

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Rômulo Pereira De Jesus

**VALIDAÇÃO ANALÍTICA INTRALABORATORIAL DO MÉTODO DE
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS**

Rio de Janeiro

2024

Rômulo Pereira de Jesus

VALIDAÇÃO ANALÍTICA INTRALABORATORIAL DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO
DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do Certificado de conclusão do Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutora : Adriana Sant'ana da Silva.

Preceptores : Ana Lúcia Ribeiro de Barros e
Leonardo de Souza Lopes.

Rio de Janeiro

2024

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Jesus, Rômulo Pereira de

Validação analítica intralaboratorial do Método de Determinação da Atividade Amilolítica em detergentes enzimáticos. / Rômulo Pereira de Jesus. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2024. 63 f.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2024.

Tutora: Adriana Sant'Ana da Silva.

Preceptores: Leonardo de Souza Lopes e Ana Lúcia Ribeiro de Barros.

1. Amilases. 2. Detergente enzimático. 3. Estudo de validação. 4. Vigilância Sanitária. I. Título.

Intralaboratory Analytical Validation of the Method for Determination of Amylolytic Activity in Enzymatic Detergents.

Rômulo Pereira de Jesus

VALIDAÇÃO ANALÍTICA INTRALABORATORIAL DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO
DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS

Monografia apresentada ao curso de Residência Multiprofissional em Saúde na área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em _____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Lucia Helena Pinto Bastos
Fundação Oswaldo Cruz

Dr. José Luiz Neves de Aguiar
Fundação Oswaldo Cruz

Me. Lauro de Sena Laurentino
Fundação Oswaldo Cruz

Me. Adriana Sant'Ana da Silva – (Tutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Me. Leonardo de Souza Lopes – (Preceptor)
Fundação Oswaldo Cruz

Me. Ana Lúcia Ribeiro de Barros – (Preceptor)
Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

Os produtos saneantes são substâncias sujeitas à regulamentação pela autoridade sanitária devido à sua significativa relevância no âmbito da saúde pública. Entre tais agentes, destacam-se os detergentes, os quais constituem uma classe de saneantes amplamente empregada no processo de limpeza e higienização, muitos dos quais são formulados com a adição de enzimas, cujo propósito reside em aprimorar a eficiência da remoção de resíduos e sujidades em diversos materiais. O uso desses produtos têm evidenciado uma tendência de crescimento contínuo, sendo particularmente essencial em ambientes de assistência à saúde, onde instrumentos e equipamentos frequentemente entram em contato com fluidos corporais, como o sangue, e, antes de passarem pelo processo de esterilização, requerem uma limpeza minuciosa e eficaz. O mercado de saneantes destinados a estabelecimentos de saúde disponibiliza diversas formulações, algumas das quais contêm enzimas específicas, incluindo as amilases. Nesse contexto, o presente estudo realizará a validação de um método espectrofotométrico, concebido com o propósito de quantificar a atividade amilolítica presente nos detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS). O método analítico para a determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos demonstrou ser robusto, exato e preciso, culminando na obtenção de resultados reprodutíveis e confiáveis. Dessa forma, demonstrou-se apto para ser implementado nos laboratórios de controle de qualidade, proporcionando um importante recurso na avaliação destes produtos. Os achados deste estudo têm o potencial de contribuir substancialmente para a elaboração de uma resolução específica destinada à regulamentação dos detergentes enzimáticos no mercado brasileiro, representando um avanço relevante na área de saneantes e na promoção da saúde coletiva.

Palavras-chave: Amilase. Detergente enzimático. Validação. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Sanitizing products are substances subject to regulation by the health authority due to their significant relevance in the public health domain. Among such agents, detergents stand out, constituting a class of sanitizing agents widely employed in the cleaning and sanitation process, many of which are formulated with the addition of enzymes, whose purpose is to enhance the efficiency of residue and dirt removal on various materials. The use of these products has demonstrated a continuous growth trend, particularly essential in healthcare environments where instruments and equipment frequently come into contact with bodily fluids such as blood. Prior to undergoing the sterilization process, they require meticulous and effective cleaning. The sanitizing products market designed for healthcare establishments offers various formulations, some of which contain specific enzymes, including amylases. In this context, the present study aimed to validate a spectrophotometric method designed for the quantification of amylolytic activity in enzymatic detergents restricted to Healthcare Assistance Facilities (HAFs). The analytical method for determining the concentration of amylolytic activity in enzymatic detergents has proven to be robust, accurate, and precise, resulting in reproducible and reliable outcomes. Thus, it is suitable for implementation in quality control laboratories, providing a crucial tool in the evaluation of these products. The findings of this study have the potential to significantly contribute to the formulation of a Specific Resolution aimed at regulating enzymatic detergents in the Brazilian market, representing a relevant advancement in the field of sanitizing agents and the promotion of public health.

Keywords: Amylase. Enzymatic detergent. Validation. Health Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Historico da qualidade Detergentes Enzimáticos no Brasil (2002-2022).....	16
Figura 2 - Estrutura tridimensional da α -amilase	20
Figura 3 - Esquema ensaio de determinação de atividade amilolítica.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Absorbâncias dos padrões preparados a parti das soluções estoques de glicose 55,6 $\mu\text{mol/mL}^{-1}$	43
Tabela 2 - Cálculo conversão da unidade de medida	46
Tabela 3 - Ensaio de Recuperação	47
Tabela 4 - Repetibilidade do método: dosagens executadas no primeiro dia, analista 1..	48
Tabela 5 - Precisão intermediária: análises executadas em diferentes dias com analistas diferentes.....	49
Tabela 6 - Teste t para a comparação das variações do parâmetro 1 (comprimento de onda)	50
Tabela 7 - Teste t para a comparação das variações do parâmetro 2 (temperatura).....	50
Tabela 8 - Teste t para a comparação das variações do parâmetro 3 (pH)	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa x Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos INMETRO.....	24
Quadro 2 - Curva padrão de glicose.....	32
Quadro 3 - Variações no método para a determinação da robustez.....	40
Quadro 4 - Critério de aceitação para recuperação.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AACI	Associação Australiana de Controle de Infecções
Abs	Unidade de absorbância
ANOVA	Análise de Variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)
CMD	Concentração Média Determinada
CP	Consulta Pública
CV	Coeficiente de Variação
D.O.U	Diário Oficial da União
DPR _R	Desvio Padrão Relativo de Precisão Intermediária
DPR _r	Desvio Padrão Relativo de Repetitividade
DQ	Departamento de Química
EAS	Estabelecimentos de Assistência à Saúde
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Fuened	Fundação Ezequiel Dias
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Lacens	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LD	Limite de Detecção

LQ	Limite de Quantificação
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
PDB	Protein Data Bank
POP	Procedimento Operacional Padronizado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Visas	Vigilância Sanitária Estaduais e Municipais
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Histórico de estudos e avaliação da qualidade dos detergentes enzimáticos tensoativos	13
1.2	Detergentes com ação enzimática	16
1.3	Tensoativos	17
1.4	Enzimas amilolíticas: definição e classificação	19
1.4.1	Definição	19
1.4.2	Classificação das amilases	20
1.4.3	Uso de amilases para a produção de detergentes.....	21
1.5	Validação do método de ensaio	22
1.5.1	Seletividade.....	24
1.5.2	Faixa linear de trabalho.....	24
1.5.3	Linearidade	25
1.5.4	Limite de detecção e limite de quantificação do método	25
1.5.5	Exatidão / recuperação analítica	25
1.5.6	Precisão	25
1.5.6.1	<i>Repetitividade</i>	26
1.5.6.2	<i>Precisão intermediária</i>	26
1.5.7	Seletividade.....	26
1.5.8	Robustez	26
1.5.9	Ensaio de Recuperação	27
1.6	Justificativa	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Amostras de detergentes	30
3.2	Reagentes e equipamentos	30
3.3	Vidrarias	31

3.4	Métodos	31
3.4.1	Ensaio do método de determinação de atividade amilolítica.....	31
3.4.2	Preparação da amostra.....	36
3.4.3	Especificidade	36
3.4.4	Faixa linear de trabalho.....	36
3.4.5	Linearidade	36
3.4.6	Limite de detecção e limite de quantificação do método.....	37
3.4.7	Exatidão / recuperação	37
3.4.8	Precisão	38
3.4.8.1	<i>Repetitividade</i>	38
3.4.8.2	<i>Precisão intermediária</i>	39
3.4.9	Seletividade.....	39
3.4.10	Robustez	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Validação do método de determinação de atividade amilolítica	41
4.1.1	Especificidade	41
4.1.2	Faixa linear de trabalho	42
4.1.3	Linearidade.....	43
4.1.4	Limite de detecção e limite de quantificação	44
4.1.5	Recuperação analítica	44
4.1.6	Precisão.....	48
4.1.6.1	<i>Repetitividade</i>	48
4.1.6.2	<i>Precisão intermediária</i>	48
4.1.7	Robustez	50
4.2	Revisão pop 65.3110.064 determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos	52
4.2.1	Alterações Realizadas	52
5	CONCLUSÃO	55
6	PERSPECTIVAS	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE A	63

1 INTRODUÇÃO

A Vigilância Sanitária desempenha um papel crucial na gestão dos fatores de risco à saúde, concentrando seus esforços em ações predominantemente preventivas. (Brasil, 1999; Brasil, 2007) No âmbito dessas ações preventivas, a garantia da qualidade dos produtos enzimáticos assume uma importância substancial na redução dos riscos à saúde pública. Nesse contexto, a avaliação laboratorial desempenha um papel de destaque, fornecendo suporte essencial para as atividades executadas, exigindo resultados de alta confiabilidade (Costa, 2009; Rozenfeld, 2000).

O considerável crescimento no volume de mercadorias transacionadas comercialmente gerou a necessidade premente de regulamentar e controlar a circulação de produtos passíveis de afetar a saúde pública. A supervisão desses produtos, submetidos a um regime de vigilância rigorosa, é conduzida pelo Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), que consiste na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), bem como nas autoridades de vigilância sanitária dos níveis estadual e municipal (Visas), operando em conjunto com laboratórios oficiais, notadamente o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e os Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos Estados (Lacens) (Brasil, 1999; Brasil, 2007). Estes desempenham um papel crucial como fontes geradoras de dados capazes de catalisar ações da Vigilância Sanitária.

A Vigilância Sanitária de produtos abrange um conjunto de medidas projetadas para eliminar, reduzir ou prevenir ameaças à saúde pública e intervir nos problemas sanitários decorrentes do ambiente, da produção e distribuição de bens, bem como da prestação de serviços relacionados à saúde (Corrêa, 2010). Esse escopo engloba a regulação de bens de consumo e serviços de interesse para a saúde, abrangendo produtos que variam de medicamentos e insumos farmacêuticos a cosméticos e saneantes (Carvalho, 2012). Tais produtos só podem ser fabricados, embalados, importados, exportados, armazenados ou expedidos mediante autorização do Ministério da Saúde (DECRETO Nº 8.077/2013).

Os produtos saneantes são definidos, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 59 de 17 de dezembro de 2010 da Anvisa, como substâncias ou

preparações destinadas à aplicação em objetos, tecidos, superfícies inanimadas e ambientes, com o propósito de limpeza e tarefas relacionadas. Além disso, eles se estendem às áreas de desinfecção, desinfestação, sanitização, desodorização e odorização, bem como a desinfecção de água destinada ao consumo humano, bem como de produtos hortifrutícolas e piscinas. A sua utilização pode ser categorizada em produtos de venda livre, que são destinados à comercialização direta ao público ou uso profissional, e produtos que exigem aplicação ou manipulação exclusiva por profissionais devidamente qualificados ou empresas especializadas (Brasil, 2010).

Nos dias de hoje, assistimos a uma ampla adoção de procedimentos diversos para a limpeza de instrumentos cirúrgicos usados em Estabelecimentos de Assistência à Saúde (EAS) (Assoni, 2013; Oliveira, 2014). Dentre esses procedimentos, o uso de detergentes enzimáticos ganhou destaque, uma vez que esses produtos, através de suas enzimas e tensoativos, têm a finalidade de proporcionar uma limpeza rápida e eficaz, garantindo a preservação dos instrumentos e a segurança dos profissionais de saúde ao minimizar a exposição a riscos biológicos (Lopes, 2012).

A Resolução Nº 703/2022 estabelece o detergente enzimático como aquele que incorpora catalisadores biológicos que atuam na degradação específica de gorduras, proteínas e outras substâncias, fragmentando-as a fim de facilitar o processo de limpeza. A atividade enzimática desses detergentes deve ser confirmada, com a predominância de proteases (para a digestão de proteínas), embora também possam conter outras enzimas, como lipases (para a digestão de gorduras) e amilases (para a digestão de carboidratos).

1.1 Histórico de estudos e avaliação da qualidade dos detergentes enzimáticos tensoativos

Em 2002, o pesquisador Norman Cheetham, vinculado à Associação Australiana de Controle de Infecções, conduziu um estudo pioneiro que teve um impacto significativo no campo dos detergentes enzimáticos. Seu estudo comparativo envolveu 18 produtos enzimáticos diferentes e revelou uma variedade de padrões de digestão enzimática. Os resultados demonstraram que, dos 18 produtos testados, 7 deles não apresentaram

atividade enzimática, enquanto 3 mostraram apenas uma atividade leve. Outros 4 produtos exibiram uma atividade moderada, e 2 produtos se destacaram com alta atividade. Surpreendentemente, 2 produtos superaram as expectativas (Cheetham, 2002). Essa pesquisa destacou a importância de compreender as variações na eficácia dos detergentes enzimáticos, essenciais para a higienização em ambientes de assistência à saúde.

Em 2006, o Estado do Paraná enfrentou um desafio relacionado à eficácia dos detergentes enzimáticos. Hospitais na região relataram danos em equipamentos médicos devido a uma limpeza ineficaz. Além disso, a ausência de controle de qualidade por parte das empresas fabricantes de detergentes enzimáticos e a falta de parâmetros estabelecidos agravaram a situação. Isso levou à apresentação de denúncias à Anvisa, destacando a necessidade de regulamentação e controle mais rigoroso nessa área (Lopes, 2012).

A partir de 2008, foram iniciados debates e reuniões entre a Anvisa e o INCQS para abordar a regulamentação e os padrões de qualidade relacionados aos detergentes enzimáticos. Esse diálogo representou um passo crucial em direção à melhoria da segurança e da eficácia desses produtos no contexto dos cuidados de saúde (Lopes, 2012).

Em 21 de maio de 2009, a Anvisa publicou a Consulta Pública nº 27, conforme registrado no Diário Oficial da União (D.O.U) de 22 de maio de 2009. Essa consulta propôs a implementação de uma resolução que abordava o Regulamento Técnico para Produtos Detergentes Enzimáticos de Uso Restrito em EAS. O objetivo era estabelecer diretrizes mais rígidas para o controle e a segurança dos detergentes usados na limpeza de instrumentos cirúrgicos em ambientes de saúde.

A proposta da Anvisa significava que os detergentes enzimáticos utilizados em estabelecimentos de assistência à saúde precisam ser registrados na Agência, substituindo o processo de notificação que estava em vigor anteriormente. O registro agora implicava a necessidade de comprovar a atividade catalítica das enzimas presentes na formulação do produto por meio de laudos laboratoriais. Essa medida visava garantir a eficácia desses detergentes na limpeza de instrumentos cirúrgicos, uma

etapa fundamental para a reutilização segura ou para a preparação deles para desinfecção e esterilização subsequentes.

A Anvisa ressaltou a importância crítica da limpeza adequada dos instrumentos cirúrgicos, destacando que a falta disso poderia estar relacionada a surtos de infecções por Micobactérias. A regulamentação mais rigorosa visava contribuir para o controle dessas infecções, com a contaminação dos instrumentos sendo a causa provável.

Em 2010, uma colaboração significativa foi estabelecida entre o INCQS, a Fundação Ezequiel Dias (Funed), a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o setor privado. Essa parceria visou o desenvolvimento de métodos de avaliação da atividade enzimática em detergentes enzimáticos. Esse método tinha o potencial de fornecer diretrizes e regulamentos robustos para garantir a qualidade desses produtos e promover uma limpeza eficaz em ambientes de assistência à saúde (Lopes, 2012).

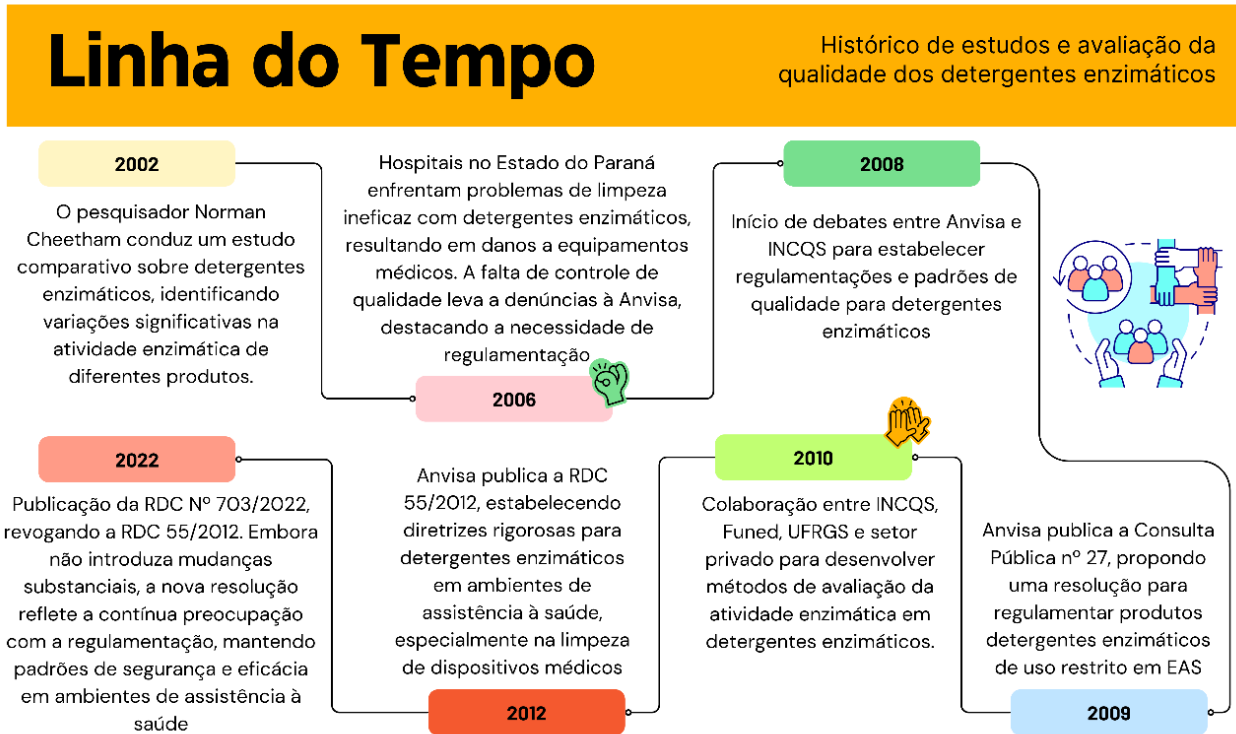
Em 2012, a Anvisa alcançou um marco importante ao publicar a RDC N° 55 de 2012 dispôs sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS, especialmente com indicação para a limpeza de dispositivos médicos. Essa resolução estabeleceu diretrizes rigorosas para o uso desses produtos, a partir desta resolução os produtos enzimáticos de uso em EAS passaram a ser submetidos a rigorosa avaliação para concessão de registro, além de apresentar dois métodos enzimáticos para determinação de atividade enzimática de enzimas proteolíticas e amilolíticas, representando um avanço significativo na regulamentação e na promoção da segurança e higiene em ambientes de assistência à saúde no Brasil.

A resolução atual vigente, a RDC N° 703 de 2022, foi estabelecida. Esta resolução dispõe sobre detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS com indicação para a limpeza de dispositivos médicos. Vale ressaltar que a RDC N° 703 de 2022 revogou a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 55 de 2012. Embora não tenha introduzido mudanças substanciais em relação à resolução anterior, ela reflete a contínua preocupação com a regulamentação e o controle desses produtos, mantendo os padrões de segurança e eficácia em ambientes de assistência à saúde.

A linha do tempo apresentada na Figura 1 ilustra o desenvolvimento e a regulamentação dos detergentes enzimáticos em ambientes de assistência à saúde no Brasil. Esta cronologia destaca o compromisso contínuo com a segurança e eficácia na

limpeza de dispositivos médicos, evidenciando o progresso e a evolução nas práticas de higienização em EAS.

Figura 1 - Histórico da qualidade Detergentes Enzimáticos no Brasil (2002-2022)



Fonte: O autor (2024).

1.2 Detergentes com ação enzimática

Os detergentes contemporâneos ostentam um espectro de aplicação notável, requerendo, por conseguinte, especialização nas formulações. Uma notável alteração em relação aos produtos convencionais reside na incorporação de enzimas em substituição a inúmeros componentes inapropriados, tais como substâncias cáusticas, ácidos e solventes tóxicos, cuja presença incita a degradação de materiais e instrumentos (Bueno, 2018; Blanco Centurión, 2019).

O acentuado interesse pela preservação ambiental tem incitado os fabricantes a reexaminar as formulações existentes. Nas formulações mais recentes, tais componentes impróprios, outrora utilizados, foram substituídos por enzimas, as quais mantêm a mesma eficácia dos produtos anteriores (Vojcic, 2015). O uso de enzimas como princípios ativos

em detergentes apresenta a notável vantagem de serem completamente biodegradáveis, assim mitigando o impacto ambiental decorrente desta classe de produtos (Vojcic, 2015).

A diversidade de aplicações das enzimas deriva de sua capacidade de atuar como biocatalisadores especializados (Souza, 2017). Estas enzimas, incorporadas às formulações de detergentes utilizados em âmbitos hospitalares, domésticos e industriais, desempenham o papel de digestores de resíduos orgânicos, tais como alimentos, sangue, fezes, urina, vômito e diversas manchas. Adicionalmente, elas promovem a higienização de componentes internos e externos de instrumentos cirúrgicos, a desobstrução de canais entupidos com resíduos e substâncias coaguladas, a remoção de detritos fecais de canais e superfícies de fibroscópios e a eliminação de contaminantes em itens têxteis hospitalares (Herrin, 2016).

A utilização de detergentes enzimáticos no âmbito hospitalar é uma realidade em contínuo crescimento (Blanco Centurión, 2019). Os instrumentos médicos empregados em diversas especialidades, que entram em contato com substâncias orgânicas críticas do ponto de vista sanitário, como sangue e outros fluidos corporais, requerem uma eficiente ação de limpeza prévia aos procedimentos de esterilização (Albrecht, 2013).

1.3 Tensoativos

Os tensoativos, também conhecidos como surfactantes, constituem uma classe crucial de compostos químicos cuja utilização se estende por diversos segmentos industriais. São moléculas anfipáticas caracterizadas pela presença de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, Isso significa que essas moléculas têm uma parte polar, que interage bem com a água, e uma parte apolar, que não interage tão bem com a água. A fração apolar frequentemente se manifesta sob a forma de uma cadeia hidrocarbonada, ao passo que a fração polar pode ser subdividida em iônica (aniônica, catiônica ou anfotérica) ou não iônica (Brasil, 2006).

Em virtude da coexistência de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma estrutura molecular, os tensoativos têm a propensão a se posicionar nas interfaces entre fases fluidas com distintos graus de polaridade, como nos sistemas óleo/água e água/óleo. A formação de um filme molecular altamente organizado nas interfaces resulta

na redução da tensão interfacial e superficial, conferindo-lhes propriedades únicas (Daltin, 2011).

O termo "tensoativo" foi universalmente adotado, a partir de 1950, para descrever substâncias orgânicas dotadas de estrutura e propriedades distintas. Entre essas características, destacam-se as capacidades de detergência, emulsificação, lubrificação, espumação, molhamento, solubilização e dispersão de fases. De maneira intercambiável, o termo "detergente" é empregado para designar um tensoativo. Enquanto se refere a substâncias capazes de realizar funções de limpeza, o conceito de detergente pode incluir, ocasionalmente, substâncias inorgânicas que efetivamente desempenham atividades de limpeza. Em sua maioria, entretanto, "detergente" se refere a uma combinação de tensoativos com outros compostos orgânicos ou inorgânicos, como corantes e aromatizantes, formulados para otimizar o desempenho funcional, notadamente em termos de limpeza (Daltin, 2011).

Consoante à RDC N° 694 de 2022, um detergente é definido como um produto destinado à limpeza de superfícies e tecidos por meio da redução da tensão superficial. Formulações modernas de detergentes podem compreender vinte ou mais ingredientes, variando de acordo com a função específica que o produto deve desempenhar. A combinação precisa de várias matérias-primas objetiva alcançar a melhor relação custo/benefício, obedecer a critérios de estabilidade e atender a propriedades físicas preestabelecidas. Adicionalmente, a formulação de detergentes deve ser suficientemente robusta para permitir sua produção em escala industrial, além de cumprir diversas especificações (Brasil, 2022).

Os tensoativos desempenham um papel crucial em uma variedade de setores industriais. Sua utilização é mais proeminente na fabricação de produtos de limpeza, como sabões e detergentes, bem como na indústria de petróleo e na produção de cosméticos e itens de higiene pessoal. Além disso, eles encontram aplicação em áreas como a recuperação de óleos a partir de resíduos, na nanoengenharia, na formulação de tintas, no desenvolvimento de polímeros sintéticos, na preparação de pesticidas, no processamento de materiais têxteis e lubrificantes. Também desempenham um papel importante em aplicações médicas, principalmente na esterilização de utensílios e instrumentos (Daltin, 2011).

1.4 Enzimas amilolíticas: definição e classificação

1.4.1 Definição

No âmbito da aplicação de detergentes enzimáticos na área de saúde, é crucial compreender as definições e classificações estabelecidas pela RDC N° 703 de 2022. Essa resolução estabelece padrões e requisitos técnicos para produtos categorizados como detergentes enzimáticos, com ênfase especial nos detergentes enzimáticos para limpeza de dispositivos médicos.

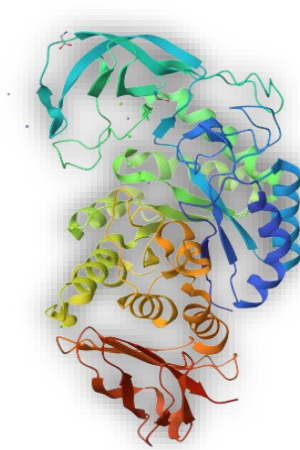
Conforme estipulado no Artigo 3º, inciso II, dessa resolução, um detergente enzimático para limpeza de dispositivos médicos é um produto cuja formulação é composta, além de um tensoativo, por pelo menos uma enzima hidrolítica pertencente à subclasse das proteases EC 3.4. Além disso, esse detergente pode conter outra enzima da subclasse das amilases EC 3.2, Figura 2, bem como outros componentes complementares da formulação, inclusive enzimas de diferentes subclasses. O propósito fundamental desse tipo de detergente é a remoção eficaz da sujidade clínica e a prevenção da formação de compostos insolúveis na superfície de dispositivos médicos. Compreender essa definição é fundamental para a apreciação das propriedades e aplicações desses detergentes na área de saúde (Brasil, 2022).

A aplicação de detergentes enzimáticos na área da saúde abrange diversas esferas, incluindo a limpeza de equipamentos cirúrgicos e instrumentos, a higienização de endoscópios e dispositivos invasivos, a remoção de sujidade e manchas em roupas e tecidos hospitalares, a limpeza de superfícies e ambientes clínicos, e a manutenção de materiais de laboratório (Albrecht, 2013; Vieira, 2019)

As enzimas presentes nas formulações dos detergentes, ilustradas na Figura 2, desempenham um papel essencial, atuando na digestão e dissolução de resíduos orgânicos, como proteínas, amidos e outros compostos relacionados à sujidade clínica (Flores, 2015). Em ambientes hospitalares, essas enzimas são vitais para a higienização das partes externas e internas de dispositivos médicos, onde a limpeza mecânica não é

possível, a remoção de bloqueios causados por resíduos e coágulos e a eliminação de contaminantes de roupas hospitalares. Assim, a aplicação dessas enzimas desempenha um papel fundamental na manutenção de padrões elevados de higiene e segurança em EAS (Moraes, 2023).

Figura 2 - Estrutura tridimensional da α -amilase



Fonte: Protein Data Bank (PDB) - 4UZU.

1.4.2 Classificação das amilases

As enzimas amilolíticas são classificadas de acordo com a sua função e tipo de reação catalisada (Mitidieri, 2006; Guzmán-Maldonado, 1995; Horvathova, 2001; Machovic, 2007). Elas atuam na hidrólise de amido e outros polissacarídeos. As principais subclasses de enzimas amilolíticas incluem:

Amilases: As amilases constituem uma classe de enzimas hidrolíticas, pertencentes à categoria EC 3.2, com a capacidade intrínseca de catalisar a clivagem de ligações glicosídicas presentes em polissacarídeos. Notavelmente prevalentes no grupo amilolítico, as amilases desempenham um papel proeminente na hidrólise do amido, promovendo a conversão deste polissacarídeo em açúcares de menor complexidade, tais como maltose, glicose e dextrinas. As amilases podem ser subdivididas em:

- Alfa-amilases: Atuam na quebra do amido interno das moléculas, resultando em maltose e dextrinas.

- **Beta-amilases:** Atuam na extremidade não redutora do amido, liberando maltose.

Glicoamilases: Essas enzimas hidrolisam amido, mas também são eficazes na degradação de outros polissacarídeos contendo ligações glicosídicas, como a celulose e a hemicelulose.

Amiloglucosidases: Também conhecidas como maltase, essas enzimas atuam na hidrólise de dissacarídeos, como a maltose, liberando glicose.

Amilopectinases: Especificamente direcionadas à amilopectina, uma das frações do amido, essas enzimas auxiliam na quebra de ligações glicosídicas internas.

Essas subclasses de enzimas amilolíticas desempenham papéis fundamentais em processos biológicos e industriais, onde a hidrólise do amido é necessária (Mitidieri, 2006; Guzmán-Maldonado, 1995; Horvathova, 2001; Machovic, 2007). Além disso, elas são frequentemente utilizadas em produtos como detergentes enzimáticos para auxiliar na remoção eficaz de resíduos orgânicos, incluindo amido, de superfícies e dispositivos médicos (Herrin, 2016; Kothekar, 2020).

1.4.3 Uso de amilases para a produção de detergentes

A produção de detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS representa uma área de crescente interesse e pesquisa no campo da biotecnologia aplicada (Blanco Centurión, 2017; Souza, 2017). Entre as enzimas-chave empregadas nesse contexto, as amilases desempenham um papel destacado devido à sua capacidade de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas, permitindo a degradação eficaz de resíduos orgânicos, como amido, em superfícies e instrumentos médicos. No entanto, a presença persistente de amido pode representar um risco considerável para as superfícies dos instrumentos, uma vez que a sua acumulação pode levar à formação de biofilmes, favorecendo o crescimento de microrganismos indesejados e comprometendo a eficácia dos procedimentos de esterilização. Assim, a remoção adequada de resíduos de amido é crucial para manter a integridade e a segurança dos instrumentos médicos, prevenindo potenciais complicações relacionadas à contaminação microbiológica. (Souza, 2017).

As amilases são uma classe de enzimas hidrolíticas pertencentes à categoria EC 3.2, capazes de catalisar a quebra de ligações glicosídicas em polissacarídeos, especificamente no caso do amido, um polissacarídeo amplamente presente em materiais e resíduos comuns em ambientes hospitalares (Brasil, 2022). Essas enzimas atuam hidrolisando as ligações entre as unidades de glicose, convertendo o amido em fragmentos solúveis, que podem ser facilmente removidos por meio de procedimentos de limpeza e enxágue (Herrin, 2016; Kotheekar, 2020).

A inclusão de amilases em formulações de detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS visa otimizar a eficácia da limpeza de instrumentos cirúrgicos, utensílios e superfícies contaminadas por resíduos biológicos (MAURER, 2016). Essa abordagem baseada em enzimas permite uma ação mais precisa e eficiente na remoção de sujidades orgânicas, diminuindo a probabilidade de contaminação cruzada e reduzindo a carga microbiana (Schmidt, 2008).

A pesquisa contínua no desenvolvimento de detergentes enzimáticos que incorporam amilases visa aprimorar as formulações, otimizar as condições de uso e garantir a máxima eficiência na limpeza de materiais (Souza, 2019; Luz, 2007). Esses avanços contribuem significativamente para a segurança dos pacientes e profissionais de saúde, reduzindo o risco de infecções hospitalares e aumentando a eficácia do processo de esterilização, um passo crítico na cadeia de higienização (Petrucci, 2006; Pereira, 2005).

O contínuo aperfeiçoamento dessas formulações representa uma área de pesquisa promissora na busca por soluções mais eficazes no controle da contaminação em contextos hospitalares (Lopes, 2012).

1.5 Validação do método de ensaio

A validação de métodos analíticos, conforme estabelecido na RDC N° 166 de 2017 da Anvisa, e no "Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos DOQ-CGCRE-008 Revisão 09 – JUN/2020" do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), representa um processo técnico rigoroso e indispensável. Esses documentos normativos procuram garantir a confiabilidade, precisão e robustez dos

métodos analíticos utilizados em diversas áreas, incluindo a indústria farmacêutica e de saúde.

A RDC N° 166 de 2017, estabelece critérios restritos e requisitos técnicos detalhados, incluindo a avaliação de parâmetros críticos, como especificidade, linearidade, faixa linear, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. A conformidade com essas diretrizes é essencial para garantir que os métodos analíticos atendam aos padrões de qualidade necessários para a tomada de decisões relacionadas à qualidade e segurança dos produtos na indústria de saúde.

Por outro lado, o "Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO DOQ-CGCRE-008 Revisão 09 – JUN/2020," enfoca a acreditação de laboratórios de ensaio e calibração. Esta orientação normativa estabelece diretrizes técnicas e administrativas abrangentes para garantir que esses laboratórios atendam aos mais elevados padrões de competência técnica e recursos. Ela abrange a avaliação detalhada de competência técnica, requisitos de recursos e análise profunda de parâmetros analíticos críticos, como seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, exatidão e precisão. A Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO enfatiza a importância de processos robustos e competência técnica na obtenção de resultados analíticos precisos e confiáveis.

Portanto, a RDC N° 166 de 2017 e o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO são instrumentos normativos essenciais que, quando aplicados conjuntamente, vide Quadro 1, contribuem para a garantia da qualidade e confiabilidade dos resultados analíticos em laboratórios e na indústria, com foco na segurança e eficácia dos produtos relacionados à saúde pública.

Quadro 1 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa x Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos INMETRO

Parâmetros	ANVISA	INMETRO
Faixa linear de trabalho	S	S
Linearidade	S	S
Limite de Detecção	S	S
Limite de Quantificação	S	S
Exatidão / Recuperação	S	S
Precisão /Repetibilidade	S	S
Precisão Intermediária	S	S
Seletividade / Efeito Matriz	S	S
Robustez	S	N

Legenda : S = sim N = não.

Fonte: Adaptado de (BRASIL,2017; INMETRO, 2020).

1.5.1 Seletividade

A RDC N° 166 de 2017 e o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO estabelecem que a especificidade de um método analítico deve ser avaliada. Isso envolve a demonstração de que o método é seletivo para a substância ou analito de interesse, evitando interferências de outros componentes da matriz. Os critérios e procedimentos para avaliação da especificidade são detalhados em ambas as normativas.

1.5.2 Faixa linear de trabalho

A RDC N° 166 de 2017 e o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO definem a faixa linear de trabalho como a faixa de concentração em que o método analítico é capaz de produzir resultados linearmente proporcionais à concentração do analito. A determinação desta faixa é crucial para garantir que o método seja aplicável ao intervalo de concentrações relevantes.

1.5.3 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de produzir respostas proporcionais às mudanças na concentração do analito dentro da faixa linear. A avaliação da linearidade é realizada de acordo com critérios específicos, definidos em ambas as normativas (Brasil,2017; Inmetro, 2020).

1.5.4 Limite de detecção e limite de quantificação do método

Tanto a RDC N° 166 DE 2017 quanto o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO exigem a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) do método. Esses limites representam os níveis mínimos de concentração em que o analito pode ser detectado e quantificado com precisão. Métodos específicos para cálculo e avaliação desses limites são descritos em ambos os documentos.

1.5.5 Exatidão / recuperação analítica

A exatidão, ou recuperação analítica, é um aspecto crítico abordado na RDC N° 166 DE 2017 e no Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO. Ela envolve a comparação entre a concentração conhecida e a concentração recuperada do analito em amostras de ensaio. A norma estabelece critérios para aceitação da exatidão, garantindo que os resultados estejam próximos dos valores esperados.

1.5.6 Precisão

A precisão, conforme delineada nas normativas, engloba três componentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Ela representa a capacidade do método de produzir resultados consistentes e próximos entre si em várias condições e com diferentes operadores (Brasil,2017; Inmetro, 2020).

1.5.6.1 *Repetitividade*

A repetibilidade, ou precisão intraensaio, refere-se à variação dos resultados quando o mesmo analito é repetidamente analisado sob as mesmas condições pelo mesmo operador. Tanto a RDC N° 166 DE 2017 quanto o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO estabelecem critérios para avaliar e aceitar a repetitividade.

1.5.6.2 *Precisão intermediária*

A precisão intermediária, ou precisão interensaio, avalia a variação dos resultados quando o mesmo analito é analisado em diferentes momentos e por diferentes operadores. Ambos os documentos normativos estabelecem critérios para a avaliação e aceitação da precisão intermediária (Brasil,2017; Inmetro, 2020).

1.5.7 Seletividade

A seletividade é fundamental, especialmente em métodos que lidam com matrizes complexas. Ambas as normativas abordam a avaliação da seletividade, garantindo que o método seja seletivo para o analito de interesse, mesmo em presença de outros componentes da matriz (Brasil,2017; Inmetro, 2020).

1.5.8 Robustez

A robustez, conforme preconizado na RDC N° 166 DE 2017 , é a capacidade do método de manter sua precisão e exatidão sob variações deliberadas de condições experimentais. Essa característica é importante para avaliar a estabilidade do método em diferentes cenários.

1.5.9 Ensaio de Recuperação

O ensaio de recuperação do analito desempenha um papel fundamental na validação de métodos analíticos, conforme preconizado no Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO. Essa avaliação é realizada por meio da análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, um processo conhecido como "*spike*". É importante notar que essas amostras de *spike* devem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, abrangendo a faixa de uso do método, ou seja, concentrações baixas, médias e altas (Inmetro, 2020).

1.6 Justificativa

O presente Trabalho visa abordar a temática dos detergentes enzimáticos, uma classe de saneantes de extrema importância para a saúde pública e, em particular, para ambientes de assistência à saúde (Brasil, 2010). A crescente utilização desses produtos, especialmente em EAS, ressalta a necessidade de estudos que validem métodos analíticos capazes de garantir a eficácia e segurança desses produtos (Lopes, 2012).

A ênfase na utilização de detergentes enzimáticos em ambientes de assistência à saúde, onde a limpeza minuciosa é imperativa, aponta para a necessidade de métodos de avaliação robustos e precisos (Blanco Centurión, 2017). Nesse contexto, o estudo propõe a validação de um método espectrofotométrico para quantificar a atividade amilolítica presente nesses detergentes, destinados ao uso restrito em EAS (Blanco Centurión, 2019).

A implementação bem-sucedida deste método em laboratórios de controle de qualidade é crucial para assegurar a efetividade dos detergentes enzimáticos utilizados em ambientes críticos, como os EAS. Além disso este estudo têm o potencial de contribuir para a elaboração de uma resolução específica destinada à regulamentação dos detergentes enzimáticos no mercado brasileiro.

Assim, o presente TCR não apenas preenche uma lacuna no conhecimento científico relacionado aos métodos de avaliação desses produtos, mas também propõe avanços significativos na área de saneantes, fornecendo subsídios importantes para a promoção da saúde coletiva. A pesquisa destaca-se pela sua relevância prática,

oferecendo uma contribuição valiosa para a implementação de regulamentações mais específicas e eficazes nesse segmento, consolidando-se como um marco no avanço da qualidade e segurança dos detergentes enzimáticos no contexto brasileiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar o método espectrofotométrico de quantificação da atividade amilolítica presente em detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS descrito na RDC N° 703 de 2022, em conformidade com as diretrizes estabelecidas na RDC N° 166 DE 2017 da Anvisa e no Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, publicado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar experimentos de validação do método espectrofotométrico, seguindo as etapas recomendadas da RDC N° 166 de 2017 & Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, para verificar sua robustez, linearidade, limite de detecção e quantificação, seletividade, precisão e exatidão.
- Realizar a revisão do Procedimento Operacional Padrão (POP) 65.3110.064 Revisão 02 (Determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos), contemplando as atualizações necessárias para incorporar os resultados e conclusões da validação do método em questão. Adequar à metodologia especificada na RDC N° 703 de 2022, garantindo conformidade com as diretrizes vigentes da Anvisa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de detergentes

Para validação do método enzimático foi escolhida como amostra de trabalho o detergente multienzimático com validade 08/09/2024. A composição de cada amostra, assim como a diluição de uso recomendada pelo fabricante, estão reunidas no Apêndice A.

O extrato enzimático empregado neste estudo foi obtido por meio da disponibilização pela empresa Quimisa, adquirida pela Brenntag em 2019, para fins de pesquisa.

3.2 Reagentes e equipamentos

O presente trabalho empregou diversos reagentes de alta pureza para garantir a precisão e confiabilidade dos resultados obtidos.

Destaca-se que a escolha desses reagentes e de seus fornecedores foi fundamentada na busca por materiais de alta qualidade e pureza, assegurando assim a robustez e confiabilidade dos dados experimentais e atendem aos critérios de aceitação que foram previamente estabelecidos em cada parâmetro avaliado na validação. O Amido solúvel, Ácido cítrico monohidratado, Fosfato de sódio dibásico, Ácido 3,5 dinitrosalicílico, Glicose, Hidróxido de sódio, Metabissulfito de sódio e Fenol foram adquiridos da marca Sigma – Aldrich, reconhecida por sua excelência em produtos químicos para pesquisa. O Tartarato de sódio e potássio, por sua vez, foi fornecido pela Êxodo Científica, empresa reconhecida por sua contribuição no fornecimento de reagentes de alta qualidade.

O êxito deste projeto foi viabilizado pelo emprego de equipamentos adequados, provenientes de fabricantes reconhecidos por sua excelência.

A escolha desses equipamentos foi criteriosa, visando garantir precisão e confiabilidade nas análises realizadas e atendem aos critérios de aceitação que foram previamente estabelecidos em cada parâmetro avaliado na validação. O

Espectrofotômetro UV-VIS Hitachi U2900, das empresas Hitachi e Varian, destaca-se pela sua capacidade de proporcionar medidas precisas de absorção, contribuindo assim para a qualidade dos resultados obtidos. A Balança analítica Mettler Toledo AG 204, proveniente da Mettler Toledo, oferece precisão e exatidão nas pesagens, essenciais para a exatidão das preparações. Os banhos termostáticos da Splabor e Sieger garantem condições controladas durante as reações, enquanto o Cronômetro digital da Unilab assegura a precisão no registro do tempo. O Agitador vórtex MSX da Dlab foi utilizado para homogeneização eficaz das amostras.

3.3 Vidrarias

Para execução deste trabalho, vale salientar que as vidrarias utilizadas, micropipetas volumétricas e balões volumétricos, apresentam certificado de calibração rastreáveis à Rede Brasileira de Calibração, e atendem aos critérios de aceitação que foram previamente estabelecidos em cada parâmetro avaliado na validação.

3.4 Métodos

Os ensaios foram realizados no setor de Cosméticos e Saneantes do Departamento de Química do INCQS, na Fiocruz, no período de abril de 2023 a setembro de 2023.

3.4.1 Ensaio do método de determinação de atividade amilolítica

Construiu-se uma curva analítica de glicose. Transferindo 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 μL da solução padrão de glicose $55,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para tubos de ensaio com tampa. Adicionar respectivamente 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480 e 460 μL de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0, conforme Quadro 2.

Quadro 2 - Cruva padrão de glicose

tubo de ensaio	Volume da solução de glicose 1% (μL)	Volume de tampão (μL)	Conc. final de glicose ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$)
0	0	600	0
1	20	580	0,065
2	40	560	0,130
3	60	540	0,195
4	80	520	0,260
5	100	500	0,325
6	120	480	0,390
7	140	460	0,456

Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2022).

Foi adicionado 1,5 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em cada tubo de ensaio. Todos os tubos foram fervidos por 5 minutos em um banho termostático (100°C). Após a etapa de fervura, os tubos foram resfriados transferindo-os para um béquer contendo água à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foi adicionado 15 mL de água destilada em cada tubo. Os tubos foram agitados utilizando um agitador vortex. As leituras de absorvância de cada tubo de ensaio foram realizadas em um espectrofotômetro a 550 nm. Foi construída uma curva analítica para a glicose, plotando a concentração de glicose em $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ no eixo x e a absorvância no eixo y. O primeiro ponto (Tubo 1, $0\mu\text{L}$ de glicose) foi utilizado como zero do equipamento. A partir dos dados da curva analítica, a equação da reta foi utilizada para calcular as concentrações de glicose nas amostras de interesse com base nas leituras de absorvância.

Esta curva analítica permite relacionar a absorvância medida com a concentração de glicose nas amostras, fornecendo uma ferramenta para a quantificação precisa de glicose em suas amostras experimentais.

Cálculo da concentração na curva analítica ($\mu\text{mol. mL}^{-1}$):

$$x = \frac{y-b}{a} \Rightarrow c = \frac{(Aa-Ab)-b}{a} \quad (1:6)$$

onde: c = concentração, em $\mu\text{mol.mL}^{-1}$

Aa = absorbância da amostra

Ab = absorbância do branco da amostra

b = coeficiente linear

a = coeficiente angular

A construção da curva analítica de glicose, conforme descrito anteriormente, desempenha um papel fundamental na determinação precisa da concentração de glicose em amostras de interesse. Após a etapa de construção da curva de glicose, partiremos para o ensaio das amostras de detergente enzimático.

Em um tubo de ensaio com tampa, adicionado 300 μL de tampão citrato-fosfato 0,05M. Adicionado 200 μL de solução de amido solúvel 1% ao mesmo tubo de ensaio. Incube o tubo amostra em um banho termostático a $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ e aguarde até que atinja o equilíbrio térmico, o que deve levar aproximadamente de 1 a 2 minutos. Realize um branco para cada replicata, substituindo o volume do substrato por tampão. Este amostra branco será lido juntamente com a amostra. Realize um ensaio em branco sem adição de amostra, substituindo o volume da amostra por tampão. Este branco ensaio será usado para zerar o espectrofotômetro no comprimento de onda do ensaio (550nm). Adicionado em cada tubo de ensaio 100 μL de amostra em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições. Deixe os tubos no banho termostático por 30 minutos para que a reação ocorra. Pare 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 de ensaio. Ferva os tubos por 5 minutos em banho termostático. Após a etapa de fervura, resfrie os tubos transferindo-os para outro becher contendo água a temperatura ambiente. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, adicionado 15 mL de água destilada a cada um. Agite os tubos de ensaio com auxílio do agitador vortex. Realize as leituras em um espectrofotômetro a 550nm. Determine a concentração de açúcares redutores utilizando

a curva analítica de glicose. Para maior compreensão a Figura 3 mostra o Esquema ensaio de determinação de atividade amilolítica.

Este método permite a determinação da atividade amilolítica com base na medida da concentração de açúcares redutores gerados pela ação da amilase sobre o amido solúvel. O espectrofotômetro a 550nm é usado para medir a concentração de açúcares redutores, e a curva analítica de glicose serve como padrão de referência para essa determinação.

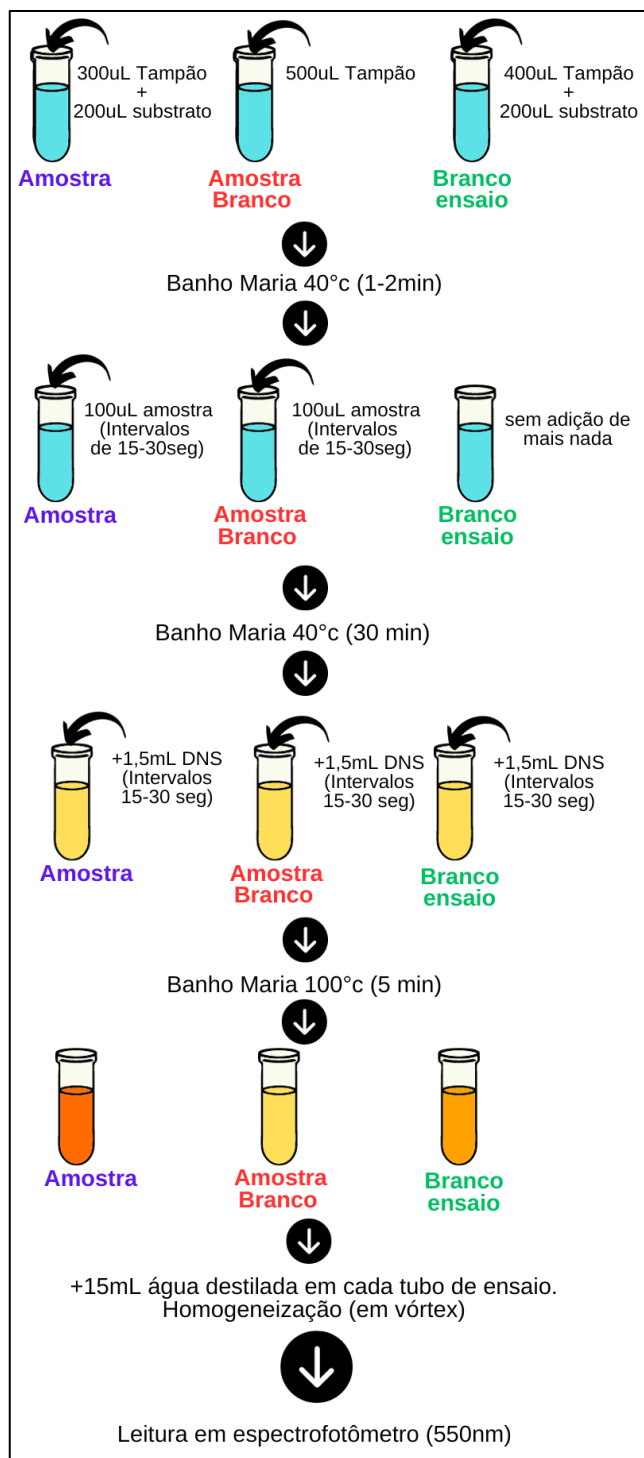
A atividade amilolítica foi determinada através da seguinte expressão:

$$UA. mL^{-1} = \frac{C.10}{30} \quad (2:6)$$

onde: C = concentração de açúcares redutores na amostra ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$), determinada através da curva analítica de glicose. 30 = tempo total do ensaio (30 minutos)

Segundo a RDC N° 703 de 2022 a definição da unidade de atividade amilolítica (UA.mL⁻¹) é a quantidade de enzima necessaria para liberar 1 mmol de açúcares redutores por mL por minuto .

Figura 3 - Esquema ensaio de determinação de atividade amilolítica



Fonte: Adaptado da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2022).

3.4.2 Preparação da amostra

Para a validação do método enzimático a amostra de trabalho detergente multienzimático foram preparadas de acordo com a diluição de uso manual recomendada pelo fabricante, adicionando-se 100 μ L em 25 mL de água destilada.

3.4.3 Especificidade

Na avaliação da especificidade foram realizadas varreduras de 400 a 700 nm de espectros de absorção molecular, após o ensaio enzimático, na amostra de trabalho e extrato enzimático, todas com diluição 100 μ L em 25 mL, e na solução padrão de glicose e no branco do ensaio.

3.4.4 Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho é o intervalo de concentrações em que o método analítico apresenta uma resposta proporcional e linear à concentração do analito. Para isso, foi utilizado a curva de calibração previamente construída com a glicose como referência.

3.4.5 Linearidade

Para a avaliação da linearidade, foi utilizada a planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida por Bazilio (2012). Esta planilha avalia, além da linearidade pelo coeficiente de correlação, outros parâmetros como: 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) e Normalidade dos resíduos (Teste de Ryan-Joiner).

Foram preparadas três curvas analíticas em sete níveis de concentração, igualmente espaçados, preparados independentemente, com três replicatas independentes de cada nível. As soluções padrão de glicose utilizadas foram preparadas

a partir de uma solução estoque 1% conforma mostrado no Quadro 2.

3.4.6 Limite de detecção e limite de quantificação do método

A determinação do Limite de Quantificação (LQ) e do Limite de Detecção (LD) representa uma etapa crucial no processo de validação de metodologias analíticas. Para a cálculo do LD e LQ, foi utilizada a planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida por Bazilio (2012).

O LQ é o menor nível de concentração de uma substância que pode ser quantificado de forma precisa e exata, enquanto o LD refere-se ao menor nível de concentração detectável, mas não necessariamente quantificável. Estes parâmetros são calculados com base em critérios estatísticos, levando em consideração a média e o desvio padrão dos brancos, considerando a resposta instrumental e a variabilidade inerente do método.

A utilização de padrões analíticos apropriados e a análise de curvas de calibração são fundamentais para assegurar a confiabilidade dessas determinações, proporcionando uma base sólida para a avaliação da sensibilidade e robustez da metodologia analítica em questão. A implementação rigorosa desses cálculos contribui significativamente para a validação precisa e eficaz de métodos analíticos, garantindo a confiabilidade e a acurácia dos resultados obtidos (Brasil, 2017; Inmetro, 2020).

3.4.7 Exatidão / Recuperação

A avaliação da exatidão ou recuperação em metodologias analíticas constitui uma fase crucial no processo de validação. A exatidão refere-se à proximidade entre os valores experimentais obtidos e os valores teóricos ou verdadeiros, representando a capacidade do método em recuperar quantitativamente a substância alvo. Este parâmetro é frequentemente expresso como a porcentagem de recuperação, calculada mediante a comparação entre as concentrações medidas e as concentrações adicionadas conhecidas, considerando as possíveis interferências e variações experimentais. A avaliação da recuperação será conduzida mediante a restituição da

glicose adicionada a partir do padrão de glicose estabelecido. A determinação da exatidão contribui para a verificação da confiabilidade e da precisão do método analítico, desempenhando um papel fundamental na validação robusta de procedimentos analíticos. O controle estrito e a monitorização contínua destes parâmetros são essenciais para garantir a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados analíticos, assegurando, assim, a integridade e a qualidade dos dados gerados (Brasil, 2017; Inmetro, 2020).

3.4.8 Precisão

A precisão das análises dentro do processo de validação foi avaliada por dois níveis diferentes, a repetitividade e a precisão intermediária.

3.4.8.1 Repetitividade

A repetitividade foi realizada pelo analista envolvido no processo de validação, que executou todos os outros parâmetros analíticos. Para o estudo da atividade amilolítica a repetitividade foi realizada através de 15 dosagens da amostra de trabalho em sua diluição de uso, em um curto período de tempo e com o mesmo instrumento de análise. Estatisticamente, comparou-se o valor do desvio padrão relativo com os limites estabelecidos em função da concentração do analito, segundo a equação de Horwitz mostrada abaixo (Horwitz; Albert, 2006).

$$DPR_r = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (3:6)$$

Onde: DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade previsto pela equação de Horwitz
 C = média das concentrações

O método é considerado repetitivo com um valor de $HorRat_{repe}$ menor ou igual a 2 (Horwitz; Albert, 2006).

$$HorRat_{repe} = \frac{CV_{repe}(\%)}{\frac{2}{3}DPR_r} \quad (4:6)$$

Foram preparadas 15 alíquotas de amostra na diluição de uso do produto de 100uL para 25 mL, que é aproximadamente o ponto central da curva analítica de glicose.

3.4.8.2 Precisão intermediária

Para o estudo da atividade amilolítica a precisão intermediária foi realizada através de 10 dosagens da amostra de trabalho em sua diluição de uso por 2 (dois) analistas em períodos de tempo e equipamentos diferentes. Para a aceitabilidade deste parâmetro o valor de $HorRat_{precint}$ deve ser menor ou igual a 2 (Horwitz; Albert, 2006).

$$DPR_R = 2^{(1-5LogC)} \quad (5:6)$$

$$HorRat_{precint} = \frac{CV_{precint}(\%)}{\frac{2}{3}DPR_R} \quad (6:6)$$

onde: DPR_R = Desvio padrão relativo de precisão intermediária previsto pela equação de Horwitz

C = Média das concentrações

3.4.9 Seletividade

A seletividade, como abordada na seção 3.6.1.8 do presente estudo, constitui um componente essencial na validação de métodos analíticos. Este parâmetro refere-se à capacidade do método em distinguir e quantificar a substância alvo na presença de outros

componentes, como impurezas, matriz da amostra ou substâncias interferentes. A avaliação da seletividade envolve a análise de cromatogramas e espectros obtidos a partir de amostras complexas, com o intuito de identificar qualquer sobreposição de picos ou interferências que possam comprometer a especificidade do método. A seletividade, portanto, desempenha um papel crucial na garantia da confiabilidade e da validade das análises, contribuindo para a robustez e a precisão do método analítico em questão. A meticulosa investigação e documentação da seletividade são imperativas para assegurar a aplicabilidade e a eficácia da metodologia em ambientes analíticos diversificados.

3.4.10 Robustez

Para avaliação da robustez foram definidas pequenas e deliberadas variações no método a serem verificadas, conforme mostradas na Quadro 3.

Quadro 3 - Variações no método para a determinação da robustez

Parâmetros	Condição normal	1ªVariação	2ª Variação
1. Comprimento de onda (nm)	550	548	552
2. Diferentes temperaturas (°c)	40	39	41
5. pH	6,0	5,9	6,1

Fonte: O autor (2024).

Foram analisadas 6 (seis) replicatas da amostra de trabalho nas condições normais do método. Repetiu-se o procedimento com a mesma amostra para cada uma das variações. Para os cálculos utilizou-se o teste F e o teste t (Apendice 1).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

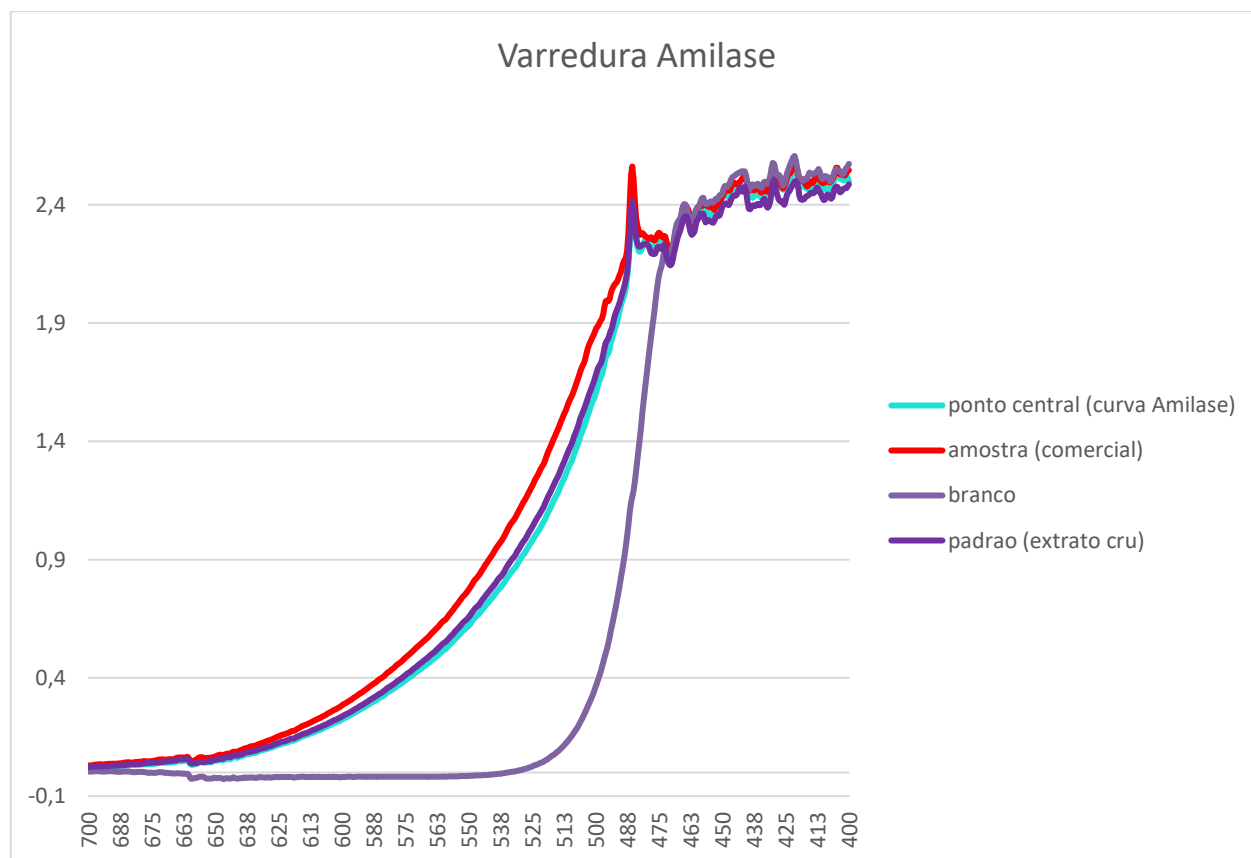
4.1 Validação do método de determinação de atividade amilolítica

4.1.1 Especificidade

O primeiro parâmetro avaliado foi a especificidade, uma vez que o método deve ser capaz de identificar a atividade amilolítica na presença de possíveis interferentes contidos na matriz/formulação do detergente enzimático.

Após estabelecer as condições do método, foram realizadas varreduras na região de 400 a 700 nm para o padrão de glicose, amostra de trabalho, extrato enzimático sem matriz e branco do ensaio, de acordo com o gráfico 1.

Gráfico 1 - Perfil da Varredura espectrofotométrica 400 - 700nm



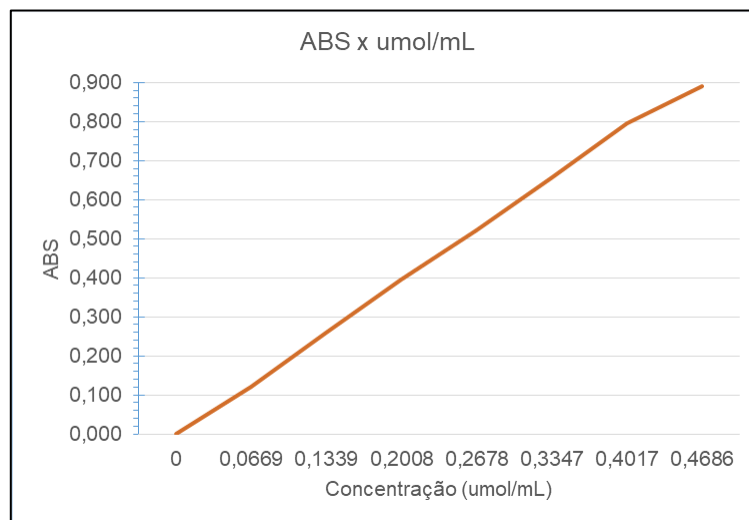
Fonte: O autor (2024).

Os espectros de absorção das soluções padrão, amostra de trabalho e extrato da enzima amilase (sem matriz) foram idênticos, apresentando um sinal característico de absorção em 550 nm. Os espectros de absorção da amostra branco não apresentaram pico de absorção em 550nm.

4.1.2 Faixa linear de trabalho

A partir da curva de calibração construída com a glicose (Gráfico 2), verificou-se que o método utilizado demonstrou uma resposta linear na faixa de concentrações que abarcava as concentrações típicas dos detergentes enzimáticos com atividade amilolítica. Isso significa que o método é adequado para a análise desses detergentes dentro dessa faixa de concentrações.

Gráfico 2 - Curva padrão de glicose



Fonte: O autor (2024).

A determinação da faixa linear de trabalho é essencial para a validação analítica de métodos de análise, garantindo que o método seja capaz de medir com precisão as concentrações dos analitos de interesse. Neste estudo, utilizando uma curva de glicose como padrão de referência, foi possível estabelecer uma faixa linear de trabalho que se mostrou adequada para as análises dos detergentes enzimáticos com atividade amilolítica em questão.

4.1.3 Linearidade

Com a especificidade demonstrada e a faixa de concentração adequada para construção da curva analítica, iniciou-se o desenvolvimento da etapa quantitativa do método. As absorvâncias dos sete pontos da curva analítica, para três soluções estoques independentes, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Absorvâncias dos padrões preparados a parti das soluções estoques de glicose $55,6 \text{ } \mu\text{mol/mL}^{-1}$

	Solução estoque 1		Solução estoque 2		Solução estoque 3	
	<i>umol/mL</i>	<i>Abs</i>	<i>umol/m</i> <i>L</i>	<i>Abs</i>	<i>mg/mL</i>	<i>Abs</i>
Nível 1	0,0662	0,120	0,0669	0,126	0,0665	0,115
Nível 2	0,1324	0,258	0,1338	0,293	0,1331	0,253
Nível 3	0,1986	0,394	0,2008	0,408	0,1996	0,378
Nível 4	0,2648	0,522	0,2677	0,568	0,2662	0,522
Nível 5	0,3310	0,658	0,3347	0,683	0,3327	0,688
Nível 6	0,3973	0,795	0,4016	0,917	0,3993	0,803
Nível 7	0,4635	0,891	0,4686	0,934	0,4658	1,002

Fonte: O autor (2024).

A linearidade da curva analítica para determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos na faixa da concentração estudada foi confirmada

através dos calculados dos resíduos da regressão e dos ajustes ao modelo linear de acordo com as premissas da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica. A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi garantida pelo teste Ryan-Joiner. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homoscedasticidade e a avaliação estatística t de Levene não foi significativa ($p > 0,05$). A independência dos resíduos da regressão foi demonstrado pelo teste de Durbin-Watson. Os resultados permitiram concluir que a significância da regressão foi alta ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$). O método está livre de tendência (valor p da interseção $> 0,05$). A planilha no Apêndice A mostra resumidamente as premissas para a curva linear para determinação de atividade amilolítica.

O método analítico para determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos é considerado linear na faixa de: 0,067 umol/mL a 0,47 umol/mL, pois os resultados obtidos cumprem com o critério de aceitação.

4.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método analítico são respectivamente 0,022 umol/mL e 0,0653 umol/mL, conforme mostrado no anexo A.

4.1.5 Recuperação analítica

O Quadro 4 apresenta critérios sugeridos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) como um referencial útil para esse propósito (AOAC International, 2016). Neste contexto, este trabalho abordará de forma abrangente a avaliação da recuperação do analito, destacando sua importância e os desafios associados a esse processo crítico na validação de métodos analíticos.

Quadro 4 - Critério de aceitação para recuperação

Analito (%)	Fração Mássica	Unidade	Recuperação Média (%)
100	1	100%	98 - 102
10	10 ⁻¹	10%	98 - 102
1	10 ⁻²	1%	97 - 103
0,1	10 ⁻³	0,1%	95 - 105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90 - 107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80 - 110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	80 - 110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (mg/kg)	80 - 110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (mg/kg)	60 - 115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (mg/kg)	40 - 120

Fonte: AOAC International (2016).

A fim de possibilitar uma correlação direta com a tabela de Critério de Aceitação para Recuperação em percentual, foi necessário realizar uma conversão de unidades de medida da concentração do analito (Tabela 2). Inicialmente, a concentração estava expressa em micromol por mililitro ($\mu\text{mol/mL}$).

Para tornar os resultados mais compatíveis com os critérios estabelecidos pela AOAC, que especifica a faixa de aceitação em percentual (%), a concentração em $\mu\text{mol/mL}$ precisou ser convertida para partes por milhão (ppm). Essa conversão é crucial para permitir uma avaliação direta dos resultados em relação aos padrões de recuperação estabelecidos, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Cálculo conversão da unidade de medida

mol	umol		
1	1000000		mol
X	0,06562214	X=	6,56221E-08
<hr/>			
gramas	mol		
180,15	1		gramas
Y	6,56221E-08	Y=	1,18218E-05
<hr/>			
gramas	ml		
1,18218E-05	1		g/L
Z	1000	Z=	0,011822
<hr/>			
g/L		mg/L	
0,011822 x 1000 = 11,82183		11,82183 =	11ppm

Fonte: O autor (2024).

A Tabela 3 apresenta os resultados da avaliação da recuperação da glicose, na faixa de concentração em torno de 10 ppm. A recuperação da glicose foi avaliada de acordo com os critérios estabelecidos pela AOAC, que determinam uma faixa aceitável de 80% a 110%. Essa faixa de aceitação reflete a precisão desejada para a recuperação do analito, garantindo que os resultados sejam confiáveis e precisos. A seguir, a Tabela 3 detalhará os resultados obtidos nessa avaliação, fornecendo uma visão clara da eficácia do método analítico em recuperar a glicose na concentração alvo de 10 ppm.

Tabela 3 - Ensaio de Recuperação

Nível	Conc(umol/mL)	ABS	Recuperação (%)
1	0,0656	0,118	
	0,0657	0,116	
	0,0656	0,118	
2	0,1312	0,251	106
	0,1314	0,249	
	0,1313	0,245	
3	0,1968	0,391	108,2
	0,1971	0,384	
	0,1970	0,368	
4	0,2629	0,521	109,4
	0,2626	0,506	
5	0,3281	0,621	107
	0,3286	0,640	
	0,3283	0,627	
6	0,3937	0,773	109,8
	0,3943	0,757	
	0,3940	0,788	
7	0,4593	0,874	107
	0,4600	0,880	
	0,4597	0,881	

Nota: Faixa aceitável pela AOAC para concentração em torno de 10ppm Critério de aceitação para recuperação: 80 - 110%.

Fonte: O autor (2024).

Os resultados obtidos nesta avaliação se encontram dentro da faixa aceitável estabelecida pela AOAC para concentração em torno de 10 ppm, onde o critério de aceitação para recuperação foi definido entre 80% e 110%.

4.1.6 Precisão

4.1.6.1 Repetitividade

Os resultados das atividades enzimáticas encontrados no primeiro dia pelo analista 1 envolvido no processo de validação estão indicados na Tabela 4. Foi verificado que não houve presença de valores extremos utilizando o teste de Grubbs. De acordo com os resultados obtidos e comparando com os critérios de aceitação, conclui-se que o método apresenta repetitividade satisfatória pois os valores de HorRat permaneceram menor que 2.

Tabela 4 - Repetitividade do método: dosagens executadas no primeiro dia, analista 1

Replicatas (%p/p)													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15
0,0930	0,0915	0,0892	0,0910	0,0883	0,0903	0,0936	0,0887	0,0898	0,0905	0,0920	0,0907	0,0876	0,0893
Média: 0,0903 %p/p			CV_{repe} (%): 1,87			HorRat_{repe}: 0,15							

Nota: critérios de aceitação $HorRat_{repe} \leq 2$.

Fonte: O autor (2024).

4.1.6.2 Precisão intermediária

Os resultados das atividades enzimáticas encontrados efetuado pelo analista 1 e analista 2 envolvido no processo de validação são apresentados nas tabelas 5. O resultado da precisão intermediária das análises está indicado na Tabela 5.

Tabela 5 - Precisão intermediária: análises executadas em diferentes dias com analistas

diferentes

	1° ANALISTA	2° ANALISTA	$(x_{jk}-x_{med})^2$	$(x_{jk}-x_{med})^2$
	0,0930	0,0985	7,04E-06	3,75E-05
	0,0915	0,0830	1,33E-06	8,79E-05
	0,0892	0,0900	1,31E-06	5,63E-06
	0,0910	0,0975	4,27E-07	2,63E-05
	0,0883	0,0916	4,19E-06	5,98E-07
	0,0903	0,0904	2,18E-09	3,89E-06
	0,0936	0,0909	1,06E-05	2,17E-06
	0,0887	0,1039	2,71E-06	0,000133
	0,0898	0,0954	2,99E-07	9,16E-06
	0,0905	0,0948	2,35E-08	5,89E-06
	0,0920	0,0939	2,73E-06	2,33E-06
	0,0897	0,0939	4,18E-07	2,33E-06
	0,0907	0,0737	1,25E-07	0,000349
	0,0876	0,0938	7,54E-06	2,04E-06
	0,0893	0,0943	1,1E-06	3,71E-06
Média	0,0903	0,0924		

Si	0,006284136	
CV_{precint}(%)	6,878433019	
CV	8,070799939	critério de aceitação:
HorRat_{precint}:	0,852261619	HorRat _R < 2,0

Nota: critérios de aceitação $\text{HorHat}_{\text{repe}} \leq 2$.
 Fonte: O autor (2024).

De acordo com os resultados obtidos e comparando com os critérios de aceitação, conclui-se que o método apresenta precisão satisfatória pois os valores de $\text{HorHat}_{\text{repe}}$ e HorHat_R permaneceram menor que 2.

4.1.7 Robustez

Para avaliação da robustez foram definidas pequenas e deliberadas variações no método a serem verificadas, conforme mostradas na Quadro 3.

As variações do método foram comparadas e os resultados são mostrados nas tabelas 6, 7, e 8.

Tabela 6 - Teste t para a comparação das variações do parâmetro 1 (comprimento de onda)

Concentração de glicose (umol/mL)					
Replicatas	Condição normal	1° variação (548 nm)	d	2° variação (552 nm)	d
1	0,0616	0,0896	0,0280	0,0835	0,0219
2	0,0932	0,0966	0,0034	0,0899	-0,0033
3	0,0945	0,0980	0,0035	0,0913	-0,0032
4	0,0944	0,0978	0,0034	0,0911	-0,0033
5	0,0908	0,0939	0,0031	0,0876	-0,0032
6	0,0881	0,0911	0,0030	0,0850	-0,0031
Média	0,0871	0,0896	0,0074	0,0881	0,000966667
s²	0,00016204	0,000012696	0,00010188	1,06987E-05	0,000105175
F_{calc.}: 12,76			F_{calc.}: 15,15		
F_{tab.}: 5,05			F_{tab.}: 5,05		
t_{calc.}: 1,80			t_{calc.}: 0,23		
t_{tab.}: 2,571			t_{tab.}: 2,571		

s²: variância

d: diferença das replicatas

Fonte: O autor (2024).

Tabela 7 - Teste t para a comparação das variações do parâmetro 2 (temperatura)

Concentração de glicose (umol/mL)					
Replicatas	Condição normal	1° variação (39°C)	d	2° variação (41°C)	d
1	0,097	0,069	-0,0271	0,0956	-0,0009
2	0,061	0,097	0,0358	0,1040	0,0433
3	0,105	0,051	-0,0534	0,0585	-0,0461
4	0,092	0,095	0,0028	0,0922	0,0001
5	0,095	0,077	-0,0174	0,1000	0,0054
6	0,103	0,086	-0,0170	0,0993	-0,0037
Média	0,0919	0,0792	-0,0127	0,0916	-0,0003
s²			0,0008993	0,00027911	
	0,0003	2,952E-04	9	6	0,000808634
		F_{calc.}: 1,15		F_{calc.}: 1,08	
		F_{tab.}: 5,05		F_{tab.}: 5,05	
		t_{calc.}: -1,04		t_{calc.}: -0,03	
		t_{tab.}: 2,571		t_{tab.}: 2,571	

s²: variância

d: diferença das replicatas

Fonte: O autor (2024).

Tabela 8 -Teste t para a comparação das variações do parâmetro 3 (pH)

Concentração de glicose (umol/mL)					
Replicatas	Condição normal	1° variação (5,9)	d	2° variação (6,1)	d
1	0,077	0,051	-0,0262	0,050	-0,0272
2	0,055	0,049	-0,0063	0,048	-0,0076
3	0,045	0,048	0,0030	0,069	0,0243
4	0,047	0,045	-0,0024	0,049	0,0023
5	0,047	0,080	0,0333	0,047	0,0007
6	0,048	0,047	-0,0017	0,050	0,0013
Média	0,0532	0,0531	-0,0001	0,0521	-0,0010
s²	0,0002	0,000177008	0,00037053	7,04417E-05	0,000277831
		F_{calc.}: 1,17		F_{calc.}: 2,15	
		F_{tab.}: 5,05		F_{tab.}: 5,05	
		t_{calc.}: -0,01		t_{calc.}: -0,15	
		t_{tab.}: 2,571		t_{tab.}: 2,571	

s²: variância

d: diferença das replicatas

Fonte: O autor (2024).

Os dados obtidos indicam que o método é robusto para todas as variações realizadas, evidenciado pelas comparações das variações ($t_{calc} < t_{tab}$).

4.2 Revisão pop 65.3110.064 determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos

4.2.1 Alterações Realizadas

A revisão do POP 65.3110.064, de Determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos, foi integralmente concluída. Esta revisão foi conduzida com o objetivo de incorporar as atualizações necessárias derivadas dos resultados e conclusões obtidos na validação do método correspondente e atualização da RDC N° 703 de 2022.

Dentre as principais mudanças efetuadas, destaca-se a inclusão de um novo item no Sumário, nomeado "Segurança", visando ressaltar a importância de realizar todas as etapas de preparação de soluções e execução de análises em capela com exaustão. Além disso, foram estabelecidas diretrizes específicas, como a utilização de jaleco, óculos de proteção e luvas, quando necessário.

Outra alteração relevante ocorreu no Capítulo 6, no item 6.4.1, referente ao preparo de soluções, onde a concentração da solução fosfato de sódio dibásico foi ajustada de 0,05M para 0,1M. Uma nota foi adicionada no mesmo item, abordando o uso do reagente fenol e ressaltando a importância de observar medidas de segurança devido à volatilidade e aos potenciais riscos à saúde associados a este composto.

No item 6.4.2, que trata da descrição do método, duas modificações foram realizadas. Primeiramente, foi sugerido o uso preferencial de balão volumétrico de 25mL, essa alteração se fundamenta no procedimento adotado durante a fase de validação do método, na qual todas as diluições foram realizadas utilizando balões de 25mL. A inclusão desta recomendação no POP visa manter a consistência e uniformidade nas práticas laboratoriais, alinhando-se com os parâmetros estabelecidos durante a validação do método. Portanto, a sugestão do uso preferencial do balão de 25mL visa otimizar a precisão e a reprodutibilidade das análises, garantindo a coerência com as práticas previamente validadas. Adicionalmente, foi inserida a orientação para manter os tubos no banho termostático a $(40 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ até a adição do DNS, que marca o final da reação enzimática. Uma nota foi acrescentada nesta seção, apresentando a Figura 1: Esquema do ensaio de determinação de atividade amilolítica.

O Capítulo 7 foi completamente adicionado, abordando a "Garantia da Qualidade das Medidas Realizadas na Rotina". Este novo capítulo estabelece procedimentos para assegurar a qualidade das medições ao longo do tempo, incluindo a análise de amostras controle, escolha da concentração, aplicação estrita do método validado e correção da concentração das amostras analisadas na rotina com base nos resultados de recuperação obtidos.

Além disso, uma atualização na bibliografia foi realizada, incluindo a RDC vigente Nº 703 de 2022, que dispõe sobre detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos

médicos.

Recomenda-se a adoção imediata dessas alterações no POP 65.3110.064 para garantir a conformidade com as normas vigentes e aprimorar a segurança e qualidade dos processos laboratoriais.

5 CONCLUSÃO

A metodologia analítica desenvolvida e empregada para a determinação da atividade amilolítica em detergentes enzimáticos por meio da espectroscopia de absorção no visível demonstrou ser robusta e confiável.

A manutenção dos resultados de recuperação dentro dos limites estabelecidos reflete a exatidão e confiabilidade do método analítico empregado, proporcionando uma base sólida para a realização de análises futuras. Essa validação bem-sucedida reforça a utilidade e a exatidão deste método, que desempenha um papel crucial na garantia da qualidade e na conformidade com as normas de produtos que dependem da medição precisa da atividade amilolítica em detergentes enzimáticos.

Os resultados obtidos durante a validação analítica sustentam a precisão, linearidade, exatidão e a sensibilidade do método. A consistência dos dados, bem como a concordância entre os resultados analíticos e as especificações pretendidas, fortalecem a confiabilidade e a eficácia do método.

Portanto, com base nas evidências coletadas e na avaliação crítica dos parâmetros de validação, podemos afirmar com segurança que a metodologia analítica está validada e é, portanto, apropriada para a determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos. Esta validação representa um avanço significativo na análise de detergentes enzimáticos, fornecendo uma ferramenta precisa e consistente para a indústria de produtos de limpeza. Ela contribui para a garantia da qualidade e segurança dos produtos, bem como para a otimização dos processos de fabricação. Portanto, este método pode ser adotado com confiança para apoiar a qualidade e o desenvolvimento contínuo de detergentes enzimáticos, atendendo às necessidades da indústria e dos consumidores.

A revisão do POP 65.3110.064, de Determinação da concentração de atividade amilolítica em detergentes enzimáticos, foi integralmente finalizada, cumprindo os objetivos estabelecidos. Este processo foi conduzido de maneira sistemática, incorporando as atualizações essenciais identificadas a partir dos resultados e conclusões obtidos na validação do método correspondente. Além disso, a revisão bibliográfica foi meticulosamente realizada, com uma atualização abrangente das

referências pertinentes. Destaca-se que as alterações implementadas, proporcionando uma visão do refinamento do procedimento e da fundamentação teórica subjacente. Este processo não apenas atende às normativas vigentes, mas também fortalece a integridade metodológica e a validade científica da abordagem analítica empregada, contribuindo assim para o aprimoramento contínuo da qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

6 PERSPECTIVAS

A perspectiva de elaboração do relatório de validação abrange de maneira substancial a metodologia intrínseca à determinação da atividade enzimática da amilase. O escopo deste documento abrangerá a revisão e aprimoramento do POP 65.3110.064, integrando as diretrizes estabelecidas na RDC N° 703 de 2022, RDC N° 166 de 2017 da Anvisa e as orientações do Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos DOQ-CGCRE-008 Revisão 09, publicado pelo INMETRO. Este relatório, além de documentar minuciosamente as etapas de validação, pretende oferecer uma visão abrangente da metodologia.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Consulta Pública nº 27, de 22 de maio de 2009. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 22 maio 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Plano Diretor de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2007. 56 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 55, de 14 de novembro de 2012. Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 nov. 2012. Seção 1, p. 123-125.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 29 de agosto de 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 141, de 25 de julho de 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 180, de 3 de outubro de 2006. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 123, p. 45-47, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 694, de 13 de maio de 2022. Dispõe sobre os critérios para a regularização de produtos de limpeza e afins e sobre a biodegradabilidade de tensoativos aniônicos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 93, de 18 de maio de 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 703, de 16 de maio de 2022. Dispõe sobre detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 93, 18 de maio de 2022.

ALBRECHT, Lucimara. **Máquinas lavadoras ultrassônicas de instrumentos odontológicos, médicos e cirúrgicos**: avaliação do desempenho do processo de limpeza. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements** (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.

ASSONI, Letícia Carolina Paraboli; ALMEIDA, Rogéria Maria Alves de. Teste de aderência de candida albicans em instrumentais odontológicos de aço inoxidável com corrosão e materiais termossensíveis: teste de limpeza/desinfecção química. **Caderno de Estudos Tecnológicos**, v. 1, n. 1, 2013.

BAZILIO, F. S. *et al.* Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**, Rio de Janeiro, 2012.

BLANCO CENTURIÓN, Maria Pasionaria. **Estudo da lipase em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

BLANCO CENTURIÓN, M. P. B.; SILVA, A. S. da; LOPES, L. de S.; ROMÃO, C. M. C. A. Detergentes enzimáticos no reprocessamento de produtos para a saúde. **Visa em Debate**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 33-41, 2019.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 9.782, de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 de janeiro de 1999.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 8.077, de 14 de agosto de 2013. Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário, e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos de que trata a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 ago. 2013.

BUENO, Sonia Mara Moreira. Comparação entre detergente enzimático e neutro na lavagem de brocas e limas endodônticas. **Archives of Health Investigation**, v. 7, 2018.

CARVALHO, Gênova da Silva. **Fundamentos conceituais e metodológicos para análise da situação de saúde na perspectiva do planejamento em vigilância sanitária**. Salvador, 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Saúde Coletiva, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, 2012.

CHEETHAM, Norman W. H.; BERENTSVEIG, Vladimir. Relative efficacy and activity of medical instrument cleaning agents. **Australian Infection Control**, Austrália, v. 7, n. 3, p. 105 - 112, 2002.

CORRÊA, Átila Coelho. **Gestão do risco sanitário no Brasil e a responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2010. 183 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) - Universidade de Brasília, 2010.

COSTA, E. A. (org.). **Vigilância Sanitária: temas para debate**. Salvador: EDUFBA,

2009. 237 p. ISBN 978-85-232-0881-3.

DALTIN, Decio. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Ed. Blucher, 2011.

FLORES, Aline Fatima. **Eficiência da higienização e de ação detergente enzimático em comparação ao alcalino clorado em abatedouro de aves**. 2015. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Gestão da Qualidade na Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

GUZMÁN-MALDONADO, Horacio; PAREDES-LÓPEZ, Octavio; BILIADERIS, Costas G. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 35, n. 5, p. 373-403, 1995.

HERRIN, Ann *et al.* Standards of infection prevention in reprocessing flexible gastrointestinal endoscopes. **Gastroenterology Nursing**, v. 39, n. 5, p. 404-418, 2016.

HORVATHOVA, V.; JANECEK, S.; STURDIK, E. Amylolytic enzymes: molecular aspects of their properties. **General physiology and biophysics**, v. 20, n. 1, p. 7-32, 2001.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. U seflil index of performance wite respect to precision. **Jornal of AOAC international**, v. 89, ISSUE 4, 2006.

INMETRO. **Documentação da Coordenação Geral de Acreditação (DOQ-CGCRE-008)**: revisão 09. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2020.

KOTHEKAR, Amol T.; KULKARNI, Atul P. Basic principles of disinfection and sterilization in intensive care and anesthesia and their applications during COVID-19 pandemic. **Indian journal of critical care medicine**: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine, v. 24, n. 11, p. 1114, 2020.

LOPES, L. S. **Estudo da atividade proteolítica e desempenho de detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

LUZ, Fabrício Ferreira. **Desenvolvimento de um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, 2007.

MACHOVIC, MARTIN; JANECEK, S. Amylolytic enzymes: types, structures and specificities. **Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications**, p. 3-19, 2007.

MAURER, Karl-Heinz; GABLER, Matthias. Analysis of detergent enzymes. *In*: HANDBOOK Of Detergents, Part C. [S. l.]: CRC Press, 2016. p. 489-504.

MITIDIERI, Sydnei *et al.* Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource technology**, v. 97, n. 10, p. 1217-1224, 2006.

MORAES, Mariana Assis de; FARIAS, Fernanda Fernandes. **Avaliação da estabilidade de detergentes enzimáticos**. [S. l.]: IAL, 2023. p. 98.

OFFEN, W.A.; ANDERSON, C.; BORCHERT, T.V.; WILSON, K.S.; DAVIES, G.J. Three-dimensional structure of a variant 'Termamyl-like' *Geobacillus stearothermophilus* alpha-amylase at 1.9 Å resolution. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2210/pdb4UZU/pdb>. Acesso em: 20/05/2024.

OLIVEIRA, Adriana Cristina de *et al.* Validação do protocolo de limpeza manual dos instrumentais videolaparoscópicos em hospital universitário. **Revista SOBECC**, v. 19, n. 4, p. 201-206, 2014.

PETRUCCI, Antonella Pilla; MACHADO JUNIOR, Antônio Veiga; TERMIGNONI, Carlos. Avaliação da eficácia de detergentes enzimáticos de uso hospitalar. *In*: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18., 2006, Porto Alegre. **Livro de resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

PEREIRA, Milca Severino *et al.* A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da enfermagem. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 14, p. 250-257, 2005.

ROZENFELD, S. (org.). Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. 301 p. ISBN 978-85-7541-325-8.

SCHMIDT, Denise Rodrigues Costa; YONEKURA, Christiane Sayuri Ito; GIL, Rosineide Feres. Instrumento para avaliação de detergentes enzimáticos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 42, p. 282-289, 2008.



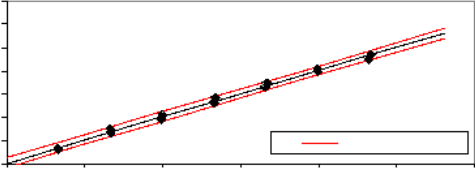
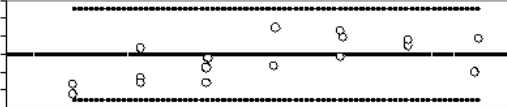
SOUZA, Karyna Fernandes de. **Detergente enzimático**: desenvolvimento de uma formulação mais sustentável para um detergente lava roupas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - , 2019.

SOUZA, Taissa Ferreira de Oliveira. **Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido para utilização em detergentes enzimáticos especiais**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

VIEIRA, Angela Maria da Silva; BERG, Elaine Christina; RIBEIRO, Ana Paula. Limpeza e Desinfecção de Endoscópios. *In*: COLÓQUIO CISMEPAR, 1., 2019, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, PR: CISMEPAR, 2019.

VOJCIC, Ljubica *et al.* Advances in protease engineering for laundry detergents. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629-634, 2015.

APÊNDICE A - AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde				
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA					
Dados da Curva Analítica					
Análise:	Curva analítica _amilase - Validação				
Data de Confeção da Curva:	14/05/2023	Curva N°:			
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7		
Equipamento:	Espectrofotômetro Hitachi	Responsável:	Rômulo Pereira		
Tabela de dados originais					
Nível (k)	i	Conc.	Resposta		
1	01	0,0664791	0,12		
	02	0,06694653	0,126		
	03	0,066557	0,115		
2	04	0,13295819	0,258		
	05	0,13389306	0,293		
	06	0,133114	0,253		
3	07	0,19943729	0,394		
	08	0,20083958	0,408		
	09	0,19967101	0,378		
4	10	0,26591639	0,522		
	11	0,26778611	0,568		
	12	0,26622801	0,522		
5	13	0,33239548	0,658		
	14	0,33473264	0,683		
	15	0,33278501	0,688		
6	16	0,39887458	0,795		
	17	0,40167917	0,917		
	18	0,39934201	0,803		
7	19	0,46535368	0,891		
	20	0,4686257	0,934		
	21	0,46589901	1,002		
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 (α = 0,05)	0,95				
Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	2,26				
dL (Limite Inferior) α = 0,05	1,16				
dU (Limite Superior) α = 0,05	1,39				
Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	1,91E-04				
t _c calculado	-2,26E-01				
t _t tabelado (α = 0,05)	2,12E+00				
p	8,24E-01				
Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)					
Coefficiente Angular (b):	2,00E+00	Coefficiente Linear (a):	-1,74E-03		
r	0,9976	R ²	0,9952		
N	19	Graus de Liberdade	17		
Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)					
Limite de Detecção	2,20E-02	Limite de Quantificação	6,53E-02		
ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,09E+00	1,09E+00	1,82E+03	6,51E-18
resíduos	16	9,61E-03	6,01E-04		
Ajuste	5	-1,93E-03	-3,86E-04	-3,68E-01	#NÚM!
erro puro	11	1,15E-02	1,05E-03		
total	17	1,11E+00			
Observações					
Resumo da Avaliação					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade $p > 0,05$					
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa $p < 0,001$					
#NÚM!					
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)					
Não há autocorrelação $d > dU$					
Teste de Normalidade (α = 0,05)					
Segue a Normal $Req > Rcrit$					
Responsável: _____ Data: ____/____/____ Verificado por: _____ Data: ____/____/____					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA			Pág.: 1/1		