolvimento de um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS.
26. MACEDO, A. J.; SILVA, W. O. B.; TERMIGNONI, C., Properties of a non collagen-degrading *bacillus subtilis* keratinase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 180 – 188, 2008.
27. MARTINS, M. L. L.; NASCIMENTO, W. C. A, Studies on the stability of protease from *bacillus* sp. And its compatibility with commercial detergent. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 307 – 311, 2006.
28. MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 – 428, 1959.
29. MITIDIÈRE, S., et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biociência**, v. 5, n. 26, p. 56 – 60, 2002.
30. MITIDIÈRE, S., **Produção de enzimas hidrolíticas para formulação de detergentes biodegradáveis**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2003. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS.

31. MOTTA, V. T., Bioquímica básica. Autolab Análises Clínicas – Apostila, 2009. Disponível em < www.ebah.com.br > . Acesso em: 13 ago. 2009.
32. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) - Units of Enzyme Activity - Recommendations 1986. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**. Disponível em <www.reference-global.com/doi/abs/10.1515/bchm3.1986.367.1.1>. Acesso em: 15 ago. 2009.
33. PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B., Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *rhizopus* sp. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 23, p. 135 – 140, 2003.
34. PEBERDY, J. F., Protein secretion in filamentous fungi-trying to understand a highly productive black box. **Trends Biotechnol**, v. 12, p. 50-57, 1994.
35. PRAZERES, J. N.; PASTORE, G. M.; CRUZ, J. A. B., Characterization of alkaline lipase from *fusarium oxisporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 505 – 509, 2006.
36. SILVA, A. S., **Avaliação dos resultados dos ensaios realizados no Departamento e Química, em saneantes com ação antimicrobiana, encaminhados ao INCQS**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006. Monografia (Especialização). Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
37. SILVA, A. S., **Estudo das formulações e metodologias analíticas de saneantes domissanitários com ação antimicrobiana, de uso hospitalar, com registro em 2004 e 2005**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
38. SILVA, W. O. B., Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 829 – 834, 2009.
39. SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. Minas Gerais: **Universidade Federal de Minas Gerais/Faculdade de Farmácia/Departamento de Alimentos**, 2005.

40.WAINWRIGHT, M., Novel uses for fungi in biotechnology. **ChemInd**, v. 15, p. 31-34, 1990.