

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

Leonardo de Souza Lopes

**ESTUDO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DESEMPENHO DE DETERGENTES
ENZIMÁTICOS DE USO RESTRITO EM ESTABELECIMENTOS DE
ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

Rio de Janeiro

2012

Leonardo de Souza Lopes

**ESTUDO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DESEMPENHO DE DETERGENTES
ENZIMÁTICOS DE USO RESTRITO EM ESTABELECIMENTOS DE
ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Mestrado Profissional em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador(a): Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro

2012

Lopes, Leonardo de Souza

Estudo da atividade proteolítica e desempenho de detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde. / Leonardo de Souza Lopes. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

109 f. : il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

Orientador(a): Isabella Fernandes Delgado.

1. Protease. 2. Detergente enzimático. 3. Validação. 4. Ensaio de desempenho. 5. Vigilância Sanitária.

Proteolytic activity study and product performance of enzymatic detergents for restricted use in health care assistance establishments

Leonardo de Souza Lopes

**ESTUDO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DESEMPENHO DE DETERGENTES
ENZIMÁTICOS DE USO RESTRITO EM ESTABELECIMENTOS DE
ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Mestrado Profissional em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Célia Maria Pereira Carvalho Araujo Romão
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Walter Orlando Beys da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Gláucia Barbosa Cândido Alves Slana
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Isabella Fernandes Delgado (Orientador)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho aos meus queridos avós Holmes Araújo de Souza (*in memoriam*) e Ilza de Mello Souza, que me criaram com todo amor e muito colaboraram na minha educação, ao lado dos quais passei momentos felizes em toda minha infância.

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.

À minha amada esposa Izabela, por toda atenção, afeto, paciência, carinho, incentivo, amizade, companheirismo, compreensão e colaboração em todos esses anos de união. A ela toda minha admiração, sempre.

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

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

Aos amigos de longa data, Fábio Vasconcelos e Luiz Carlos, pelo incentivo e apoio constantes.

À amiga Adriana Sant'Ana, pela ajuda no laboratório na avaliação da precisão intermediária, pela orientação e dicas sobre o conhecimento em Saneantes.

À amiga Sônia Doria, pelo companheirismo e ajuda nas atividades no laboratório.

À minha orientadora Dra. Isabella Fernandes Delgado, pelas orientações precisas em todos os momentos solicitados. A ela meu respeito e admiração ao trabalho e atuação no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS.

Em especial ao Chefe do Depto. de Química e colaborador Filipe S. Q. Silva, pela orientação, incentivo, apoio, credibilidade, compreensão, paciência e ensinamentos passados ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Setor de Saneantes e Cosméticos, Paulo Jorge e Cláudio Tadeu, pela cooperação e momentos descontraídos.

Ao Dr. Eduardo Leal, diretor do INCQS, pelo apoio para realização desta dissertação.

À Mariete, chefe do Laboratório de Medicamentos, Saneantes e Cosméticos, pelo apoio e confiança.

À Dra. Célia Romão, que no papel de revisora, contribuiu significativamente para realização desta dissertação.

À colega Daniele (Fundação Ezequiel Dias – MG) pelo auxílio nas análises de atividade enzimática.

À colega Elenildes Amorim (Gerência Geral de Saneantes / Anvisa) pela colaboração no envio das informações referentes aos produtos enzimáticos.

Aos colegas Dra Shirley Abrantes, Msc José Luiz Neves de Aguiar, Msc André Sartori e Fabio Bazilio pelas sugestões e presteza em atender as minhas solicitações referentes à validação analítica.

Aos funcionários da biblioteca, Alexandre Sousa e Janaina Leal, que estiveram sempre prontos a atender a todas as minhas solicitações.

Ao colega Sérgio Alves pela ajuda na etapa de fotografia.

A empresa 3M do Brasil, em especial André Cabral, Isabela Castro e Ana Lúcia, pela colaboração em enviar as amostras e padrões enzimáticos para validação analítica.

A empresa Quimisa, em especial Bruno Silva, pela colaboração nas informações quanto ao teste de desempenho.

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

A todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste estudo.

*... Doctos varões darão razões subitas,
mas são experiências mais provadas, e
por isso é melhor ter muito visto. Coisa
há i que passam sem ser cridas e
coisas cridas há sem ser passadas, mas o
melhor de tudo é crer em CRISTO.*

Luis de Camões

RESUMO

Saneantes são produtos controlados pela Vigilância Sanitária devido a sua importância para a saúde coletiva. Os detergentes são uma classe de saneantes usados para a limpeza, e alguns são formulados com adição de enzimas com a função de auxiliar na limpeza de materiais. O uso de destes produtos é uma realidade que vem apresentando contínuo crescimento. Instrumentais que entram em contato com sangue e outros fluidos corporais necessitam de uma limpeza eficiente antes de sofrer os processos de esterilização. As formulações presentes no mercado de produtos de uso em estabelecimento de assistência à saúde possuem alguns tipos de enzimas, entre elas as proteases. Atualmente, não existe nenhum protocolo oficial para a avaliação da atividade proteolítica nos detergentes enzimáticos. O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade proteolítica em detergentes enzimáticos, através da adaptação e validação de um método espectrofotométrico e verificação do desempenho destes produtos, comparando os resultados alcançados nos dois métodos. O método para determinação de atividade proteolítica demonstrou ser robusto, exato e preciso, apresentando resultados reprodutíveis e confiáveis, podendo ser empregado em laboratórios de controle da qualidade. Foram determinadas as atividades proteolíticas nas condições recomendadas pelos fabricantes em dez produtos diferentes. A verificação do desempenho destas amostras foi realizada pelo teste de triagem em detergentes descrito na Norma ASTM D 7225-06, utilizando o simulador de sujidade Tosi®. A maioria das amostras (70%) apresentou baixa atividade proteolítica, o que pode ter ocorrido em função do pH ou componentes da formulação. Na avaliação do desempenho verificou-se que amostras com baixas atividades proteolíticas não apresentaram eficiência na limpeza de sujidades nas condições recomendadas pelos fabricantes e pela ASTM. Nas amostras que apresentaram as melhores atividades proteolíticas, as condições de limpeza da ASTM mostraram-se mais eficientes do que as recomendadas nas rotulagens dos produtos. Os resultados deste estudo poderão colaborar na publicação de uma Resolução Específica para regularização destes produtos no mercado brasileiro.

Palavras chave: Protease. Detergente enzimático. Validação. Desempenho. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Sanitizing are products controlled by the Vigilance Surveillance due to its importance to health. Detergents are a class of sanitizing used for cleaning, and some are formulated with addition of enzymes that assist in cleaning materials. The use of these products is a reality that is in continuous growth. Instrumental that come into contact with blood and other body fluids need to be cleaned effectively before undergoing sterilization processes. Market available formulations, for use in hospitals have some types of enzymes, including proteases. Currently there is no official protocol for proteolytic activity evaluation in enzymatic detergents. The aim of this work was evaluate proteolytic activity in enzymatic detergents, through adaptation and validation of a spectrophotometry method in ultraviolet. Detergent performance was also checked, comparing the results for both methods. Proteolytic activity method proved to be robust, accurate and precise, with reproducible and reliable results and it can be used in quality control laboratories. Proteolytic activities were determined in ten different products, under manufacturer's conditions. The performance verification of these products was conducted by detergent screening test described in ASTM D 7225-06, using Tosi® dirt simulator. Most samples (70%) showed low proteolytic activity, may be due their pH or formulation components. Performance evaluation showed that samples with low activity didn't have cleaning efficiency, under manufacturer's and ASTM conditions. In more active samples, ASTM conditions produced a better cleaning result. The results of this study could collaborate in the establishment of a specific normative for these products in the Brazilian market.

Keywords: Protease. Enzymatic detergent. Validation. Performance. Vigilance Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplo da estrutura tridimensional de uma protease (subtilisina de <i>Bacillus clausi</i>).....	23
Figura 2	Simulador de sujidade residual TOSI®	53
Figura 3	Espectro de absorção na região do UV-Vis referente ao padrão de protease 3M	56
Figura 4	Espectro de absorção na região do UV-Vis referente à amostra de trabalho 3M	57
Figura 5	Espectro de absorção na região do UV-Vis referente à matriz sem analito da 3M	58
Figura 6	Espectro de absorção na região do UV-Vis referente ao branco do ensaio	57
Figura 7	Curva de Ringbom obtida para determinação da faixa linear de trabalho	60
Figura 8	Gráfico da 1° curva analítica da protease nas concentrações de 0,15 a 0,45 U/mL	61
Figura 9	Gráfico da 2° curva analítica da protease nas concentrações de 0,15 a 0,45 U/mL	61
Figura 10	Gráfico da 3° curva analítica da protease nas concentrações de 0,15 a 0,45 U/mL	62
Figura 11	Comparação gráfica entre as curvas de adição do analito (A) e a curva analítica do método (B)	67
Figura 12	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 1	72
Figura 13	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 2	73
Figura 14	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 3	74
Figura 15	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 4	75
Figura 16	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 5	76
Figura 17	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 6	78
Figura 18	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 7	79
Figura 19	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 8	80
Figura 20	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 9	81
Figura 21	Resultados do teste de triagem para a amostra AM 10	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais	26
Tabela 2	Espécies de bactérias usadas na produção de detergentes enzimáticos	27
Tabela 3	Enzimas presentes em detergentes enzimáticos comercialmente disponíveis no Brasil	28
Tabela 4	Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa	32
Tabela 5	Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro.....	32
Tabela 6	Parâmetros da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica	35
Tabela 7	Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear de trabalho	47
Tabela 8	Concentrações das soluções de protease	48
Tabela 9	Concentrações finais de protease nas soluções para avaliação da recuperação	50
Tabela 10	Variações no método para determinação da robustez	52
Tabela 11	Obtenção da curva de Ringbom para determinação da faixa linear .	59
Tabela 12	Absorbâncias das soluções estoques de protease após leitura em 340 nm	61
Tabela 13	Resultados obtidos nos diferentes níveis de atividade de protease ..	64
Tabela 14	Repetitividade do método para protease, dosagens executadas pelo primeiro analista (espectrofotômetro Cary Varian)	65
Tabela 15	Dosagens das atividades proteolíticas executadas pelo segundo analista (espectrofotômetro Hitachi)	65
Tabela 16	Dosagens das atividades proteolíticas executadas pelos dois analistas	65
Tabela 17	Precisão intermediária do método para protease, análises executadas pelos dois analistas (espectrofotômetros e dias diferentes)	66
Tabela 18	Teste t para a comparação das curvas de adição do analito e da curva analítica	67
Tabela 19	Teste t para a comparação das variações do parâmetro 1 (pH da solução tampão)	68

Tabela 20	Teste t para a comparação das variações do parâmetro 2 (temperatura)	68
Tabela 21	Teste t para a comparação das variações do parâmetro 3 (Fabricantes diferentes)	69
Tabela 22	Valores de pH no produto íntegro e na diluição de uso das amostras de detergentes enzimáticos	69
Tabela 23	Atividades proteolíticas determinadas nas amostras de detergentes enzimáticos	70
Tabela 24	Atividades proteolíticas determinadas nas amostras diluídas em tampão	71
Tabela 25	Classificações das amostras pelo teste de triagem utilizando o ANEXO E	84

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
ASTM	American Standard Test Method
CMD	Concentração Média Determinada
CP	Consulta Pública
CV	Coefficiente de Variação
DPR _R	Desvio Padrão Relativo de Precisão Intermediária
DPR _r	Desvio Padrão Relativo de Repetitividade
DQ	Departamento de Química
EASs	Estabelecimentos de Assistência à Saúde
EC	Enzyme Commission
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GG-SAN	Gerência Geral de Saneantes
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUBMB	International Union of Biochemistry And Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Lacens	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
POP	Procedimento Operacional Padronizado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
TCA	Trichloroacetic Acid
TOSI	Test Object Surgical Instruments
UI	Unit International
Visas	Vigilância Sanitária Estaduais e Municipais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 TENSOATIVOS	20
1.2 DETERGENTES COM AÇÃO ENZIMÁTICA	22
1.3 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	23
1.3.1 Definição	23
1.3.2 Classificação das proteases	24
1.3.3 Uso de proteases para produção de detergentes	26
1.3.4 Método espectrofotométrico para determinação de atividade proteolítica	29
1.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO	31
1.4.1 Especificidade	33
1.4.2 Faixa linear de trabalho	34
1.4.3 Linearidade	34
1.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação do método	35
1.4.5 Exatidão / recuperação analítica	36
1.4.6 Precisão	37
1.4.6.1 <i>Repetitividade</i>	37
1.4.6.2 <i>Precisão intermediária</i>	38
1.4.7 Seletividade / efeito matriz	38
1.4.8 Robustez	39
1.5 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS	40
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 AMOSTRAS DE DETERGENTES	43
3.2 REAGENTES	43
3.3 VIDRARIAS	43
3.4 EQUIPAMENTOS	44
3.5 MÉTODOS	44
3.5.1 Determinação da atividade proteolítica	44
3.5.2 Validação do método de determinação de atividade proteolítica	45
3.5.2.1 <i>Preparação da amostra</i>	46
3.5.2.2 <i>Especificidade</i>	46

3.5.2.3 <i>Faixa linear de trabalho</i>	46
3.5.2.4 <i>Linearidade</i>	48
3.5.2.5 <i>Limite de detecção e limite de quantificação do método</i>	49
3.5.2.6 <i>Exatidão / recuperação</i>	49
3.5.2.7 <i>Precisão</i>	50
3.5.2.7.1 <i>Repetitividade</i>	50
3.5.2.7.2 <i>Precisão intermediária</i>	51
3.5.2.8 <i>Seletividade / efeito matriz</i>	51
3.5.2.9 <i>Robustez</i>	52
3.5.4 <i>Avaliação do desempenho em detergentes enzimáticos</i>	52
3.5.4.1 <i>Determinação do pH das amostras</i>	52
3.5.4.2 <i>Atividades proteolíticas nas amostras de detergentes enzimáticos</i>	53
3.5.4.3 <i>Ensaio de desempenho de detergentes enzimáticos</i>	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	55
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	57
4.2.1 <i>Especificidade</i>	57
4.2.2 <i>Faixa linear de trabalho</i>	58
4.2.3 <i>Linearidade</i>	61
4.2.4 <i>Limite de detecção e limite de quantificação do método</i>	63
4.2.5 <i>Exatidão / recuperação analítica</i>	63
4.2.6 <i>Precisão</i>	64
4.2.6.1 <i>Repetitividade</i>	64
4.2.6.2 <i>Precisão intermediária</i>	65
4.2.7 <i>Seletividade / efeito matriz</i>	66
4.2.8 <i>Robustez</i>	68
4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS	69
4.3.1 <i>Determinação do pH das amostras</i>	69
4.3.2 <i>Atividades proteolíticas nas amostras de detergentes enzimáticos</i>	70
4.3.3 <i>Ensaio de desempenho de detergentes enzimáticos</i>	72
5 CONCLUSÃO	87
6 PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS	90

ANEXO A – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DAS AMOSTRAS DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS ENCAMINHADAS PELOS FABRICANTES POR SOLICITAÇÃO DA GG-SAN / ANVISA	97
ANEXO B – DESCRIÇÃO 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 &, 2005	98
ANEXO C – DESCRIÇÃO DAS EQUAÇÕES PARA OS CÁLCULOS DOS TESTES F-SNEDECOR E t STUDENT PARA COMPARAÇÃO DAS INCLINAÇÕES E INTERSEÇÕES DE CURVAS ANALÍTICAS	101
ANEXO D – DESCRIÇÃO DAS EQUAÇÕES PARA OS CÁLCULOS DOS TESTES F-SNEDECOR E t STUDENT PARA COMPARAÇÃO DE n REPLICATAS	103
ANEXO E – INTERPRETAÇÕES DO TESTE DE TRIAGEM UTILIZANDO O SIMULADOR DE SUJIDADE TOSI®	105
ANEXO F – FORMULAÇÃO DE CADA FABRICANTE E RECOMENDAÇÕES INDICADAS EM CADA RÓTULO SOBRE A DILUIÇÃO DE USO, TEMPERATURA E TEMPO DE SUBMERSÃO DO PRODUTO	106
ANEXO G – PLANILHA DE AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	107
ANEXO H – PLANILHA DE AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NA CURVA MATRIZ	108
ANEXO I – TABELA DE DADOS DE CÁLCULO EFEITO MATRIZ EM CURVA ADIÇÃO PADRÃO E ANALÍTICA	109

1 INTRODUÇÃO

A Vigilância Sanitária atua sobre fatores de risco à saúde, com ações eminentemente preventivas. Assegurar a qualidade de produtos enzimáticos é medida de grande impacto na diminuição de riscos, em que a avaliação laboratorial possui papel importante no suporte às ações executadas, requerendo resultados confiáveis.

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. O controle destes produtos sob regime de vigilância é realizado pelo Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) composto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e pelos órgãos de vigilância sanitária estaduais e municipais (Visas), em conjunto com os laboratórios oficiais, o 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 (SILVA, 2008).

A Vigilância Sanitária de produtos atua 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 o controle de bens de consumo e da prestação de serviços (BRASIL, 1990).

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

São submetidos ao SNVS, entre outros produtos, os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, artigos e instrumentos para saúde, cosméticos, produtos de higiene, perfumes e similares, saneantes domissanitários, produtos destinados à correção estética, que somente poderão ser extraídos, produzidos, fabricados, embalados ou reembalados, importados, exportados, armazenados ou expedidos sob autorização do Ministério da Saúde (BRASIL, 1976 e 1977).

Os produtos saneantes são definidos como: “substâncias ou preparações destinadas à aplicação em objetos, tecidos, superfícies inanimadas e ambientes, com

finalidade de limpeza e afins. São destinados também à desinfecção, desinfestação, sanitização, desodorização e odorização, além de desinfecção de água para o consumo humano, hortifrutícolas e piscinas”. Em relação ao uso podem ser: de venda livre, que são aqueles destinados a comercialização direta ao público ou de uso profissional e aqueles que não podem ser vendidos diretamente ao público e devem ser aplicados ou manipulados exclusivamente por profissional devidamente treinado ou por empresa especializada (BRASIL, 2010).

Na atualidade, procedimentos diversificados para a limpeza de instrumentos cirúrgicos utilizados em Estabelecimentos de Assistência à Saúde (EAS) tem sido empregados em larga escala. Alguns desses procedimentos incluem o uso de produtos saneantes denominados detergentes enzimáticos, que por meio de suas enzimas e tensoativos, têm como objetivo proporcionar um processo de limpeza rápido, eficaz, que garanta a maior conservação destes instrumentos e a maior segurança dos profissionais da saúde, por meio da minimização da exposição dos mesmos a riscos biológicos (BRASIL, 2002; SCHMIDT; YONEKURA; GIL, 2008).

A Resolução N° 40 de 05 de Junho de 2008, define detergente enzimático como 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 e sua atividade enzimática deve ser comprovada. Os detergentes enzimáticos contêm principalmente proteases (para digerir proteínas), mas também podem conter outras enzimas como a lipase (para digerir gordura) ou amilase (para digerir carboidratos).

Um fato ocorrido no Estado do Paraná em 2006 destaca a importância de estudos sobre atividade catalítica e desempenho dos detergentes enzimáticos de uso hospitalar. Denúncias à Anvisa, por parte de hospitais, evidenciaram danos nos materiais hospitalares e uma limpeza ineficaz, levantando a suspeita de que as empresas produtoras de detergentes enzimáticos não faziam o devido controle de seus produtos (informação verbal¹).

Tais fatos estão de acordo com observações em outros países. Em 2002 um estudo comparativo testando a eficácia de 18 produtos enzimáticos foi realizado pela Associação Australiana de Controle de Infecções (AACI) e revelou que cada produto

¹ Notícia fornecida por Rosaura Farias na reunião do Grupo Técnico de Saneantes do INCQS, no Rio de Janeiro, em maio de 2006.

analisado apresentou diferenças na digestão do substrato o que indica o uso de diferentes combinações de enzimas de cada fabricante (CHEETHAM; BERENTSVEIG, 2002). Dentre os 18 produtos enzimáticos testados, o estudo provou que sete produtos não apresentavam nenhuma atividade enzimática, três tiveram atividade enzimática leve, quatro mostraram atividade moderada, dois tiveram alta atividade e dois apresentaram resultados acima da expectativa (CHEETHAM; BERENTSVEIG, 2002).

No Brasil, as denúncias de falta de efetividade dos detergentes enzimáticos, resultaram numa proposta de regulamentação relativa ao controle e vigilância de detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS, através da Consulta Pública (CP) N° 27 de 21 de maio de 2009 (BRASIL, 2009). Segundo a Anvisa, após publicação de Resolução específica para esta categoria de produto, os detergentes enzimáticos utilizados para limpeza de instrumentos cirúrgicos nos EAS precisarão de registro, pois hoje são apenas notificados à Agência. A regulamentação exigirá também, por meio de laudos laboratoriais, a comprovação da atividade catalítica das enzimas presentes na formulação do produto quando do registro.

Ainda com o novo regulamento pretende-se, por exemplo, contribuir para o controle dos surtos de infecções por micobactérias em que a origem tem como causa mais provável a contaminação dos instrumentos cirúrgicos. O processo de limpeza é uma etapa prévia muito importante para submeter esses produtos às etapas de desinfecção ou esterilização e posterior reutilização. Portanto é fundamental que os detergentes enzimáticos utilizados para este fim sejam eficazes e capazes de remover a sujidade (BRASIL, 2009).

A CP N° 27 adota as seguintes definições:

Detergente Enzimático: Produto cuja formulação contém como substâncias ativas, além de um tensoativo, uma ou mais enzimas hidrolíticas das subclasses EC (do inglês *Enzyme Commission number*) 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 sobre as quais a enzima é capaz de catalisar sua reação.

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 estabelece ainda algumas características gerais:

- 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 seis e oito.
- Os produtos nesta CP são considerados de Risco II e estão sujeitos a Registro na Anvisa.

Os produtos de Risco II compreendem os saneantes que apresentem características de corrosividade, atividade antimicrobiana, ação desinfestante, que sejam à base de microrganismos viáveis, contenham em sua formulação ácidos inorgânicos e apresentem valor de pH no produto puro menor que 2 ou igual ou maior que 11,5 (BRASIL, 2010).

1.1 TENSOATIVOS

Os tensoativos, também chamados de surfactantes, constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. São moléculas anfipáticas constituídas por uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica, catiônica ou anfotérica) ou não-iônica (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os tensoativos tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos tensoativos (BANAT, 2000).

Em 1950, o termo tensoativo foi aceito universalmente para descrever substâncias orgânicas de estruturas e propriedades características (CAHN; LYNN, 1983). Segundo Banat (2000), estas características envolvem: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases.

O termo detergente é usado alternativamente como tensoativo. Como designação de uma substância capaz de limpeza, o detergente também pode englobar substâncias inorgânicas quando estas de fato realizam uma tarefa de limpeza. Mais freqüentemente, detergente refere-se a uma combinação de tensoativos com outras substâncias orgânicas ou inorgânicas, como corantes e aromatizantes, formulado para melhorar o desempenho funcional, especialmente a limpeza (CAHN; LYNN, 1983).

Segundo a Resolução N° 40 de 05 de Junho de 2008, detergente está definido como produto destinado à limpeza de superfícies e tecidos através da diminuição da tensão superficial.

Modernas formulações de detergentes podem conter 20 ou mais ingredientes dependendo da função que o produto precisa desempenhar. As diversas matérias-primas devem ser combinadas em uma proporção específica com a finalidade de obter a melhor relação custo/benefício e ainda devem satisfazer os critérios de estabilidade e propriedades físicas. A formulação de detergentes ainda deve ser robusta suficiente para ser produzida em escala industrial e atender a diversas especificações (LUZ, 2007).

A maior utilização dos tensoativos se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (BANAT, 2000). Outras aplicações incluem recuperação de resíduos de óleos, nanoengenharia, formulação de tintas, formulação de polímeros sintéticos, preparação de pesticidas, processamento de produtos têxteis, lubrificantes e aplicação médica para limpeza de artigos e instrumentos (SHOWELL, 2006).

1.2 DETERGENTES COM AÇÃO ENZIMÁTICA

Os detergentes modernos apresentam um espectro de ação e utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, necessidade de especialização das formulações. Atualmente, uma das principais modificações em relação aos produtos tradicionais é a adição de enzimas em substituição a muitos ingredientes impróprios, como produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos (MITIDIÉRI, 2003).

A preocupação crescente com o ambiente é outro fator que tem levado os fabricantes a reavaliarem as formulações já existentes. Nas formulações mais recentemente utilizadas, esses componentes 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, reduzindo assim o impacto ambiental dessa classe de produtos (MITIDIÉRI, 2003).

O uso diversificado das enzimas deve-se a sua característica de atuar como biocatalisadores especializados. As enzimas adicionadas às formulações de detergentes de uso hospitalar, doméstico e industrial agem digerindo resíduos orgânicos como: alimentos, sangue, fezes, urina, vômitos e manchas diversas, higienizando as partes externas e internas de instrumentos cirúrgicos, desobstruindo canais com resíduos e substâncias coaguladas, eliminando resíduos fecais dos canais e superfícies dos fibroscópios e removendo contaminantes da roupa hospitalar (GODFREY, 1996).

A utilização de detergentes enzimáticos no ambiente hospitalar é uma realidade e fato que vem apresentando contínuo crescimento. Os instrumentais médicos 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 (MITIDIÉRI et al, 2002).

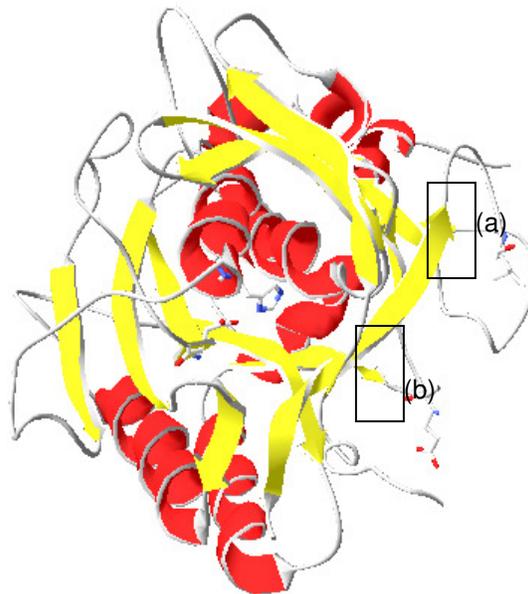
1.3 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

1.3.1 Definição

As enzimas são proteínas de ação catalítica. Além de sua importância para os organismos vivos, as enzimas também são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas, de alimento, de diagnóstico, na indústria química, entre outras (KUMAR; TAKAGI, 1999).

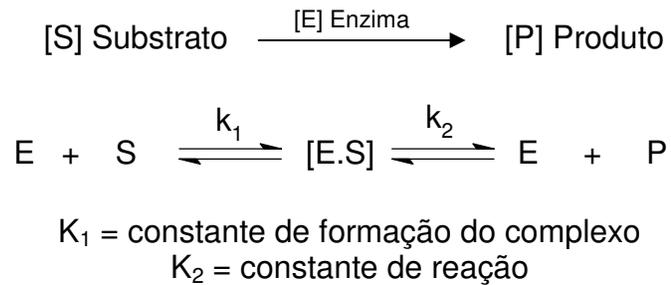
A atividade catalítica das enzimas depende da integridade e da manutenção da sua conformação proteica ativa. Assim, as estruturas protéicas primárias, secundárias, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a função de atividade catalítica (LEHNINGER, 2002). Da integridade dessas estruturas depende o sítio ativo (sítio catalítico), região da estrutura tridimensional que liga o substrato e processa a reação, gerando os produtos. A complexidade da estrutura das enzimas é exemplificada na Figura 1, onde é mostrada a estrutura tridimensional da subtilisina de *Bacillus clausi*.

Figura 1: Exemplo da estrutura tridimensional de uma protease (subtilisina de *Bacillus clausi*)



Fonte: (VÉVODOVÁ et al, 2010), código de acesso no Protein Data Bank (PDB) 2WV7. Essa estrutura corresponde ao monômero da enzima. As alfa hélices são indicadas em vermelho, estruturas beta em amarelo e as porções flexíveis em cinza. (a) o C terminal da molécula (T313) (b) N-terminal (K1). O sítio ativo corresponde a região central da estrutura.

A reação catalisada por enzima pode ser esquematizada como segue:



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. Sob condições apropriadas, a velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações da enzima e do substrato, da temperatura e do pH (LEHNINGER, 2002).

Várias enzimas dependem da presença de co-fatores, como vitaminas, para sua atividade catalítica. Além disso, podem ser necessários íons em solução, como por exemplo Ca^{+2} e Na^+ para estabilizar a conformação da proteína e Zn^{+2} , que deverá estar presente no sítio ativo de algumas enzimas (LEHNINGER, 2002).

A propriedade mais significativa de uma enzima é a sua capacidade de catalisar uma reação específica. De acordo com a reação que uma determinada enzima catalisa, as enzimas são classificadas nas seguintes classes: 1 - oxiredutases (reações de oxiredução), 2 - transferases (transferência de um radical de uma molécula para outra), 3 - hidrolases (hidrólise de ligações), 4 - liases (reações de eliminação), 5 - isomerases (formação de isômeros) e 6 - sintetases (formação de ligação).

Na classe das hidrolases estão as proteases (classe 3.4), também chamadas proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas, que promovem a hidrólise de ligações peptídicas (LOPEZ; OVERALL, 2002).

1.3.2 Classificação das proteases

As proteases são classificadas de acordo com sua fonte de origem, seja animal, vegetal ou microbiana, sua ação catalítica e pela natureza de seu sítio catalítico (OLSEN; FALHOLT, 1998).

Em relação à ação catalítica, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB do inglês *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, classifica as proteases em dois grupos principais: endopeptidases e exopeptidases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína (IUBMB, 1992).

As enzimas proteolíticas recebem o prefixo endo- quando clivam ligações no meio de cadeias polipeptídicas (DE SIMONE, 2001). As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores (HARTLEY, 1960). O prefixo exo- é utilizado quando as proteases clivam ligações em uma das extremidades da cadeia polipeptídica (DE SIMONE, 2001). As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos (HARTLEY, 1960).

As endopeptidases são divididas em quatro subgrupos baseados no seu mecanismo catalítico: serina protease, aspártico protease, cisteína protease e metalo protease (RAWLINGS; BARRET, 1993).

A família das serinos proteases contem dois subgrupos: serino de mamíferos (quimiotripsina) e serino bacteriana (subtilisina). Este último, sendo o grupo mais importante para aplicações em detergentes (OLSEN; FALHOLT, 1998). Possui como característica a presença de um resíduo de serina no seu sítio ativo e conservação de resíduos de glicina próximo ao sítio catalítico contendo a serina, formando motivo GSG (BRENNER, 1988).

Aspártico protease, conhecida como protease ácida, é uma endopeptidase que depende de dois resíduos de ácido aspártico para sua atividade catalítica (COATES et al, 2006). O resíduo de ácido aspártico do sítio catalítico da protease situa-se dentro do motivo DXG, onde X pode ser uma serina (SIELECKI et al, 1991).

A atividade das cisteíno proteases depende de um par catalítico que consiste em uma cisteína e uma histidina. Geralmente são ativas somente na presença de agentes redutores tais como HCN ou cisteína, e são inibidas por metais pesados (BARRETT, 1994).

As metalo proteases representam os mais diversos tipos catalíticos de proteases, que incluem enzimas de uma grande variedade de origens, como as collagenases de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de veneno de serpentes e termolisinas de

bactérias. Tem como característica a exigência de um íon metal divalente para sua atividade (HIBBS et al, 1985).

1.3.3 Uso de proteases para a produção de detergentes

A indústria biotecnológica produz várias enzimas para diferentes usos (Tabela 1), sendo as proteases uma das mais utilizadas. O uso de dessas enzimas em detergentes começou na década de 1930, com base nos estudos de Röehm, em 1913, no qual utilizou extratos do pâncreas, que possuem proteases (tripsina e quimotripsina), além de outras enzimas (carboxipeptidase, α -amilase, lactase, sacarase, maltase e lipase) (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; MAURER, 2004).

Tabela 1: Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais

Segmento Industrial	Enzima	Aplicação
Detergentes	Proteases, amilases, celulase, lipases,	Remoção de manchas, lavagem e clarificação de cores.
Álcool combustível	Amilase, Amidoglicosidase, 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.
Bebidas	Amilase, β -glucanase, Acetolactato descarboxilase, lacase, Pectinases.	Tratamento de sucos, maturação de cervejas.
Têxtil	Celulase, Amilase, Catalase.	Amolecimento do algodão, remoção de tintas em excesso.
Higiene pessoal e beleza	Amiloglicosidase, Glicose oxidase, Peroxidase.	Atividade antimicrobiana.

Fonte: adaptado de (KIRK, 2002)

Somente na década de 1960 as enzimas de origem bacteriana começaram a ser produzidas em larga escala na indústria. Inicialmente, estas enzimas foram produzidas usando duas espécies do gênero *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*. Além destas duas, outras espécies de *Bacillus* são usadas para obtenção de proteases para detergentes enzimáticos em todo o mundo: *B. clausii*, *B. lentus*, *B. alkaloophilus* e *B. halodurans*. Entretanto, recentemente, ocorreram modificações na produção de algumas enzimas. Por exemplo: para produção do detergente Savinase®, por muitos

anos, foi utilizado *B. subtilis* e atualmente é utilizado *B. clausii*. O produto FNA era produzido por *B. amyloliquefaciens* e hoje, por engenharia genética, é produzido por *B. subtilis* (MAURER, 2004). Outras espécies são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Espécies de bactérias usadas na produção de detergentes enzimáticos

Nome comercial	Origem bacteriana	Cepa produtora
FNA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
Purafect™	<i>B. lentus</i>	<i>B. subtilis</i>
FN4	<i>B. lentus</i>	<i>B. subtilis</i>
BLAP S	<i>B. lentus</i>	<i>B. licheniformis</i>
BLAP X	<i>B. lentus</i>	<i>B. licheniformis</i>
Properase™	<i>B. alkalophilus PB92</i>	<i>B. alkalophilus</i>
Everlase™	<i>B. clausii</i>	<i>B. clausii</i>
Esperase®	<i>B. halodurans</i>	<i>B. halodurans</i>
Savinase®	<i>B. subtilis</i>	<i>B. clausii</i>

Fonte: (adaptado de MAURER, 2004)

As proteases produzidas por espécies do gênero *Bacillus* são as enzimas mais utilizadas na indústria e em formulações de detergentes. As proteases alcalinas destas espécies são representadas pelas subtilisinas (GHAFLOOR; HASNAIN, 2009; MAURER, 2004). O êxito em empregar subtilisinas está baseado em vários fatores, incluindo a sua alta estabilidade e baixas especificidades para substrato. As subtilisinas são usadas em todos os tipos de detergentes para roupas e para limpeza automatizada. Sua função específica é degradar manchas proteicas típicas de sangue, leite, ovo e molhos (MAURER, 2004).

A utilização de proteases em formulações de detergentes requer que estas enzimas possuam elevada atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura, que sejam efetivas em baixas concentrações (0,4 – 0,8%) e compatíveis com vários produtos comerciais (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Apesar dos detergentes enzimáticos já serem utilizados há muitos anos, o seu uso no Brasil é mais recente. Na Tabela 3 são mostrados os principais detergentes enzimáticos de diversos fabricantes, disponíveis no mercado nacional, e o percentual das enzimas que os compõem. Como essas enzimas possuem ação direta sobre determinada substância deve-se, juntamente com os tensoativos, considerá-las como

um componente ativo em uma formulação, apesar de muitas formulações indicá-las como agentes coadjuvantes (MITIDIARI et al, 2002).

Tabela 3: Enzimas presentes em detergentes enzimáticos comercialmente disponíveis no Brasil

PRODUTO*	ENZIMAS PRESENTES	CONC. (%)
A	Protease	5,5%
B	Protease	1%
C	Protease	2,5%
	Amilase	2,5%
D	Protease	14%
	Lipase	4%
	Amilase	4%
E	Protease	6,25%
	Lipase	1,25%
	Amilase	0,25%
F	Protease	8%
	Lipase	5%
	Amilase	1%
	Carboidrase	5%
G	Protease	7%
	Lipase	1,5%
	Duas Amilases	0,75% e 0,75%
H	Protease	10%
	Lipase	12%
	Amilase	10%
	Carboidrase	7%
I	Duas Proteases	12% e 5%
	Lipase	12%
	Duas Amilases	7% e 10%
J	Protease	25%
	Amilase	25%
K	Protease	25%
	Amilase	25%
L	Protease	4%
M	Duas Proteases	6,25% e 18,75%
N	Protease	0.037%
	Lipase	0.009%
	Amilase	0.014%
O	Protease	4%
	Lipase	2,5%
	Amilase	0,5%
P	Protease	7.5%
	Lipase	5%
	Amilase	7,5%
	Carboidrase	---
Q	Protease	1%
	Lipase	5%
	Amilase	1%

*Os produtos foram identificados com letras, para preservar os nomes das empresas.
Fonte: Gerência Geral de Saneantes / Anvisa

A Anvisa define componente ativo como: “componente ativo ou princípio ativo – componente presente na formulação para conferir eficácia ao produto, segundo sua finalidade” (BRASIL, 2010).

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 frequentemente 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. Devido a essas características, a EC da IUBMB e a União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*, vem editando as recomendações para a definição do conceito de atividade enzimática. Esta definição indica que a concentração enzimática em uma formulação deve ser definida não em termos de volume ou massa e sim da sua atividade enzimática expressa em unidades de atividade enzimática internacional (U.I), do inglês *Unit International* (IUBMB, 1992; MITIDIERI et al, 2002).

1.3.4 Método espectrofotométrico para determinação de atividade proteolítica

Nas últimas décadas, a medida da atividade proteolítica tem recebido uma significativa atenção, devido à importância dessas enzimas principalmente em processos fisiopatológicos. Embora alguns novos métodos de análise dessas enzimas tenham sido publicados, muitos métodos tradicionais são efetivos e ainda estão em uso (SARATH; ZEECE; PENHEITER, 2001).

Vários métodos têm sido descritos para detectar e quantificar a atividade proteolítica. Dentre eles os mais simples e acessíveis utilizam reações colorimétricas, que são detectadas e quantificadas por espectrofotometria (BENDICHO et al, 2002).

A espectrofotometria tem ampla aplicação em laboratórios de análises e pesquisas físicas, químicas, bioquímicas e farmacológicas. A principal vantagem é ser uma técnica espectroscópica quantitativa. Aliado a isto, a técnica tem baixo custo operacional, é de fácil utilização e produz resultados de interpretação geralmente

bastante simples. Em laboratórios analíticos, esta técnica é muito utilizada na quantificação direta de pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos ou na quantificação indireta de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas, através da titulação de indicadores cromogênicos e/ou reagentes específicos. Sua utilização para pesquisa científica e tecnológica abrange a caracterização físico-química de reações químicas e bioquímicas, a descrição de mecanismos e cinéticas de reações biológicas complexas, e até a investigação de propriedades óptico-eletrônicas de filmes finos de novos materiais (GALO; COLOMBO, 2009).

Alguns métodos utilizam substratos de baixa massa molecular, como peptídeos sintéticos que têm ligações com grupos cromogênicos. Outros métodos utilizam proteínas, como a albumina sérica bovina e a caseína. Há ainda métodos que utilizam como substratos proteínas funcionalizadas, como a azocaseína, azoalbumina ou azogelatina (BENDICHO et al, 2002).

Uma etapa importante no ensaio de atividade proteolítica é a escolha do substrato. Se a enzima de interesse é uma protease bem caracterizada, os melhores substratos já são conhecidos, e as informações sobre as cinéticas de hidrólise estão descritas. Entretanto, quando a protease a ser testada não está bem caracterizada, empregam-se substratos inespecíficos, como proteínas, funcionalizadas ou não (SARATH; ZEECE; PENHEITER, 2001).

A azocaseína é um derivado da caseína em que é preparado pela reação com a diazosulfonilamida que apresenta coloração alaranjada (CHARNEY; TOMARELLI, 1947). A determinação de atividade proteolítica utilizando a azocaseína é adequada, pois depende da liberação de peptídeos coloridos de baixa massa molecular solúveis no sobrenadante após a precipitação de grandes fragmentos desta azoproteína em solução de ácido tricloroacético, permitindo assim medir a atividade enzimática utilizando uma técnica colorimétrica de baixo custo (SARATH; ZEECE; PENHEITER, 2000). Qualquer que seja o método escolhido há necessidade de validá-lo de forma a obter resultados confiáveis (ABNT NBR, 2005).

1.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou usos específicos pretendidos foram atendidos (ABNT NBR, 2000).

A validação é o processo em que se demonstra, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas as quais ele se destina, assegurando a confiabilidade dos resultados. Especificidade, faixa linear, linearidade, exatidão, precisão, efeito matriz e robustez são os parâmetros analíticos de desempenho avaliados numa validação analítica (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Um método de ensaio deve ser validado para verificar se os parâmetros de desempenho estão adequados ao propósito da análise. A validação deve ser feita quando uma nova metodologia analítica é desenvolvida, quando uma metodologia já empregada é revisada e ajustada a novos analitos, quando esta sofre mudanças nos seus resultados com o passar do tempo, quando a metodologia analítica já utilizada vai ser realizada por um novo analista ou um novo equipamento e para demonstrar a igualdade entre dois métodos (INMETRO, 2010).

A legislação atual que estabelece os parâmetros para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos não só para medicamentos, mas também para todos os produtos de âmbito sanitário é a Resolução Específica (RE) n° 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003).

Esta RE estabelece ainda quatro categorias para validação analítica de um novo método, sendo estas:

- Categoria I – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
- Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
- Categoria III – Testes de performance (dissolução, liberação do ativo).
- Categoria IV – Testes de identificação.

No Brasil, além da Anvisa, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) disponibiliza um guia para o procedimento de validação de métodos analíticos, identificado como documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 (Revisão 01,02 e atualmente a última edição nº 03) de fevereiro de 2010 (INMETRO, 2010).

Para cada categoria de elaboração de métodos analíticos desenvolvidos, um conjunto de ensaios é exigido. Nas Tabelas 4 e 5 são mostradas as exigências feitas pela Anvisa e Inmetro, respectivamente. Apesar das diferenças de nomenclatura, os parâmetros são muito semelhantes, com a exceção de ensaios limites que não são preconizados no documento do Inmetro.

Tabela 4: Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa

Parâmetros	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
	ANVISA	A	B	ANVISA	ANVISA
Especificidade	S	S	S	*	S
Faixa linear de trabalho	S	S	N / *	*	N
Linearidade	S	S	N / *	*	N
Limite de Detecção	N	N	S	*	N
Limite de Quantificação	N	S	N	*	N
Exatidão / Recuperação	S	S	*	*	N
Precisão / Repetibilidade	S	S	N	S	N
Precisão Intermediária	**	**	N	**	N
Seletividade / Efeito Matriz	S	S	S	*	S
Robustez	S	S	*	*	N

A – Ensaio quantitativo

B – Ensaio limite

S – Exigido

N – Não exigido

*dependendo da natureza do ensaio específico pode ser necessário

**se houver comprovação da reprodutividade não é necessária a comprovação da precisão intermediária

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2003)

Tabela 5: Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro

Parâmetros	Ensaio qualitativo	Determinação do analito principal	Análise de traços	Propriedades físicas
Especificidade	S	S	S	S
Faixa linear de trabalho	N	S	S	S
Linearidade	N	S	S	S
Limite de Detecção	N	N	S	N
Limite de Quantificação	N	N	S	N
Exatidão / Recuperação	N	S	S	S
Precisão / Repetitividade	N	S	S	S
Precisão Intermediária	N	S	S	S
Seletividade / Efeito Matriz	S	S	S	S
Robustez	S	S	S	S

S – Exigido N – Não exigido
 Fonte: Adaptado de (INMETRO, 2010)

A seguir serão apresentados os principais parâmetros avaliados em métodos analíticos para a determinação de analito principal.

1.4.1 Especificidade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição (INMETRO, 2010). Um método é específico quando produz resposta para apenas um analito.

Especificidade é a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para um método específico devem ser analisados o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais iniciais ou do processo, subprodutos e produtos de degradação ou metabólitos e reagentes em branco (INMETRO, 2007; LEITE, 2008).

Em métodos que utilizam radiação ultravioleta, a especificidade pode ser determinada comparando resultados de detecção (espectrograma de varredura) obtidos em amostras, matriz sem analito, padrões e reagentes em branco.

1.4.2 Faixa linear de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade (INMETRO, 2010). Geralmente são necessários mais do que seis pontos de calibração. Recomendam-se sete pontos, três de valores inferiores e três valores superiores à concentração mais esperada.

1.4.3 Linearidade

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (INMETRO, 2010).

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 equação da reta que relaciona estas duas variáveis é:

$$y = a + bx$$

Onde:

- y = resposta medida (absorbância)
- x = concentração
- b = Inclinação da curva analítica = sensibilidade
- a = Interseção com o eixo y , quando $x = 0$

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) (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010). A Tabela 6 descreve os parâmetros envolvidos na avaliação e a justificativa de sua utilização.

Tabela 6: Parâmetros da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica

Teste	Justificativa	Avaliação
<i>Significância da regressão</i>	Verificar se a regressão é significativa.	Na regressão: $p < 0,001$
<i>Desvio de linearidade</i>	Verificar a adequação do modelo estatístico	No ajuste: $p > 0,05$
<i>Coefficiente de correlação linear</i>	Verificar a correlação entre os resultados e a concentração do analito	$r > 0,90$ (Inmetro) $r > 0,99$ (Anvisa)
<i>Gráfico de resíduos</i>	Observar a dispersão de resíduos nos limites estabelecidos	Desejável que estejam o mais próximo possível da linha central
<i>Normalidade de resíduos</i>	Verificar a tendências dos resíduos obedecerem a distribuição normal	$R_{eq} > R_{crit}$
<i>Autocorrelação de resíduos</i>	Verificar a independência dos resíduos	Independentes: $d_{calc} > d_U$ Dependentes: $d_{calc} < d_L$ Inconclusivo: $d_L < d_{calc} < d_U$ $\alpha = 0,05$
<i>Homogeneidade</i>	Verificar a homogeneidade das variâncias dos resíduos	$p > 0,05$

Fonte: Adaptado de (SOUZA, 2005)

1.4.4 Limite de detecção e limite de quantificação do método

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de

concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. Este menor valor de concentração é chamado de limite de detecção (LD).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. O LQ é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio de análise de soluções contendo concentrações decrescentes até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2007).

1.4.5 Exatidão / recuperação analítica

A exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e a quantidade do analito realmente existente na amostra. Quando a exatidão é aplicada a uma série de resultados de ensaios ela pode ser expressa como recuperação analítica (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

A recuperação é a porcentagem da concentração real de um analito recuperado durante o processo analítico e é usado quando não se encontra um material de referência certificado disponível (CE, 2002). Pode ser estimada por análise de amostras com quantidades conhecidas de adição do analito. Devem ser escolhidos pelo menos três níveis de adição, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007). A porcentagem de recuperação pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$\%R = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

Onde:

C_1	=	concentração de analito na amostra adicionada de padrão
C_2	=	concentração de analito na amostra não adicionada de padrão
C_3	=	concentração de analito na solução padrão

1.4.6 Precisão

A precisão avalia a proximidade de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou padrões obtidos em condições pré-estabelecidas e específicas (BRASIL 2003; INMETRO 2007).

A precisão é usualmente expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV), onde uma menor precisão é dada através de um maior desvio-padrão (INMETRO, 2007).

Os três níveis mais comuns de avaliar a precisão de um método de ensaio são através da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetitividade avalia a variabilidade de resposta esperada quando um método é executado por um só analista, com um só procedimento, em um só equipamento e local, num mesmo período de tempo. Já a precisão intermediária e a reprodutibilidade são usadas em validações intra e interlaboratoriais respectivamente, quando um método vai ser executado por diferentes analistas, por mais de um equipamento, períodos de tempo distintos e/ou em diferentes laboratórios (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

1.4.6.1 Repetitividade

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (INMETRO, 2010). Recomendam-se sete ou mais repetições para o cálculo do coeficiente de variação de repetitividade (CV_{repe}), estabelecido conforme expressão abaixo:

$$CV_{repe}(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Onde:

- s = desvio padrão
- \bar{x} = concentração média determinada

1.4.6.2 Precisão intermediária

Na determinação da precisão intermediária, efetuam-se “n” medições em replicata, sobre a mesma amostra, nas condições pré-definidas. Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intra-laboratorial, existem vários métodos para a determinação e controle desse parâmetro de qualidade, um destes métodos é usando as expressões abaixo (INMETRO, 2007).

$$CV_{precint} (\%) = \frac{S_i}{\bar{X}} \times 100$$

$$S_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \cdot \sum^t \sum^n (Y.jk - Y_j)^2}$$

- Onde:
- $CV_{precint}$ = Coeficiente de variação de precisão intermediária
 - $S_i()$ = desvio padrão (onde os símbolos relativos as condições intermediarias de precisão podem aparecer entre parênteses)
 - t = total de amostras ensaiadas
 - n = total de ensaios efetuados por amostra
 - j = número da amostra, $j = 1, t$
 - k = número do ensaio da amostra j , $k = 1, n$
 - Y_{jk} = valor do resultado k para amostra j
 - Y_j = representa a media aritmética dos resultados da amostra j

1.4.7 Seletividade / efeito matriz

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz, e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar (INMETRO, 2007).

A seletividade, que avalia o efeito da matriz, é a capacidade de um método em distinguir o analito de outras substâncias, e prova que o resultado da análise provém apenas do analito em questão e não de outros compostos quimicamente ou fisicamente

semelhantes. Um interferente pode diferir seu comportamento, interferindo mais ou menos, dependendo da concentração do analito, provocando alterações na linearidade da curva-padrão. Para testar esta característica devem ser utilizadas substâncias homólogas, análogas, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz e metabólitos do analito para confirmação de que não há interferentes. Para tal, devem ser selecionadas substâncias potencialmente interferentes para estimar o efeito destes (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2007; LEITE, 2008).

Vários testes e suas avaliações estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo do efeito matriz dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra sem analito está disponível, pode ser aplicado o teste t (Student) de comparação de médias. Para esse caso indica-se avaliar primeiramente se as variâncias de “n” replicatas das amostras podem ser consideradas iguais através do teste F (Snedecor), para em seguida aplicar o teste t.

Se a matriz sem o analito não estiver disponível, o efeito matriz pode ser testado preparando-se curvas analíticas simples e curvas de materiais de referência ou de adição do analito. As curvas de analito em matriz são preparadas por adição do analito a soluções teste, obtidas de amostras ensaiadas nas mesmas condições dos procedimentos normais. É necessário avaliar se os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas para o solvente e para matriz são significativamente diferentes através do teste t (Student) (INMETRO, 2007; SNEDECOR; COCHRAN, 1989).

1.4.8 Robustez

A robustez é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, por exemplo, as condições de armazenamento, as condições ambientais e/ou preparação da amostra ou a pequenas alterações específicas (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2007).

Nessa avaliação é possível identificar variações no método que possuem efeito significativo nos resultados analíticos. Um método é robusto quando se apresenta praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando de sua

execução. Quanto maior a robustez de um método maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão e a confiabilidade durante o uso normal (BRASIL, 2003; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2007).

Para métodos com poucas variações possíveis, pode-se avaliar a robustez utilizando a comparação de médias através do teste *t*. Analisam-se “n” replicatas de uma amostra nas condições normais do método e repete-se o procedimento com a mesma amostra para cada uma das variações (HUBER, 1998; SOUZA, 2005). A Resolução n° 899 estabelece variações do pH da solução, de temperatura e de diferentes fabricantes de solventes como parâmetros para determinação da robustez quando se utiliza a técnica espectrofotométrica (BRASIL, 2003).

1.5 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS

A etapa de limpeza de artigos hospitalares é reconhecida como fundamental para esterilização ou desinfecção adequadas e para o reprocessamento de dispositivos médicos. Proteínas residuais aderidas sobre os instrumentos após a sua utilização podem afetar adversamente a esterilização química e física, apresentando um sério desafio para um bom reprocessamento (CHEETHAM, 2005).

Dispositivos médicos como os laparoscópios rígidos e artroscópios são exemplos de dispositivos de fácil higienização, por serem retos e terem uma superfície lisa de metal inoxidável, sem lumens ou dobradiças. Entretanto, o formato de alguns equipamentos e acessórios usados em cirurgias minimamente invasivas (que possuem estrutura tubular com lumens internos) dificulta a limpeza e o reprocessamento caso não possam ser desmontados (ALFA; NEMES, 2003).

O reprocessamento desses dispositivos requer uma limpeza manual perfeita com rigoroso enxague. A perfeição da limpeza manual de lumens estreitos e de partes difíceis de limpar como as articulações e superfícies corrugadas são particularmente críticas, uma vez que a matéria orgânica residual pode interferir com a eficácia de esterilizantes/desinfetantes (ALFA; JACKSON, 2001).

Resíduos de sangue seco representam um desafio significativo para limpeza de instrumentos cirúrgicos. Os componentes do sangue solúveis em água tornam-se

facilmente insolúveis quando exposto ao calor, ao tempo em temperatura ambiente, ou soluções químicas. O componente do sangue insolúvel em água é a fibrina formada durante a coagulação. Esta proteína liga-se facilmente às superfícies de instrumentos cirúrgicos tornando-os difícil de remover, mesmo com a ajuda de agentes químicos de limpeza (ASTM, 2006). A principal função desses produtos é remover os resíduos de proteínas humanas antes da etapa de esterilização / desinfecção (CHEETHAM, 2005).

Algumas normas atuais indicam que um bom parâmetro de limpeza para dispositivos médicos é que devem estar visivelmente limpos (ISO 15883). A Norma ASTM D 7225-06 padroniza um ensaio para avaliação da eficiência de limpeza em detergentes enzimáticos (ASTM, 2006). Para avaliar o desempenho dos detergentes com proteases utiliza-se como corpo de prova um coágulo formado por proteínas do sangue humano em uma superfície de aço inox. Esse material é exposto ao detergente nas condições de diluição recomendadas pelo fabricante. Após o período máximo de 60 minutos, os resíduos devem ser eliminados.

Desta forma, considerando a importância dos detergentes enzimáticos e a inexistência de metodologia nacional padronizada para analisar as atividades proteolíticas em tais produtos, fez-se necessário o estudo e estabelecimento de um método que possa ser utilizado pelo INCQS e pelos Lacens, a fim de dar suporte às ações de Vigilância Sanitária, e pelos produtores, gerando subsídios para regulamentação desses produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar um método espectrofotométrico para determinação da atividade proteolítica em detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS e avaliar o desempenho de detergentes comerciais, comparando os resultados alcançados nos dois métodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar e validar um método de dosagem da atividade proteolítica por espectrofotometria em formulações de detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS.
- Determinar as atividades proteolíticas em amostras de detergentes enzimáticos comerciais para uso em EAS.
- Determinar o desempenho dos detergentes enzimáticos através do teste de triagem segundo a Norma ASTM D 7225-06.
- Avaliar o desempenho global dos detergentes enzimáticos comparando as atividades proteolíticas com o ensaio de desempenho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE DETERGENTES

Para validação do método enzimático foi escolhida como amostra de trabalho o detergente multienzimático 3M e como matriz sem o analito a base detergente 3M, ambos providenciados pela 3M do Brasil. Na etapa de determinação e comparação da atividade enzimática com o teste de desempenho foram encaminhadas pelos fabricantes por solicitação da GG-SAN / Anvisa dez amostras de detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS. A composição de cada amostra, assim como a diluição de uso recomendada pelo fabricante, estão reunidas no ANEXO A.

3.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram fornecidos pela Merck, com exceção da azocaseína (Sigma). O simulador de sujidade utilizado foi o *TOSI®* (Pereg - Waldkralburg). Foi usado tris hidroximetil amino metano (Vetec e Sigma) para a avaliação da robustez. Como material de referência foi utilizado o extrato enzimático de protease de *Bacillus subtilis* (1763 U/mL) fornecido pela 3M do Brasil. Nas determinações dos parâmetros de validação foi usado como solução estoque protease (100 U/mL).

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.

3.4 EQUIPAMENTOS

Para os ensaios foram utilizados os seguintes equipamentos, todos devidamente qualificados e/ou calibrados.

- Espectrofotômetro UV-VIS Cary 50, fabricante Cary Varian (Departamento de Química do INCQS/Fiocruz – sala 115)
- Espectrofotômetro UV-VIS Hitachi U2900, fabricante Hitachi (Departamento de Química do INCQS/Fiocruz – sala 112)
- pHmetro digital Micronal B474, fabricante Micronal (Departamento de Química do INCQS/Fiocruz – sala 113)
- Balança analítica com resolução de 0,01 mg, fabricante Mettler Toledo, modelo AG 204 (Departamento de Química do INCQS/Fiocruz – sala 112)
- Balança semi-analítica com resolução de 0,1 mg, fabricante Bell Engineering, modelo Mark 2200 (Departamento de Química do INCQS/Fiocruz – sala 112)
- Centrífuga refrigerada, fabricante Eppendorf, modelo 5415R (Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz – sala 118)
- Banho termostático, fabricante Sieger, modelo Stern 6 com faixa de temperatura de 25 a 60°C (Departamento de Química do INCQS/Fiocruz – sala 112)

3.5 MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Medicamentos, Saneantes e Cosméticos do Departamento de Química do INCQS, na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no período de abril de 2010 a janeiro de 2012.

3.5.1 Determinação da atividade proteolítica

Em um tubo de centrífuga de 1,5 mL, adicionaram-se 200 µL de tampão tris-HCl 0,05M pH 8,0 e 100 µL da solução de azocaseína 2%. A solução foi incubada em banho-termostático a 40°C até atingir o equilíbrio térmico. Adicionaram-se 100 µL da

amostra que permaneceu no banho por mais 15 minutos a mesma temperatura. Essa sequência foi seguida para os demais tubos em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos). A reação foi interrompida adicionando-se 800µL de ácido tricloro acético – TCA do inglês *trichloroacetic acid*, a 20%, observando-se os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (15 minutos) fosse o mesmo em todos os tubos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 9000 g por 5 minutos e recolheu-se o sobrenadante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 340 nm e utilizou-se a solução tampão tris-HCl para zerar o equipamento. O branco do ensaio foi preparado adicionando-se 200µL de tampão tris-HCl 0,05M, 100µL de azocaseína 2%, 800µL de TCA 20% e 100 µL de amostra. A unidade de atividade proteolítica é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de uma unidade de densidade óptica (absorbância) por mL de amostra por minuto de reação.

A atividade proteolítica foi determinada através da seguinte expressão:

$$U/mL = \frac{(ABS_{AM} - ABS_{BR}) \times 2 \times f_d}{3}$$

Onde:

U/mL	=	Unidade de atividade proteolítica
ABS_{AM}	=	Absorbância da amostra.
ABS_{BR}	=	Absorbância do branco da amostra.
f_d	=	Fator de diluição da amostra, quando hover

3.5.2 Validação do método de determinação de atividade proteolítica

Nos detergentes enzimáticos comercialmente disponíveis no Brasil, faltam informações sobre a concentração/atividade das enzimas constituintes. Senso assim, não há critérios que enquadrem estes produtos em órgãos que estabelecem parâmetros para validação de métodos analíticos. O método validado pode ser categorizado pela Anvisa como categoria II, A, sendo que também foi determinado o

limite de detecção, podendo o método ser enquadrado no Inmetro como análise de traços. Mesmo considerando que as enzimas são constituintes dos detergentes, optou-se por fazer dessa forma devido a carência de informação sobre esses produtos.

3.5.2.1 *Preparação da amostra*

Para a validação do método enzimático a amostra de trabalho 3M do Brasil e sua matriz sem o analito foram preparadas de acordo com a diluição de uso manual recomendada pelo fabricante, adicionando-se 150 μ L em 50 mL de água destilada.

3.5.2.2 *Especificidade*

Na avaliação da especificidade foram realizadas varreduras de 200 a 550 nm de espectros de absorção molecular, após o ensaio enzimático, na solução estoque de protease, na amostra de trabalho e na matriz sem analito, todas com diluição 150 μ L em 50mL, e no branco do ensaio.

3.5.2.3 *Faixa linear de trabalho*

Para avaliação da faixa linear de trabalho foi construída uma curva de Ringbom para determinação do intervalo de concentrações adequado para a curva analítica. A partir da solução estoque, 100 U/mL de protease, foram transferidas alíquotas para obtenção da curva de Ringbom com 22 pontos de concentrações de atividade proteolítica crescentes. As alíquotas foram adicionadas em balões volumétricos de 50 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 20 a 3000 mU/mL de protease, como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear de trabalho

Pontos	Alíquotas da solução estoque 100 U/mL de protease (µL)	Atividade final (mU/mL)
1	10	20
2	20	40
3	30	60
4	40	80
5	50	100
6	75	150
7	100	200
8	125	250
9	150	300
10	175	350
11	200	400
12	225	450
13	250	500
14	275	550
15	300	600
16	350	750
17	400	800
18	450	950
19	500	1000
20	600	1200
21	1000	2000
22	1500	3000

3.5.2.4 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). A exposição das considerações e cálculos envolvidos apresentam-se descritos no ANEXO B.

Foram preparadas três curvas analíticas em sete níveis de concentração, igualmente espaçados, preparados independentemente, com três replicatas independentes de cada nível. As soluções de protease utilizadas foram preparadas a partir de uma solução estoque 100 U/mL. Na Tabela 8 estão reunidos os valores das concentrações das soluções.

Tabela 8 - Concentrações das soluções de protease

Níveis de concentração	Alíquotas da solução estoque 100 U/mL (µL)	Concentração final (U/mL)
1	75	0,15
2	100	0,20
3	125	0,25
4	150	0,30
5	175	0,35
6	200	0,40
7	225	0,45

A segunda etapa da avaliação da linearidade foi composta das médias correspondentes a cada nível de concentração para as seguintes avaliações:
i) aplicação do MMQO, incluindo estimativa dos parâmetros da regressão e tratamento

dos valores extremos; ii) estimativa da inclinação, interseção, resíduos da regressão, respectivas variâncias e R^2 e r ; iii) construção e inspeção visual do gráfico x-y das respostas versus a concentração do analito; iv) investigação e exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados por Jackknife (SOUZA, 2005).

Na terceira etapa foi realizada a validação do uso do MMQO por meio da verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear: i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; ii) homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; iii) autocorrelação dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson e iv) teste da significância da regressão e do desvio da linearidade por análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2005).

3.5.2.5 *Limite de detecção e limite de quantificação do método*

Há três formas de estimar os limites de detecção e de quantificação, e a escolha de uma delas deve levar em consideração a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária: método visual, método da relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica (ICH, 1996; INMETRO, 2007). Pela sua robustez, os limites de detecção e quantificação do método foram determinados a partir do intervalo de confiança da curva analítica utilizando a planilha de avaliação de linearidade de curva analítica obtida para a avaliação da linearidade.

3.5.2.6 *Exatidão / recuperação*

Para avaliação da recuperação foram testados 03 níveis de concentração (baixo, médio e alto) da curva analítica, todos em triplicata. Prepararam-se 4 (quatro) soluções com quantidades de amostra que produza metade da concentração do segundo nível (0,15 U/mL) em balão volumétrico de 50 mL. Na primeira solução não foi adicionado padrão (branco), nos demais se acrescentaram quantidades de padrão até atingir o nível de concentração esperado. As concentrações finais são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentrações finais de protease nas soluções para avaliação da recuperação

Níveis	Nível 1 Branco	Nível 2 Baixo	Nível 3 Médio	Nível 4 Alto
Amostra de trabalho	37,5 µl (0,075 U/mL)	37,5 µl (0,075 U/mL)	37,5 µl (0,075 U/mL)	37,5 µl (0,075 U/mL)
Solução Estoque	---	37,5 µl (0,075 U/mL)	112,5 µl (0,225 U/mL)	187,5 µl (0,375 U/mL)
Total (U/mL)	37,5 µl (0,075 U/mL)	75 µl (0,15 U/mL)	150 µl (0,30 U/mL)	225 µl (0,45 U/mL)

3.5.2.7 Precisão

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

3.5.2.7.1 Repetitividade

A repetitividade foi realizada pelo analista envolvido no processo de validação, que executou todos os outros parâmetros analíticos. Para o estudo da atividade proteolítica a repetitividade foi realizada através de 10 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).

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

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).

$$HorRat_{repe} = \frac{CV_{repe}(\%)}{\frac{2}{3}DPR_r}$$

Foram preparadas dez alíquotas de amostra na concentração aproximada de 0,30 U/mL, que é aproximadamente o ponto central da curva analítica.

3.5.2.7.2 Precisão intermediária

Para o estudo da atividade proteolítica 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).

$$DPR_R = 2^{(1-0,5\log C)}$$

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

Onde: DPR_R = desvio padrão relativo de precisão intermediária previsto pela equação de Horwitz
 C = média das concentrações

3.5.2.8 Seletividade / efeito matriz

Para determinação do efeito matriz foram utilizados dois grupos de amostra de teste, um grupo através da curva analítica do método e uma curva de adição do analito. Ambos os grupos tiveram a concentração do analito idêntica em cada nível de

concentração de interesse. Na curva de adição do analito foram realizados a análise de dados e os testes de premissas conforme ANEXO B.

Após a análise da linearidade das curvas, o efeito matriz foi avaliado pelas comparações das inclinações e interseções das duas curvas, utilizando-se os testes F e *t* conforme mostrado no ANEXO C.

3.5.2.9 Robustez

Para avaliação da robustez foram definidas pequenas e deliberadas variações no método a serem verificadas, conforme mostradas na Tabela 10.

Tabela 10: Variações no método para a determinação da robustez

Parâmetros	Condição normal	1ª Variação	2ª Variação
1. pH da solução tampão	8,0	7,9	8,1
2. Temperatura	40 °C	39 °C	41 °C
3. Diferentes fabricantes de reagentes* (Tris hidroximetil aminometano)	Merck	Sigma®	Vetec

*solventes de grau P.A.

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 (ANEXO D).

3.5.4 Avaliação do desempenho em detergentes enzimáticos

3.5.4.1 Determinação do pH das amostras

Foram realizadas determinações do pH na diluição de uso e na forma íntegra das dez amostras, na temperatura ambiente.

3.5.4.2 Atividades proteolíticas nas amostras de detergentes enzimáticos

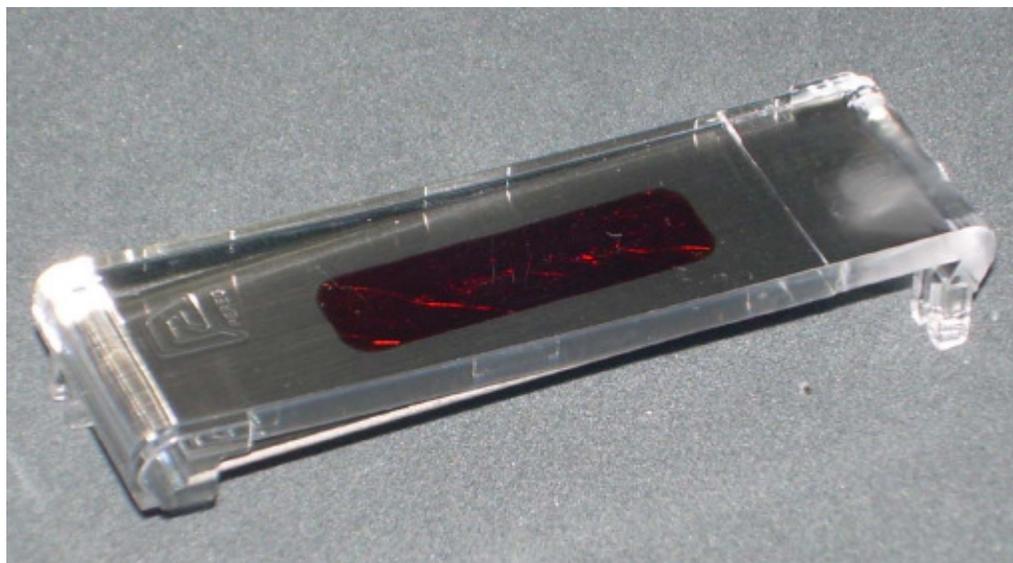
Foram determinadas as atividades proteolíticas utilizando o método enzimático validado nas dez amostras de detergentes enzimáticos.

3.5.4.3 Ensaio de desempenho de detergentes enzimáticos

No ensaio de desempenho das amostras de detergentes enzimáticos foi utilizado teste de triagem de detergentes enzimáticos do método da American Standard Test Method (ASTM) que trata da eficiência na limpeza de sangue de detergentes e lavadoras desinfectoras (ASTM, 2006).

Utilizou-se como simulador de sujidade residual o teste de superfície TOSI®, mostrado na Figura 2. Este teste é empregado na validação rotineira de lavadoras termo-desinfectoras de acordo com a EN ISO 15883 (PFEIFER, 2010).

Figura 2: Simulador de sujidade residual TOSI®



Fonte: site da AMCOR
<http://www.amcor.com>

Estes testes são monitores de limpeza, comercialmente disponíveis, que simulam a sujidade formada por sangue humano. Para alcançar coagulação equivalente ao sangue humano utilizam-se os componentes: fibrinogênio, trombina, albumina e hemoglobina purificadas, simulando a composição do sangue (PFEIFER, 2010). Esta sujidade está fixada sobre a superfície de uma lâmina de aço inoxidável, com tamanho proporcional (70 x 20 x 1 mm) ao estabelecido pelo método ASTM D 7225-06. Após o uso, o valor do simulador de sujidade é avaliado visualmente e recebe a pontuação 0, 1, 2, 3, 4 ou 5, com 0 representando uma limpeza total do dispositivo e 5 representando um teste não limpo, de acordo com guia de eliminação de falhas (ANEXO E).

Método

As 10 (dez) amostras de detergentes enzimáticos foram preparadas de acordo com as recomendações da rotulagem, reunidas no ANEXO F. Transferiu-se cada solução para beckeres de 50mL e aqueceu-se em banho termostático até que a temperatura recomendada fosse atingida. Inseriu-se verticalmente a placa de simulador de sujidade TOSI® dentro da solução, tomando o cuidado para que esta estivesse inteiramente submersa e que não fosse aplicada nenhuma agitação ou outra ação mecânica. As placas foram removidas após o tempo de submersão recomendado pelo fabricante (ANEXO F) e após 15, 30 e 60 minutos, segundo o método ASTM D 7225-06. Deixou-se secar para visualizar a presença de resíduos remanescentes. O valor do simulador de sujidade foi classificado de acordo com as interpretações do teste de triagem utilizando o simulador de sujidade TOSI®, reunidas no ANEXO E. Os resultados do teste de triagem foram fotografados como forma de registro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

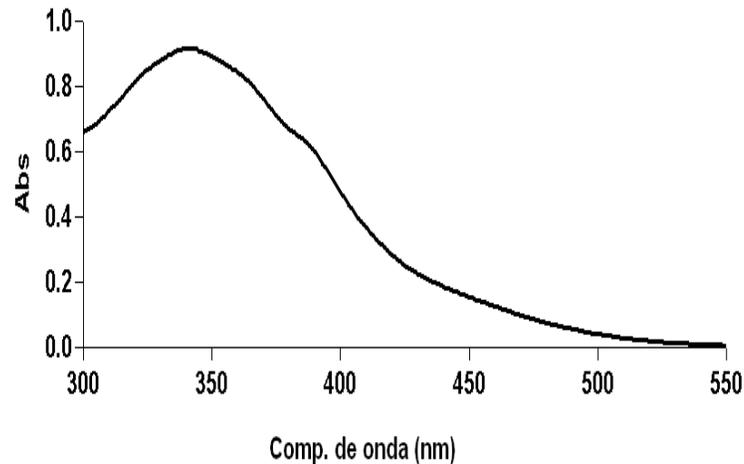
4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para adaptação de método espectrofotométrico, inicialmente, foi examinado o espectro de absorção a fim de definir as bandas de absorção máxima e suas intensidades e escolher o comprimento de onda de trabalho, onde não devem ser observadas interferências da matriz, impurezas ou de solventes, uma vez que, no caso dos detergentes, outros componentes da formulação podem, a princípio, interferir nos resultados.

Nos métodos descritos por Banerjee (1999) e Nascimento (2006) que estudaram a eficácia da protease de *B. brevis* na presença de detergentes comerciais e a compatibilidade da protease de *Bacillus* sp. com detergente em pó, a atividade proteolítica sobre a azocaseína foi determinada usando o comprimento de onda de 420 nm. Germano (2003) investigando as características da protease de *Penicillium* sp. na fermentação em estado sólido e Santos (2005) estudando as condições ótimas de pH e de concentração de azocaseína na determinação da atividade proteolítica em extratos de folhas de *Panicum maximum* cv., utilizaram o comprimento de onda de 440 nm. Outros métodos trabalham na região do ultra-violeta (UV). Christen (1984) descrevendo sobre a atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* 27 em três tipos de caldo de carne e Bendicho (2002) determinando a atividade proteolítica em três tipos de leite utilizaram o comprimento de onda de 345 nm.

Para escolha do comprimento de onda foi observado que os maiores valores de unidade de absorbância (Abs) foram em 340 nm, conforme mostrado na Figura 3. Escolheu-se trabalhar com esse comprimento de onda para aumentar a sensibilidade do método, a fim de detectar a atividade proteolítica em soluções diluídas. O estudo da especificidade, que será mostrado a seguir, demonstrou que não houve interferência nesse comprimento de onda.

Figura 3 – Espectro de absorção na região do UV-Vis referente ao padrão de protease 3M



Outros parâmetros como temperatura e pH são importantes no decorrer do ensaio enzimático. Os detergentes que utilizam proteases são classificados por aplicações em diferentes tipos de meio: alcalino, altamente alcalino, água fria e estável frente a alvejante (OLSEN; FALHOLT, 1998). Segundo Kumar (1999) a faixa de pH e temperatura ótima para proteases alcalinas variam de 9,0 a 11,0 e 50 a 70°C, respectivamente. Os resultados alcançados por Mukherjee (2008) e Ghafoor (2009) mostraram que, na determinação da atividade proteolítica em extratos enzimáticos produzidos por *B. subtilis*, a faixa de temperatura ótima variou entre 40 a 60°C e a faixa de pH variou entre 8,0 e 9,0. Além disso, o substrato cromogênico azocaseína é insolúvel quando se utiliza tampões de valores de pH abaixo de 6,0 (SARATH; ZEECE; PENHEITER, 2001). Por esses motivos, nas determinações das atividades proteolíticas trabalhou-se com o tampão tris HCl pH 8,0 a 40°C.

Em relação à unidade de atividade proteolítica, uma U.I é a quantidade de enzima capaz de produzir um μmol de produto, por min. em condições padrões. Essa forma de determinação é precisa quando se trata de substratos bem definidos e baseados em uma padronização e possibilita perfeitas comparações entre diferentes formulações (IUBMB, 1992). Alternativamente, quando se trata de reações mais complexas, onde os substratos ou os produtos da reação não são moléculas definidas, como a azocaseína, a EC 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,1992), estabelecendo-se uma unidade arbitrária. Na determinação da atividade proteolítica não foi preparada uma curva de análise, e, portanto, calculou-se a atividade diretamente através da variação de Abs por mL de amostra por minuto de reação. Como todas as análises foram realizadas em 15 min de incubação, omitiu-se a unidade de tempo (min), permanecendo então U/mL como unidade de atividade proteolítica.

O presente método foi similar ao o estudo de Bendicho (2002), que otimizou e validou um método para atividade proteolítica em diferentes tipos de leite: integral, desnatado e desnatado ultrafiltrado. Além do comprimento de onda em 345 nm mencionado anteriormente, foi utilizada uma solução de azocaseína 1%. Como sistema tamponante foi usado fosfato de sódio 0,05 M pH 7,2, interrompendo-se a reação com uma solução de TCA 5%, após 15 min, a 35,5°C. Contudo, não foram informados o tempo e a velocidade de rotação da etapa de centrifugação.

Em relação aos parâmetros de validação, Bendicho (2002) estudou apenas a faixa linear, linearidade, LD e LQ, precisão (repetitividade) e exatidão que serão discutidos a seguir.

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

4.2.1 Especificidade

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

Após estabelecer as condições do método, foram realizadas varreduras na região de 200 a 550 nm para o padrão enzimático, amostra de trabalho, matriz sem analito e branco do ensaio, de acordo com as Figuras 3, 4, 5 e 6 respectivamente.

Figura 4 – Espectro de absorção na região do UV-Vis referente à amostra de trabalho 3M

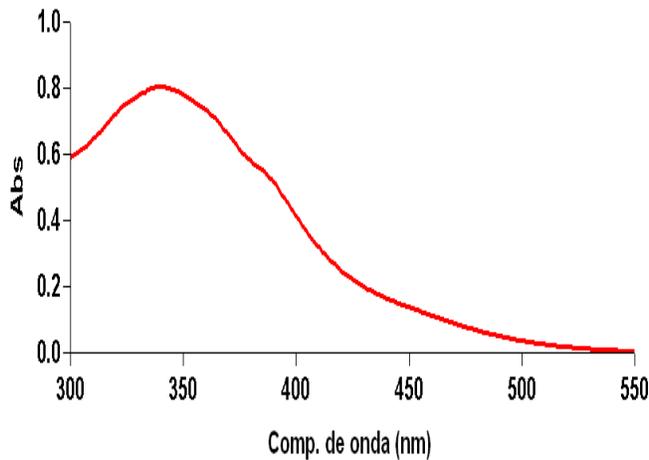


Figura 5 – Espectro de absorção na região do UV-Vis referente à matriz sem analito da 3M

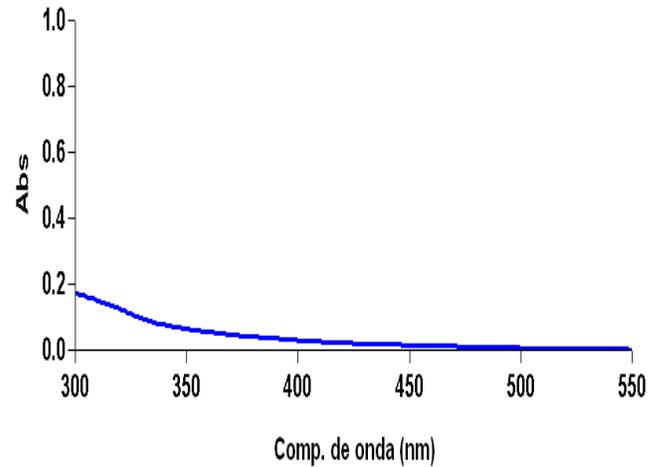
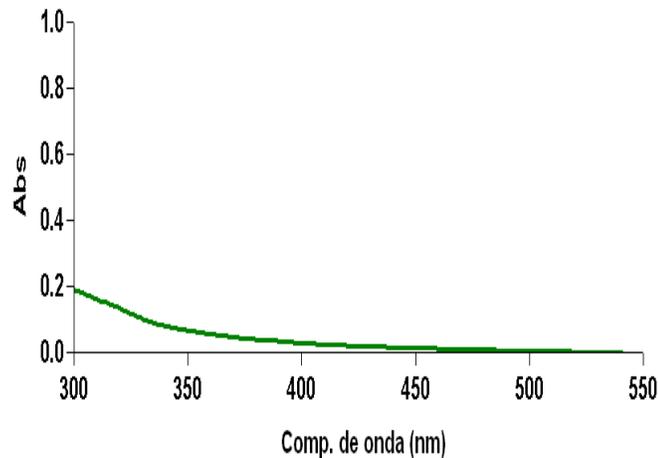


Figura 6 – Espectro de absorção na região do UV-Vis referente ao branco do ensaio



Os espectros de absorção das soluções padrão e amostra foram idênticos, apresentando um pico máximo de absorção em 340 nm e os espectros de absorção da matriz sem o analito e do branco do ensaio não apresentaram nenhum pico de absorção. Em 340 nm a absorbância da matriz foi 0,082 e do branco foi 0,091. Com isso, pode-se confirmar que neste comprimento de onda é possível quantificar especificamente a atividade proteolítica.

4.2.2 Faixa linear de trabalho

A demonstração da especificidade do método possibilitou a determinação de sua faixa linear. Este parâmetro foi determinado através da análise de soluções padrão em

níveis de concentração próximos ao valor esperado nas amostras. Atualmente, os fabricantes das amostras de detergentes enzimáticos não declaram a atividade enzimática de seus produtos, inviabilizando assim, estabelecer limites para a faixa de trabalho. Na maioria dos espectrofotômetros UV-VIS de duplo feixe, uma faixa de absorvância entre 0,1 e 1 Abs, apresenta medidas com boa precisão para linearidade (GALO; COLOMBO, 2009).

Neste sentido, foi construída uma curva de Ringbom com o objetivo de determinar o intervalo de concentrações adequado para a curva analítica com o menor erro por leitura, obedecendo a Lei de Lambert – Beer. A curva de Ringbom é representada pela construção de um gráfico de Absorvância versus logaritmo da concentração. Para a maioria dos sistemas a curva de Ringbom corresponde a uma curva de comportamento sigmoide, que apresenta uma faixa linear entre absorvância e concentração (RINGBOM, 1939; TSUNENOBU; MASAYUKI, 1958). Os dados para a construção da curva de Ringbom estão reunidos na Tabela 11.

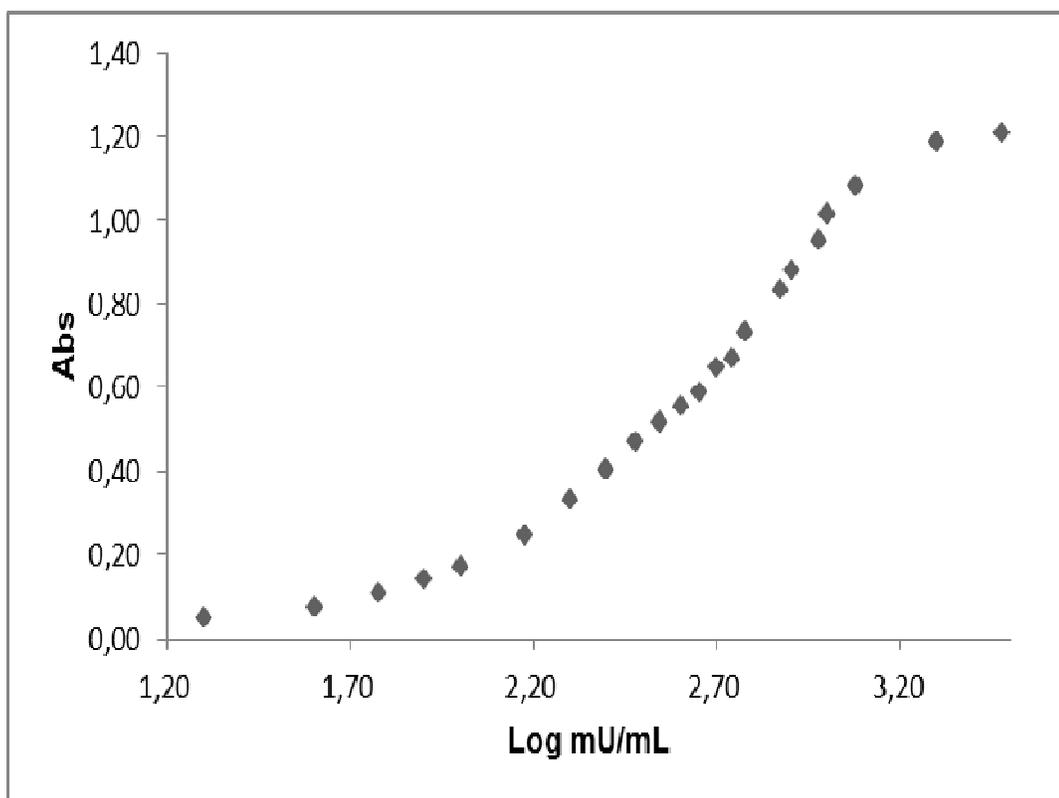
Tabela 11 – Obtenção da curva de Ringbom para determinação da faixa linear

Pontos	Atividade (mU/mL)	Log da atividade	Abs
1	20	1,30	0,0479
2	40	1,60	0,0751
3	60	1,78	0,1071
4	80	1,90	0,1415
5	100	2,00	0,1717
6	150	2,18	0,2490
7	200	2,30	0,3323
8	250	2,40	0,4019
9	300	2,48	0,4698
10	350	2,54	0,5184
11	400	2,60	0,5544
12	450	2,65	0,5883
13	500	2,70	0,6480
14	550	2,74	0,6677
15	600	2,78	0,7331

Tabela 11 – Obtenção da curva de Ringbom para determinação da faixa linear

Pontos	Atividade (mU/mL)	Log da atividade	Abs
16	750	2,88	0,8352
17	800	2,90	0,8789
18	950	2,98	0,9535
19	1000	3,00	1,0127
20	1200	3,08	1,0823
21	2000	3,30	1,1888
22	3000	3,48	1,1988

A curva de Ringbom foi expressa como o logaritmo da atividade (U/mL) expresso como Log da atividade x Abs, como representada na Figura 7.

Figura 7 – Curva de Ringbom obtida para determinação da faixa linear de trabalho

Observou-se o traçado sigmóide característico da curva de Ringbom e a faixa de atividade de 0,15 a 0,45 U/mL pode ser considerada linear para esta curva, sendo utilizada na construção da curva analítica de atividade proteolítica para a avaliação da linearidade. Esses valores foram maiores que os descritos por Bendicho (2002), onde a faixa linear ficou entre 0 e 0,05 U/mL. Vale a pena destacar que este autor não especificou a metodologia utilizada para a determinação da faixa linear.

4.2.3 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 absorbâncias e os coeficientes de variação (cv) dos sete pontos da curva analítica são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Absorbâncias das soluções estoques de protease após leitura em 340 nm

	Solução estoque 1		Solução estoque 2		Solução estoque 3		
	U/mL	Abs	U/mL	Abs	U/mL	Abs	cv %
Nível 1	0,15	0,2327	0,15	0,2294	0,15	0,2311	0,71
Nível 2	0,20	0,2999	0,20	0,3078	0,20	0,3156	2,55
Nível 3	0,25	0,3442	0,25	0,3630	0,25	0,3818	5,18
Nível 4	0,30	0,4243	0,30	0,4354	0,30	0,4464	2,54
Nível 5	0,35	0,5112	0,35	0,5119	0,35	0,5126	0,14
Nível 6	0,40	0,5474	0,40	0,5630	0,40	0,5786	2,77
Nível 7	0,45	0,6129	0,45	0,6122	0,45	0,6191	0,62

Os resultados encontrados para avaliação da linearidade estão demonstrados nas Figuras 8, 9 e 10.

Figura 8 – Gráfico da 1ª curva analítica da protease nas concentrações 0,15 a 0,45 U/mL

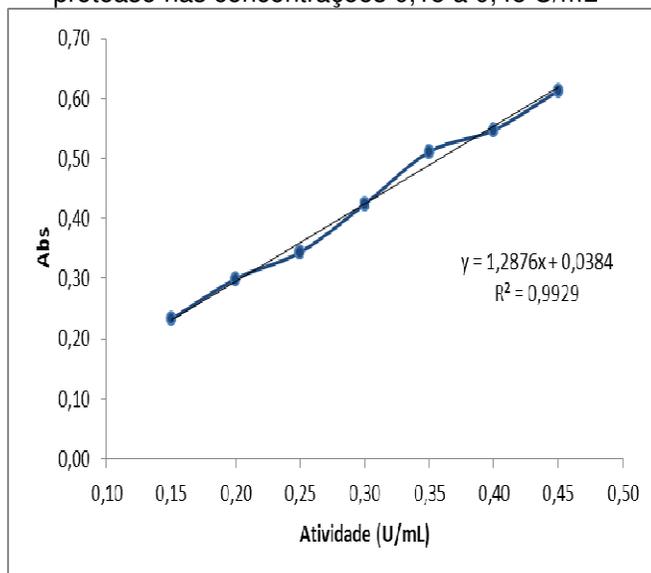


Figura 9 – Gráfico da 2ª curva analítica da protease nas concentrações 0,15 a 0,45 U/mL

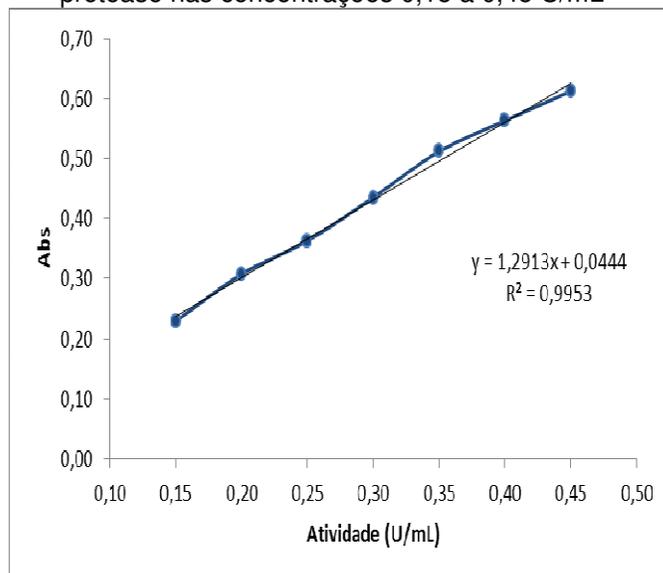
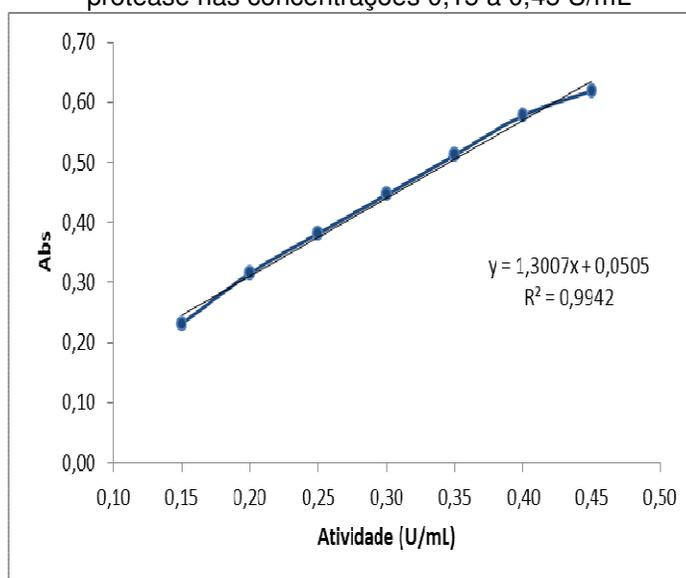


Figura 10 – Gráfico da 3ª curva analítica da protease nas concentrações 0,15 a 0,45 U/mL



Os coeficientes de correlação (r^2) variaram de 0,9929 a 0,9953, sendo todos eles superiores ao usualmente requerido e proposto pela RDC N° 899 de 29 de maio de 2003, onde são preconizados como satisfatórios os coeficientes de correlação acima de 0,98.

A linearidade da curva analítica para atividade proteolítica 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 (BAZILIO et al, 2012). 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 $> 0,05$). O ANEXO G mostra resumidamente as premissas para a curva analítica de atividade proteolítica.

Na linearidade avaliada por Bendicho (2002) os pontos da curva foram 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 U/mL e sua confirmação foi realizada pela análise do coeficiente de correlação ($r^2 = 0,99$) e significância da regressão ($p < 0,001$). Nas condições acima usadas, não foi possível confirmar a linearidade através dos cálculos dos resíduos da regressão e dos ajustes ao modelo linear de acordo com as premissas da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica. Nessa faixa de valores o coeficiente de correlação ($r^2 = 0,93$) apresentou-se abaixo do valor recomendado pela Anvisa, a independência dos resíduos da regressão não foi demonstrado pelo teste de Durbin-Watson e houve desvio de linearidade ($p < 0,05$).

4.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método em estudo são respectivamente 0,0247 U/mL e 0,0729 U/mL, conforme mostrado na ANEXO G. Esses valores são diferentes dos descritos por Bendicho (0,0032 U/mL e 0,0297/U/mL). Os valores mais baixos de LQ e LD são provavelmente uma consequência da faixa linear ter sido estabelecida em valores menores.

4.2.5 Exatidão / recuperação analítica

Na avaliação da recuperação analítica do método as absorbâncias correspondentes a cada nível são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados obtidos nos diferentes níveis de atividade de protease

Níveis	U/mL	Abs	cv (%)	Recuperação (%)
Nível 1	0,075	0,1041	2,37	---
		0,1022		---
		0,0993		---
Nível 2	0,15	0,2192	2,61	104,3
		0,2106		96,7
		0,2088		95,1
Nível 3	0,30	0,4351	2,41	98,7
		0,4506		103,3
		0,4304		97,3
Nível 4	0,45	0,6755	2,82	102,0
		0,6467		96,9
		0,6411		95,9

Foi verificado que a recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão de protease ficou entre os limites estabelecidos de 95% a 105%, para o nível de concentração de analito do estudo (HORWITZ, 1995; CODEX, 2011). Ao nosso conhecimento não há material de referência certificado para protease, logo entende-se que o método não seja considerado exato, embora não haja indicativo de falta de exatidão (SOUZA, 2007).

Os valores encontrados para a recuperação nesse estudo (95,1 a 104,3%) são semelhantes aos descritos por Bendicho (2002), entre 99 a 104%, embora tenha sido usado o teste t-student como tratamento estatístico. O material de referência usado foi a protease de *B. subtilis* (Sigma), com atividade de 728 U/mL.

4.2.6 Precisão

4.2.6.1 Repetitividade

Os resultados das dosagens de atividade proteolítica efetuadas pelo analista envolvido no processo de validação estão indicados na Tabela 14.

Tabela 14: Repetitividade do método para protease, dosagens executadas pelo primeiro analista (espectrofotômetro Cary Varian)

Replicatas (U/mL)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,2991	0,3055	0,2947	0,3055	0,2990	0,3057	0,3091	0,3129	0,2993	0,3049
Média: 0,3036 U/mL $CV_{repe}(\%)$: 1,81 $HorRat_{repe}$: 0,18									
HorHat _{repe} ≤ 2%									

O valor de $HorRat_{repe}$ encontrado comprova a repetitividade do método.

Na avaliação da precisão do estudo de Bendicho (2002) foi realizada apenas a repetitividade, com valor de desvio padrão relativo comparado com o DPR de Horwitz. O valor de DPR_r (7,99) permaneceu menor do que o DPR de Horwitz (9,90), mas não foi considerado o valor de $HorRat_{repe}$.

4.2.6.2 Precisão intermediária

Os resultados das dosagens de atividade proteolítica efetuadas pelos dois analistas são apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Dosagens das atividades proteolíticas executadas pelo segundo analista (espectrofotômetro Hitachi)

Replicatas (U/mL)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,2893	0,2793	0,2973	0,2880	0,3000	0,2913	0,2947	0,2827	0,2907	0,3080
Média: 0,2921 U/mL									

Tabela 16: Dosagens das atividades proteolíticas executadas pelos dois analistas

Replicatas (U/mL)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,2991	0,3055	0,2947	0,3055	0,2990	0,3057	0,3091	0,3129	0,2993	0,3049
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0,2893	0,2793	0,2973	0,2880	0,3000	0,2913	0,2947	0,2827	0,2907	0,3080
Média: 0,2979 U/mL									

O resultado da precisão intermediária das análises realizadas na amostra de trabalho, pelos dois analistas, está indicado na Tabela 17.

Tabela 17: Precisão intermediária do método para protease, análises executadas pelos dois analistas (espectrofotômetros e dias diferentes)

Primeiro Analista $(Y_1 - MdY_1)^2$	Segundo Analista $(Y_2 - MdY_2)^2$
2,04.10 ⁻⁵	7,84.10 ⁻⁶
3,82.10 ⁻⁶	1,64.10 ⁻⁴
7,83.10 ⁻⁵	2,70.10 ⁻⁵
3,82.10 ⁻⁶	1,71.10 ⁻⁵
2,10.10 ⁻⁵	6,19.10 ⁻⁵
4,35.10 ⁻⁶	6,40.10 ⁻⁷
3,08.10 ⁻⁵	6,42.10 ⁻⁶
8,75.10 ⁻⁵	8,96.10 ⁻⁵
1,86.10 ⁻⁵	2,15.10 ⁻⁶
1,83.10 ⁻⁶	2,52.10 ⁻⁴
<i>S_i: 0,007</i>	
<i>CV_{precint}(%): 2,37</i>	
<i>HorRat_{precint}: 0,35</i>	

S_i : desvio padrão de precisão intermediária (t = 2; n = 10)
 $HorRat_{precint} \leq 2\%$

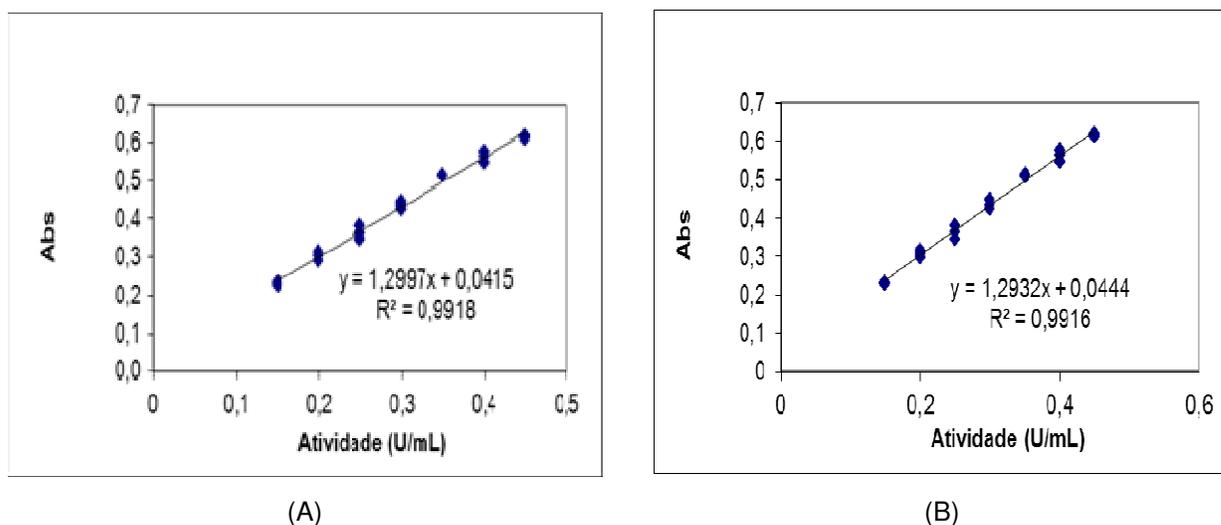
O valor de $HorRat_{precint}$ encontrado comprova a precisão intermediária do método.

4.2.7 Seletividade / efeito matriz

Na avaliação do efeito matriz, a linearidade da curva de adição do analito foi confirmada (ANEXO H). Foram calculados os resíduos da regressão e ajustes ao modelo linear de acordo com as premissas da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica (BAZILIO et al, 2012). 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 que 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 permitem concluir que a significância da regressão foi alta ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$). No ANEXO I estão reunidos os cálculos para as comparações das inclinações e interseções das duas curvas. A comparação gráfica entre as curvas está representada na Figura 11.

Figura 11: Comparação gráfica entre as curvas de adição do analito (A) e a curva analítica do método (B)



Os dados obtidos na Tabela 18 indicam que não ocorreu efeito da matriz, evidenciado pelas comparações das inclinações e interseções para as duas curvas ($t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$).

Tabela 18: Teste t para a comparação das curvas de adição do analito e da curva analítica

<i>Equação da curva analítica</i>	$y = 1,2932x + 0,0444$
<i>Equação da curva de adição do analito</i>	$y = 1,2997x + 0,0415$
<i>t calc. entre as curvas</i>	0,1731
<i>t tab</i>	2,02

O material enzimático de referência foi a protease de *B. subtilis*, a mesma enzima presente na formulação da amostra de trabalho. Neste estudo o efeito matriz se restringiu apenas a uma matriz testada, o que não garante os mesmos resultados para todas as possíveis matrizes de detergentes enzimáticos que contenham protease, uma vez que, a maioria dos produtos saneantes apresentam matrizes complexas podendo causar possíveis interferências no método de ensaio.

4.2.8 Robustez

Na determinação da robustez, as variações do método foram comparadas e os resultados são mostrados nas Tabelas 19, 20 e 21.

Tabela 19: Teste t para a comparação das variações do parâmetro 1 (pH da solução tampão)

Atividade proteolítica (U/mL) na diluição de uso					
Replicatas	Condição normal	1° variação (pH 7,9)	d	2° variação (pH 8,1)	d
1	0,3069	0,2915	-0,0154	0,3093	0,0024
2	0,3014	0,3022	0,0008	0,3061	0,0047
3	0,3108	0,3079	-0,0029	0,3097	-0,0011
4	0,2920	0,2909	-0,0011	0,3132	0,0212
5	0,2829	0,2948	0,0119	0,3190	0,0361
6	0,3035	0,2911	-0,0123	0,3154	0,0119
Média	0,2996	0,2964	-0,0032	0,3121	0,0126
s²	0,0001	4,98.10 ⁻⁵	9,64.10 ⁻⁵	2,17.10 ⁻⁵	1,96.10 ⁻⁴
		F_{calc.}: 2,15		F_{calc.}: 4,93	
		F_{tab.}: 5,05		F_{tab.}: 5,05	
		t_{calc.}: 0,79		t_{calc.}: 2,20	
		t_{tab.}: 2,57		t_{tab.}: 2,57	

s²: variância

d: diferença das replicatas

Tabela 20: Teste t para a comparação das variações do parâmetro 2 (temperatura)

Atividade proteolítica (U/mL) na diluição de uso					
Replicatas	Condição normal	1° variação (39°C)	d	2° variação (41°C)	d
1	0,3069	0,3013	-0,0057	0,3125	0,0055
2	0,3014	0,2905	-0,0109	0,3163	0,0149
3	0,3108	0,2939	-0,0169	0,2987	-0,0121
4	0,2920	0,2901	-0,0019	0,3148	0,0228
5	0,2829	0,2887	0,0058	0,2993	0,0164
6	0,3035	0,3069	0,0034	0,3143	0,0109
Média	0,2996	0,2952	-0,0044	0,3093	0,0097
s²	0,0001	5,30.10 ⁻⁵	7,42.10 ⁻⁵	6,56.10 ⁻⁵	1,48.10 ⁻⁴
		F_{calc.}: 2,02		F_{calc.}: 1,63	
		F_{tab.}: 5,05		F_{tab.}: 5,05	
		t_{calc.}: 1,24		t_{calc.}: 1,96	
		t_{tab.}: 2,57		t_{tab.}: 2,57	

s²: variância

d: diferença das replicatas

Tabela 21: Teste t para a comparação das variações do parâmetro 3 (Fabricantes diferentes)

Atividade proteolítica (U/mL) na diluição de uso					
Replicatas	Condição normal	1° variação (Sigma®)	d	2° variação (Vetec)	d
1	0,3069	0,3005	-0,0064	0,2952	-0,0117
2	0,3014	0,3108	0,0094	0,2965	-0,0049
3	0,3108	0,3075	-0,0033	0,3059	-0,0049
4	0,2920	0,2963	0,0043	0,3138	0,0218
5	0,2829	0,3044	0,0215	0,2950	0,0121
6	0,3035	0,2857	-0,0177	0,2973	-0,0061
Média	0,2996	0,3009	0,0013	0,3006	0,0010
s²	0,0001	8,11.10 ⁻⁵	1,85.10 ⁻⁴	5,80.10 ⁻⁵	1,68.10 ⁻⁴
		F_{calc.}: 1,32			F_{calc.}: 1,84
		F_{tab.}: 5,05			F_{tab.}: 5,05
		t_{calc.}: 0,24			t_{calc.}: 0,20
		t_{tab.}: 2,57			t_{tab.}: 2,57

s²: variância

d: diferença das replicatas

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

4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS

4.3.1 Determinação do pH das amostras

Uma protease para ser utilizada em detergentes deve ter duas características: ser estável e ter atividade em pH alcalino (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). Por esse motivo a primeira avaliação realizada foi a medida de pH na diluição de uso e na forma íntegra das dez amostras estudadas. Os valores encontram-se reunidos na Tabela 22.

Tabela 22: Valores de pH no produto íntegro e na diluição de uso das amostras de detergentes enzimáticos

AMOSTRAS										
pH	AM 1	AM 2	AM 3	AM 4	AM 5	AM 6	AM 7	AM 8	AM 9*	AM 10
Íntegro	8,42	9,64	7,20	6,12	8,24	7,25	6,34	6,07	7,91	7,59
Diluição de uso	8,93	8,66	6,60	5,74	7,29	6,51	5,98	5,68	---	8,88

*Na amostra AM 9 é recomendada a aplicação direta do produto

Observou-se que 30% dos produtos íntegros e em 55% das amostras na diluição de uso apresentaram pH ácido. Em 78% das amostras foi observado que os valores de pH diminuíram com a diluição. As amostras AM 3 e AM 6 quando diluídas, tiveram seus valores deslocados para a faixa ácida de pH. Entretanto, as amostras AM 1 e AM 10 quando diluídas, aumentaram os valores de pH.

O valor de referência da CP N° 27 em relação ao pH é de 6,0 a 8,0 para produto puro (íntegro). Foi verificado que 30% das amostras estariam fora da especificação dessa CP. Entretanto, atualmente os detergentes enzimáticos são notificados de acordo com a RDC N° 59 de 17 de dezembro de 2010 (BRASIL, 2010) e estão satisfatórios em relação ao pH, considerando a faixa de 2,0 a 11,5 como referência. Hoje, é importante ressaltar que produtos apresentando pH fora desta faixa devem ser registrados.

4.3.2 Atividades proteolíticas nas amostras de detergentes enzimáticos

Em todas as amostras fornecidas pelos fabricantes foram determinadas as atividades proteolíticas na diluição de uso recomendada e em apenas um caso, no produto íntegro. Os resultados destas atividades estão reunidos na Tabela 23.

Tabela 23: Atividades proteolíticas determinadas nas amostras de detergentes enzimáticos

Amostras*	Atividade proteolítica na diluição de uso (U/mL)	Atividade proteolítica no produto íntegro (U/mL)
AM 1	0,4629	---
AM 2	< LD	---
AM 3	< LQ	---
AM 4	0,0862	---
AM 5	< LD	---
AM 6	0,1821	---
AM 7	0,0964	---
AM 8	< LQ	---
AM 9**	---	0,5273
AM 10	0,3010	---

*As identificações das amostras foram preservadas

**Na amostra AM 9 é recomendada a aplicação direta do produto

< LD: abaixo do limite de detecção do método

< LQ: abaixo do limite de quantificação do método

Observou-se que 50% das amostras apresentaram atividade proteolítica abaixo dos limites de detecção e/ou quantificação do método. Um dos motivos desta baixa atividade está relacionado aos valores de pH na diluição de uso, que se apresentou ácido nas amostras com menor atividade. Este fato pode ser considerado avaliando os resultados das atividades proteolíticas destas amostras utilizando uma diluição de uso com tampão tris-HCl (Tabela 24).

Tabela 24: Atividades proteolíticas determinadas nas amostras diluídas em tampão

Amostras	AM 2	AM 3	AM 5	AM 8
Atividade proteolítica na diluição de uso (U/mL)	0,0806	0,0972	< LD	0,1184

< LD: abaixo do limite de detecção do método

Mesmo quando diluídas em tampão, com exceção da amostra AM 8, as demais amostras mostraram uma atividade pequena. Verificou-se que apenas na amostra AM 5 não houve aumento da atividade proteolítica capaz de permanecer acima do LQ. Portanto, a ausência de atividade nesta amostra está associada a outro fator, diferente do pH. Provavelmente fatores associados à formulação que podem estabilizar ou diminuir a atividade proteolítica estão envolvidos. Das amostras analisadas, 60% não apresentam estabilizantes em suas formulações. Ghafoor (2009) em seu estudo mostrou que detergentes enzimáticos que possuem tetraborato de sódio em sua formulação apresentaram maior atividade proteolítica, componente este presente em algumas das amostras mais ativas. Outra informação importante sobre a formulação é que 80% das amostras contêm corantes e essências em suas composições. Segundo a CP N° 27 é proibida a adição de componentes com a função de fragrâncias e/ou corantes aos produtos e a presença destes pode influenciar na atividade enzimática.

A amostra AM 9 recomenda a aplicação direta do produto nos instrumentais. Vale destacar que na dosagem do produto íntegro a concentração da matriz é diferente do que na diluição de uso e, portanto, há a necessidade de se realizar novos estudos de validação. A Abs do branco do ensaio desta amostra foi mais elevada, confirmando a necessidade de validação com esta matriz.

As amostras AM 1 e AM 10 apresentaram maior atividade proteolítica na diluição de uso. O motivo destas duas maiores atividades pode ser considerado pelo fato de apresentarem valores de pH na faixa alcalina.

4.3.3 Ensaio de desempenho de detergentes enzimáticos

O ensaio de desempenho é importante para verificar como as diferenças entre as atividades proteolíticas dos produtos influenciam na sua capacidade de remover sujidades. Todos estes produtos contêm tensoativos, que também ajudam na remoção dessas sujidades. Logo, este ensaio mostra como a sinergia entre a atividade enzimática e os tensoativos proporciona a limpeza.

Os resultados do ensaio de desempenho obtido pelo teste de triagem nas condições sugeridas na rotulagem e pela ASTM foram determinados qualitativamente por inspeção visual do simulador de sujidade TOSI® e são mostrados sob a forma de registros fotográficos, nas Figuras 12 a 21.

Figura 12: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 1

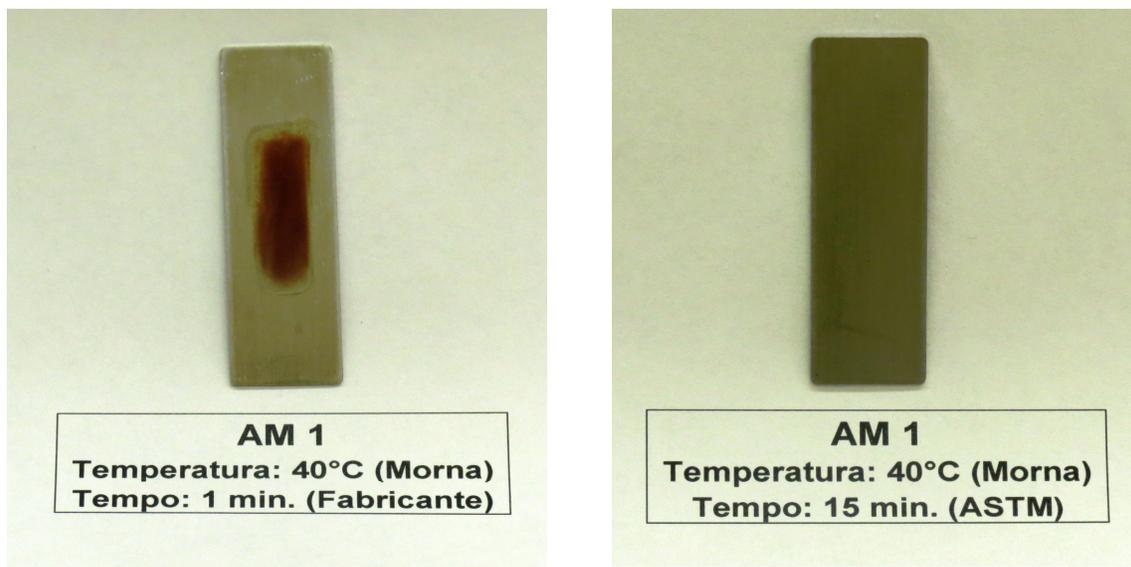


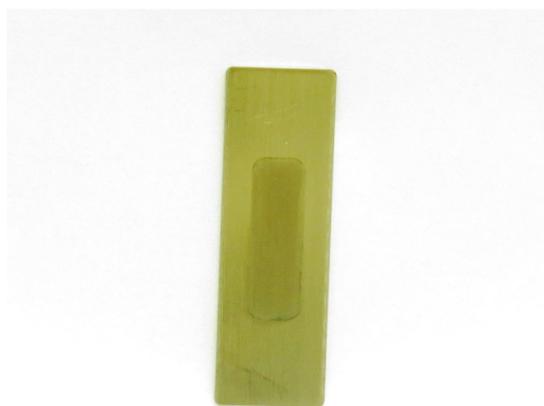
Figura 13: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 2



AM 2
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 5 min. (Fabricante)



AM 2
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 15 min. (ASTM)



AM 2
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 30 min. (ASTM)



AM 2
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 60 min. (ASTM)

Figura 14: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 3

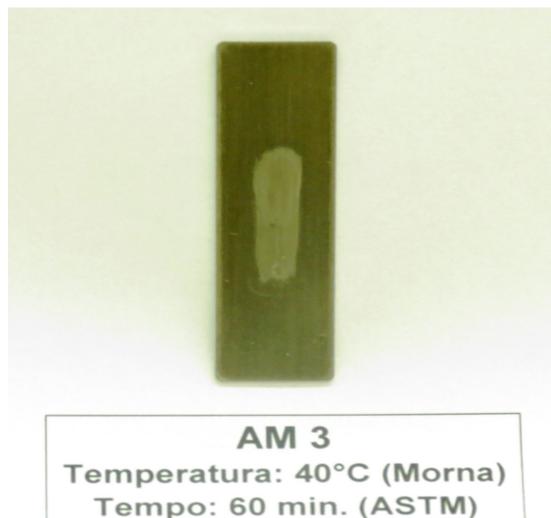
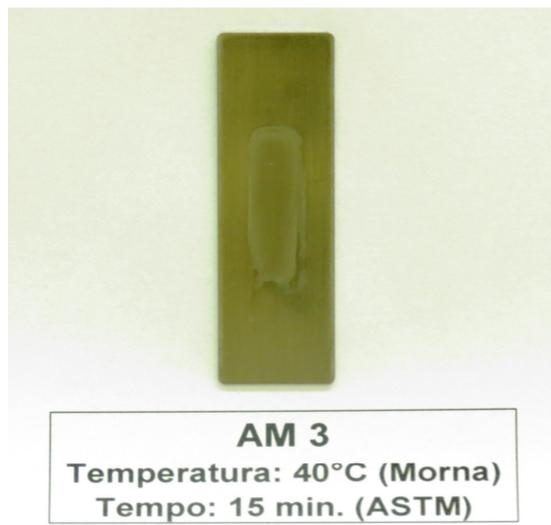
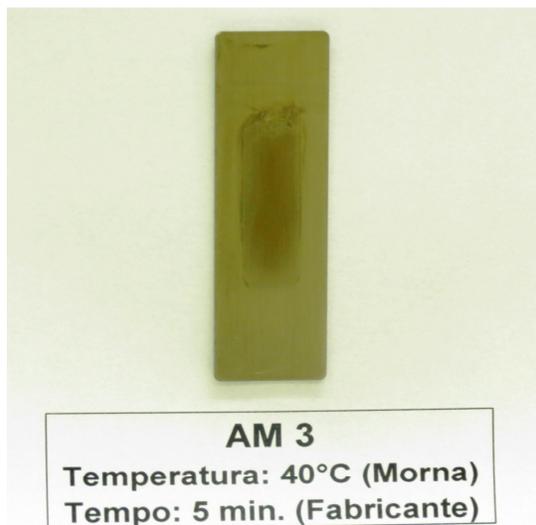


Figura 15: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 4

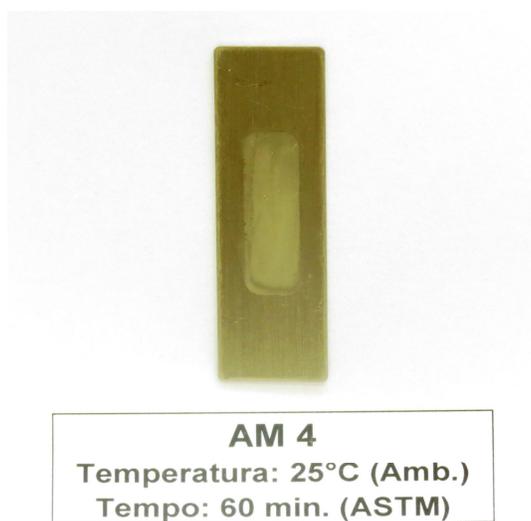
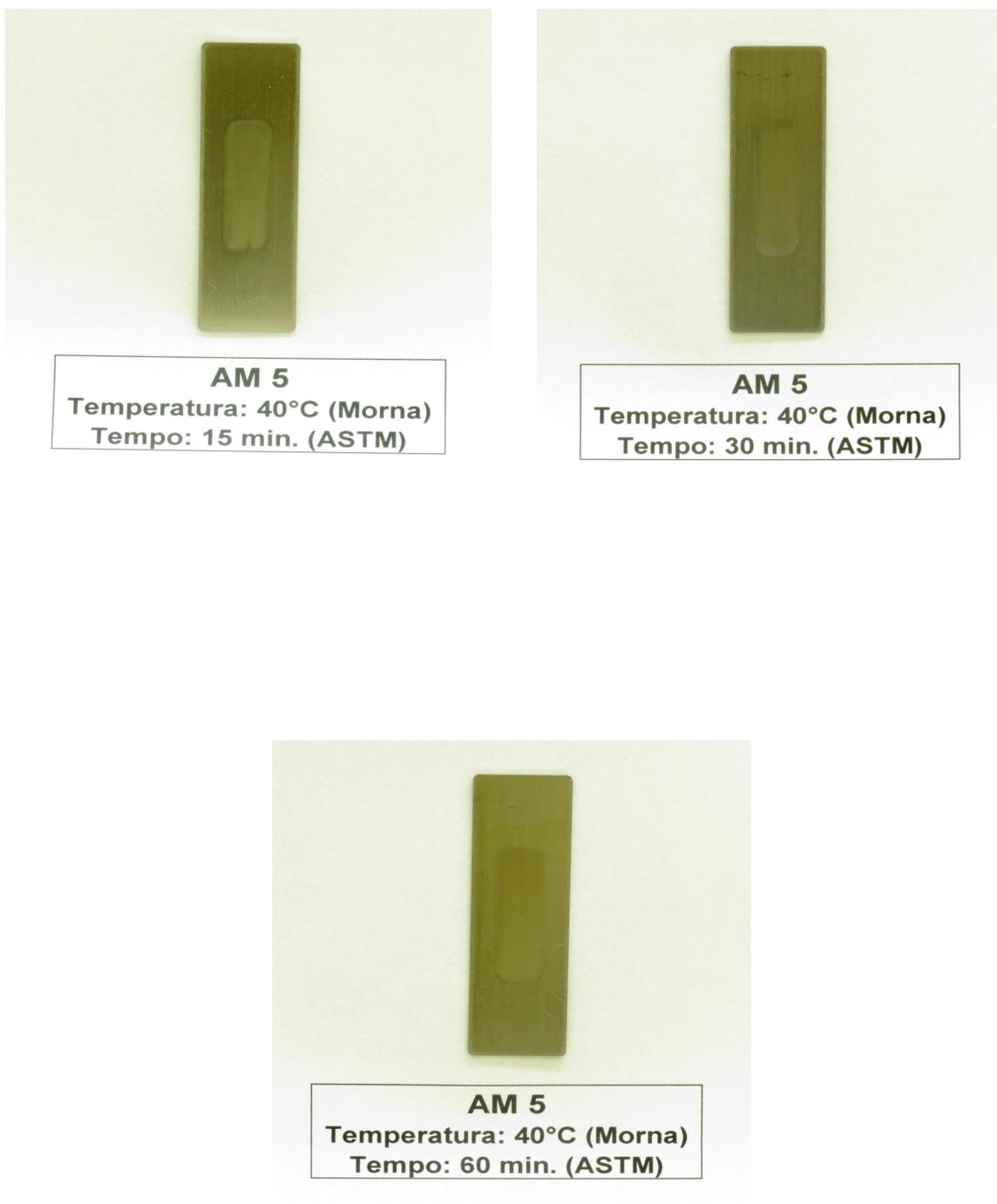


Figura 16: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 5



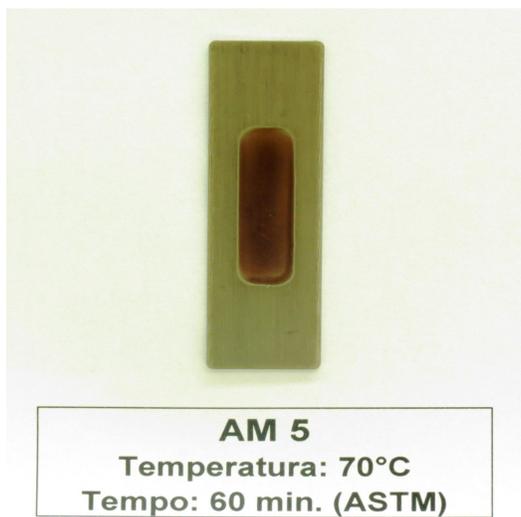
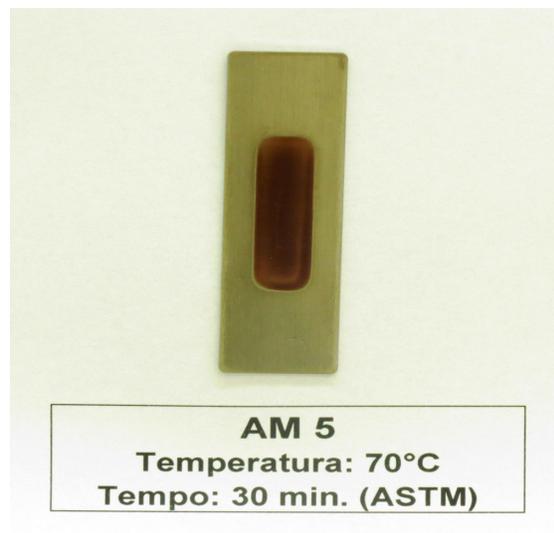
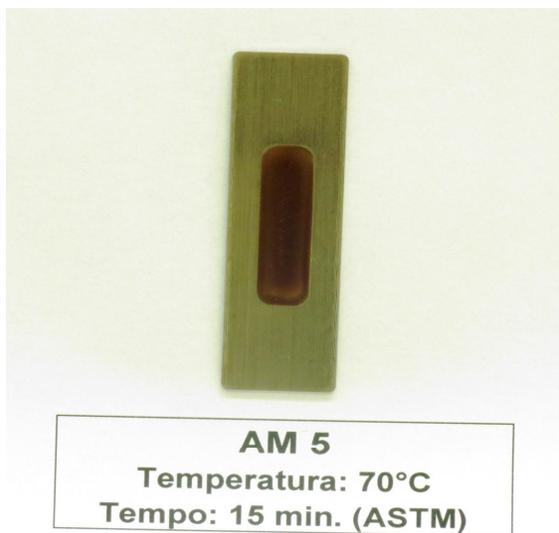
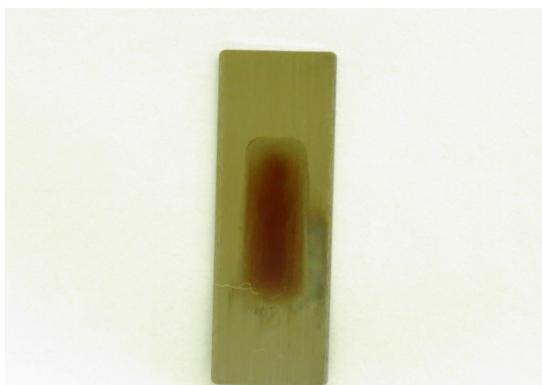
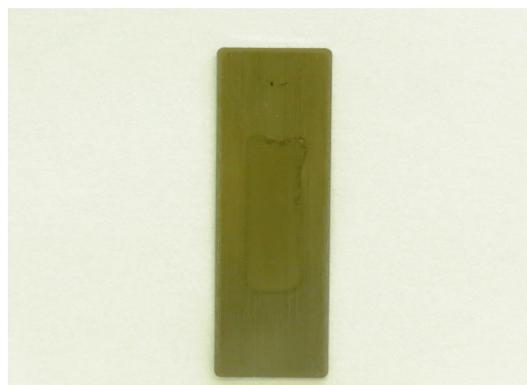


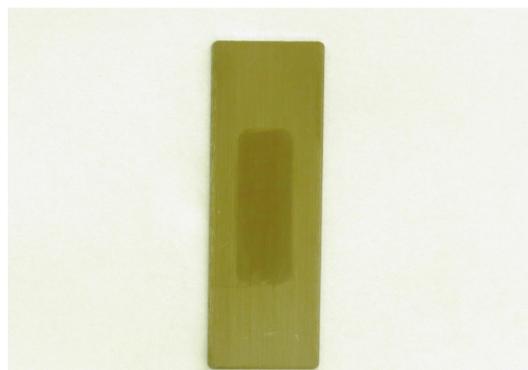
Figura 17: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 6



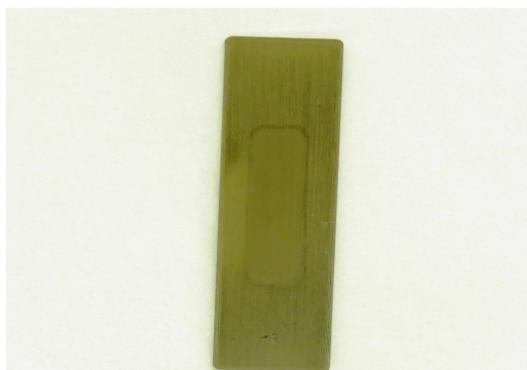
AM 6
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 5 min. (Fabricante)



AM 6
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 15 min. (ASTM)



AM 6
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 30 min. (ASTM)



AM 6
Temperatura: 25°C (Amb.)
Tempo: 60 min. (ASTM)

Figura 18: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 7

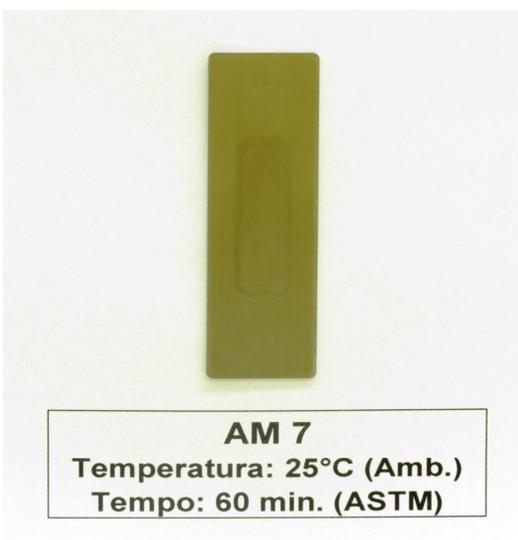
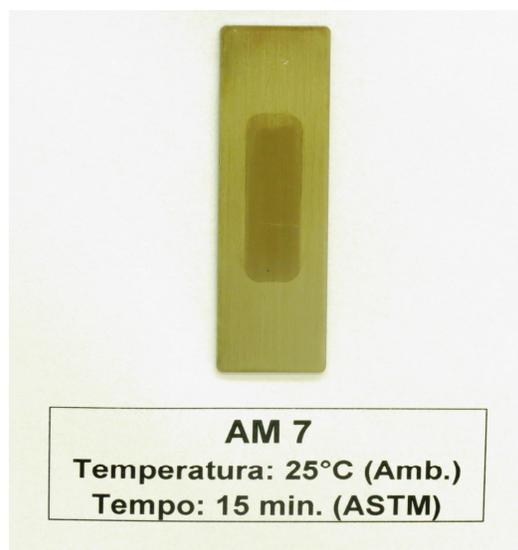
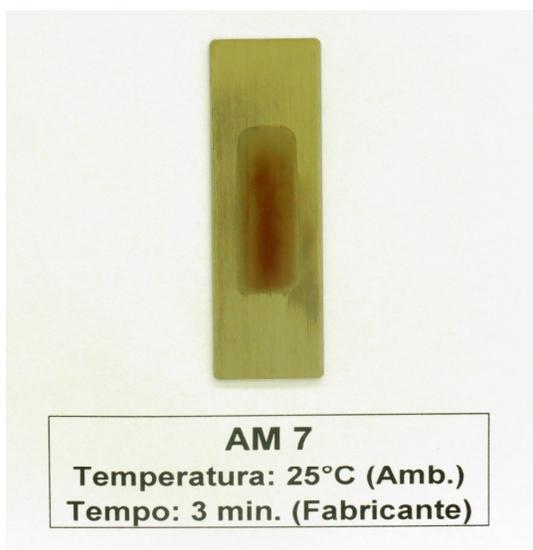


Figura 19: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 8

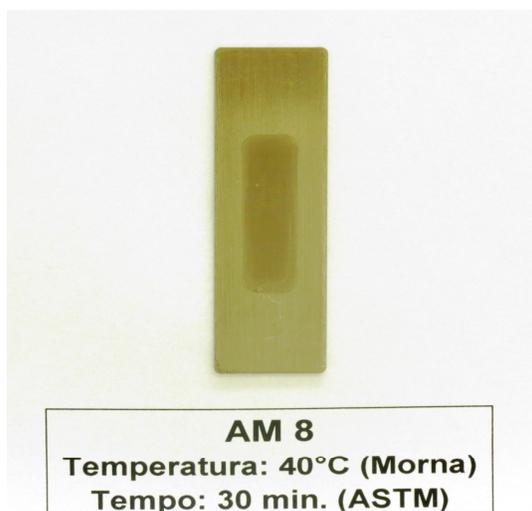
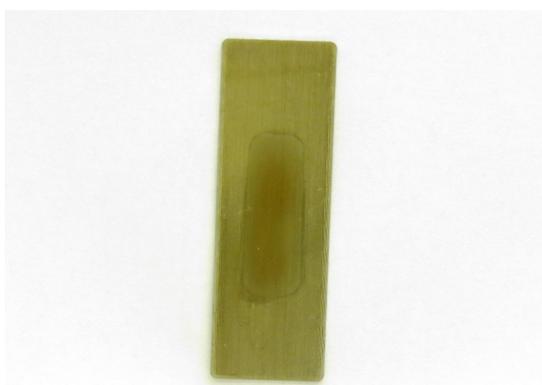


Figura 20: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 9



Figura 21: Resultados do teste de triagem para a amostra AM 10



AM 10
Temperatura: 40°C (Morna)
Tempo: 5 min. (Fabricante)



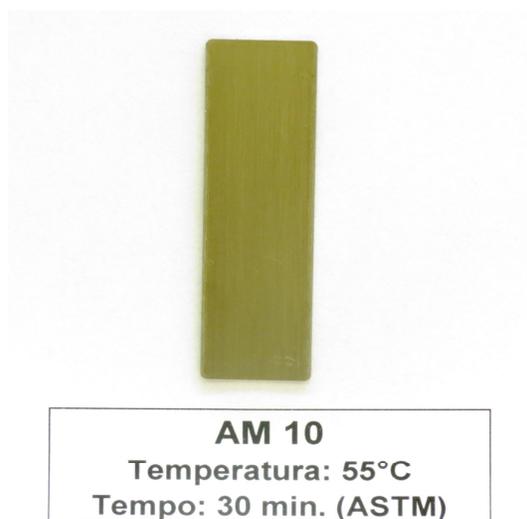
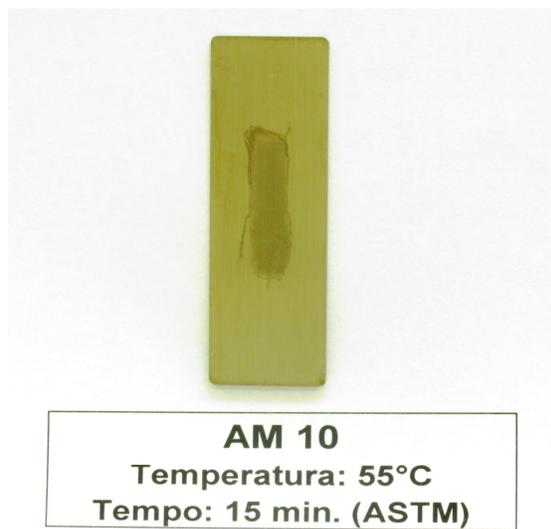
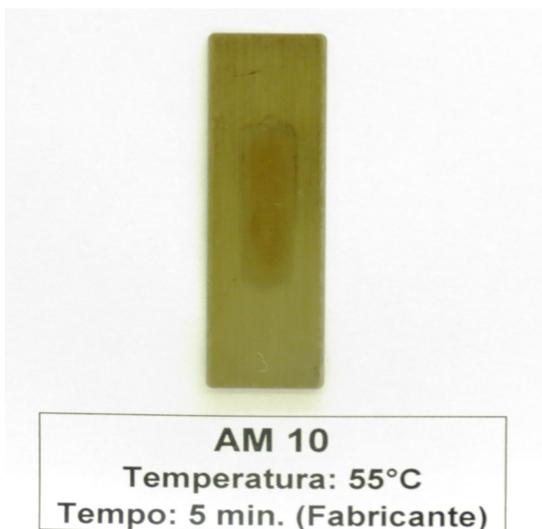
AM 10
Temperatura: 40°C (Morna)
Tempo: 15 min. (ASTM)



AM 10
Temperatura: 40°C (Morna)
Tempo: 30 min. (ASTM)



AM 10
Temperatura: 40°C (Morna)
Tempo: 60 min. (ASTM)



Para cada amostra foi atribuído um dos seis níveis de classificação de eficiência de limpeza segundo o ANEXO E. As interpretações estão reunidas na Tabela 25.

Tabela 25: Classificações das amostras pelo teste de triagem utilizando o ANEXO E

Amostras	Condições	Níveis de classificação			
		Tempo (min.)* Fabricante	15 min. (ASTM)	30 min. (ASTM)	60 min. (ASTM)
AM 1	Temperatura: 40 °C (Morna) Tempo: 1 min. (Fabricante)	5	0	0	0
AM 2	Temperatura: 25 °C (Amb.) Tempo: 5 min. (Fabricante)	4	2	2	2
AM 3	Temperatura: 40 °C (Morna) Tempo: 5 min. (Fabricante)	4	2	2	2
AM 4	Temperatura: 25 °C (Amb.) Tempo: 15 min. (Fabricante)	2	2	2	2
AM 5	Temperatura: 40 °C (Morna) Tempo: 15 min. (Fabricante)	2	2	2	2
	Temperatura: 70 °C Tempo: 15 min. (Fabricante)	5	5	5	5
AM 6	Temperatura: 25 °C (Amb.) Tempo: 5 min. (Fabricante)	5	2	2	2
AM 7	Temperatura: 25 °C (Amb.) Tempo: 3 min. (Fabricante)	5	2	2	2
AM 8	Temperatura: 40 °C (Morna) Tempo: 5 min. (Fabricante)	2	2	2	2
AM 9	Temperatura: 25 °C (Amb.) Tempo: 15 min. (Fabricante)	2	2	0	0
AM 10	Temperatura: 40 °C (Morna) Tempo: 5 min. (Fabricante)	2	2	0	0
	Temperatura: 55 °C Tempo: 5 min. (Fabricante)	2	1	0	0

*Foi utilizado o maior tempo recomendado pelo fabricante.

Realizando o ensaio nas condições sugeridas por cada um dos fabricantes, nenhum produto alcançou o nível máximo de remoção de sujidade. Os melhores resultados ainda apresentaram bastante resíduos de fibrina na superfície da placa. Mesmo amostras com as maiores atividades proteolíticas na diluição de uso, como AM 1, AM 9 e AM 10 não conseguiram remover a sujidade completamente.

Alguns detergentes que não apresentaram atividade proteolítica (Tabela 23) conseguiram alcançar um certo nível de limpeza, sendo o caso mais importante a amostra AM 5, que conseguiu uma remoção completa da hemoglobina presente na

temperatura de 40°C. É importante destacar que o fabricante deste produto não informa um tempo de imersão. Foi usado o tempo mínimo da ASTM (15 min) para avaliação. Este tempo é maior que a recomendação dos demais fabricantes, o que pode ser uma vantagem para a atividade do detergente. Entretanto, este produto apresentou o pior nível de classificação de limpeza quando se trabalhou com a maior temperatura recomendada. Foi observado que a 70°C a solução do detergente sofreu mudança de aspecto (turvação), comprometendo sua eficácia. Este fato também foi observado por Joo (2005), que verificou uma temperatura ótima de 60 a 65°C para protease produzida por *Bacillus* sp. I-312, contudo esta perdeu rapidamente a atividade quando incubada a 70°C.

As temperaturas de imersão recomendadas pelos fabricantes podem ter influenciado esses resultados. Metade das amostras utiliza a temperatura ambiente, observando-se ineficácia na limpeza dos simuladores. Na amostra AM 10, a maior temperatura recomendada (55°C) proporcionou uma limpeza mais eficiente.

A deficiência de efeito nas condições de uso dos detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS já foi descrita na literatura. Amostras disponíveis no mercado australiano foram avaliadas por uma variação do método da azocaseína e frente a remoção de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (CHEETHAM; BERENTSVEIG, 2002), e pelo acompanhamento da degradação de albumina, hemoglobina e fibrinogênio por de eletroforese em gel de poli(acrilamida), com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) (CHEETHAM, 2005). Em ambos os casos foi verificado que muitos produtos enzimáticos não tiveram praticamente nenhuma atividade proteolítica, enquanto poucos testados foram eficazes.

De acordo com os resultados do teste de triagem da ASTM foi observado que apenas 30% das amostras apresentaram limpeza satisfatória dos simuladores de sujidade TOSI®. É notável que, mesmo após um tratamento prolongado de 60 minutos, 70% das amostras não apresentaram eficiência na limpeza, principalmente em relação à remoção de resíduos de fibrina.

Quando tratadas com o tempo de submersão de 15 minutos da ASTM e nas temperaturas recomendadas pelos fabricantes, notou-se que apenas a amostra AM 1 apresentou limpeza total do simulador de sujidade. Após 30 minutos, as amostras AM 9 e AM 10 também atingiram a limpeza total. No tempo de 60 minutos, a limpeza total dos

simuladores se restringiu a estas três amostras. Este fato está de acordo com os melhores resultados de atividade proteolítica encontrados nestas três amostras. O principal problema quanto a estas amostras é o tempo de imersão recomendado pelo fabricante, que deveria ser maior, principalmente na AM 1.

A remoção da proteína solúvel pelas demais amostras torna-se um grave problema. Uma inspeção visual rápida, por profissional com pouca experiência, poderia considerar o material limpo, devido à ausência de hemoglobina. A fibrina remanescente pode servir de substrato para o crescimento microbiano, comprometendo a eficácia de processos de desinfecção.

5 CONCLUSÃO

O método por espectrofotometria para a determinação da atividade proteolítica em detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS foi adaptado e validado. Demonstrou-se ser robusto, exato e preciso, apresentando resultados reprodutíveis e confiáveis em concordância com o estabelecido pelos órgãos reguladores (Anvisa e Inmetro), podendo ser empregado em laboratórios de controle da qualidade.

A comparação dos resultados com os valores descritos na literatura para um método similar evidenciou diferenças entre os valores alcançados em alguns parâmetros, possivelmente pelas variações experimentais como o pH de tamponamento, temperatura e o comprimento de onda usados. Desta forma, há a necessidade de estabelecimento de um protocolo padrão para o ensaio de atividade proteolítica a fim de possibilitar a comparação de resultados de diferentes produtores de detergentes enzimáticos.

A proposta de protocolo de ensaio do presente estudo pode ser considerada como uma sugestão de protocolo padrão, haja vista os resultados obtidos.

As atividades proteolíticas da maioria das amostras de detergentes enzimáticos não apresentaram resultados satisfatórios seguindo as recomendações dos fabricantes. Esse fato pode ter ocorrido em função do pH, que não é adequado para a atividade de subtilisinas. Também é possível que a formulação tenha influenciado na estabilidade da enzima, diminuindo sua atividade ou inativando-a.

Na avaliação de desempenho dos detergentes enzimáticos verificou-se que amostras com baixas atividades proteolíticas não apresentaram eficiência na limpeza de sujidades nas condições recomendadas pelos fabricantes e pela ASTM. Em amostras que apresentaram melhores atividades proteolíticas as condições de limpeza da ASTM mostraram-se mais eficientes do que as recomendadas nas rotulagens dos produtos. Desta forma, considerando que o ensaio de desempenho da ASTM foi de fácil aplicabilidade, sugere-se aos fabricantes a realização do ensaio de desempenho nas condições da ASTM para fins de registro.

Por fim, em virtude dos resultados obtidos no presente estudo, recomenda-se incorporar a Resolução Específica para detergentes enzimáticos:

(i) Mudança no valor de referência de pH para uma faixa de 7,0 a 9,0 na diluição de uso e não no produto puro, considerando que as amostras analisadas tiveram melhores resultados de atividade proteolítica em pH alcalino.

(ii) Informar na documentação de registro a origem microbiana da enzima empregada na formulação, bem como a atividade proteolítica na diluição de uso.

(iii) Recomendar à Anvisa a importância da exigência de análise prévia ao registro do produto, devido ao panorama atual e a característica crítica desse mercado.

Como a ocorrência de infecção adquirida após procedimento cirúrgico ou através de intervenção invasiva está sendo considerada epidemiologicamente como uma doença emergente, acredita-se que a publicação de uma Resolução Específica que contemple as observações deste estudo seja fundamental para a regularização destes produtos no mercado brasileiro, o que certamente trará impacto nos EAS.

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Elaborar um Procedimento Operacional Padrão (POP) do método validado visando à divulgação do conhecimento e utilização pelos laboratórios governamentais;
- ✓ Realizar curso de capacitação em análise de atividade proteolítica aos profissionais dos Lacens e de outras instituições públicas que atuem na área de controle da qualidade de saneantes;
- ✓ Fornecer à Anvisa os resultados deste estudo para subsidiar a publicação de Resolução Específica;
- ✓ Estruturar um ensaio de proficiência para a determinação da atividade proteolítica em detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS;
- ✓ Determinar a atividade proteolítica e realizar o ensaio de desempenho em um número maior de detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS;
- ✓ Publicar trabalhos científicos com os resultados alcançados;
- ✓ Estudar a estabilidade desses produtos.

REFERÊNCIAS

- ALFA, Michelle J.; JACKSON, Michele. A new hydrogen peroxide-based medical-device detergent with germicidal properties: comparison with enzymatic cleaners. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 29, n. 3, p.168 - 177, jun. 2001.
- ALFA, Michelle J.; NEMES, Radita. Inadequacy of manual cleaning for reprocessing single-use, triple-lumen sphinctertomes: simulated-use testing comparing manual with automated cleaning methods. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 31, n.4, p. 193 - 207, jun. 2003.
- ANWAR, Adil; SALEEMUDDIN, Mohammed. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 64, n. 3, p.175 - 183, jun. 1998.
- ANVISA discute registro de detergentes enzimáticos, 2009. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/260509.htm>>. Acesso em: 29 set. 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9000**: sistemas de gestão da qualidade - fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
- ASTM, Standard Guide for Blood Cleaning Efficiency of Detergents and Washer-Disinfectors. **American Standard Test Method ASTM D 7225 – 06**, p. 1 - 3, 2006.
- BANAT, P. I. M. Biosurfactants more than ever sought. **Biofutur**, v. 198, p. 44 - 47, 2000.
- BANERJEE, Uttam Chand; SANI, Rajesh Kumar. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n.1-2, p. 213 - 219, oct. 1999.
- BARRETT, Alan J. Classification of peptidases. In: **Methods in Enzymology** : proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. New York: Academic Press. 1994. v. 244, cap.01, p. 1 - 15.
- BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**, Rio de Janeiro, 2012. No prelo.
- BEG, Qasim Khalil; GUPTA, Rani. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n.2, p. 294 - 304, feb. 2003.

BENDICHO, S. et al. Determination of proteolytic activity in different milk systems. **Food Chemistry**, London, v. 79, n. 2, p. 245 - 249, nov. 2002.

BRASIL. Lei n° 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância a que ficam submetidos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos, correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1976.

_____. Decreto n° 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, DF, 1977.

_____. Lei n° 6437 de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1977.

_____. Lei n° 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.

_____. Resolução (RDC) n° 50, de 21 de fevereiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2002.

_____. Resolução (RE) n° 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.

_____. Portaria n° 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.

_____. Resolução (RDC) n° 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 N° 47/07. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008.

_____. Consulta Pública n° 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.

_____. Resolução (RDC) n° 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 República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010.

BRENNER, Sydney. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. **Nature**, London, v. 334, p. 528 - 530, aug. 1988.

CAHN, A.; LYNN JR., J. L. Surfactants and detergent systems. In: **Encyclopedia of chemical technology**. New York: John Wiley & Sons, 1983. v. 22, p. 332.

CARDOSO, Maria Helena Wohlers Morelli; NOBREGA, Armi W.; ABRANTES, Shirley. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates, **Analytica**, Rio de Janeiro, n. 34, p. 48 - 55, abr./maio 2008.

CHARNEY, Jesse; TOMARELLI, Rudolph M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 171, p. 501 - 505, 1947.

CHEETHAM, Norman W. H. Comparative efficacy of medical instrument cleaning products in digesting proteins. **Australian Infection Control**, Australia, v. 10, n. 3, p. 103 - 109, 2005.

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

CHRISTEN, G. L.; MARSHALL, R. T. Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 8, p. 1680 - 1687, aug. 1984.

COATES, Leighton et al. X-ray, neutron and NMR studies of the catalytic mechanism. **European Biophysics Journal**, New York, v. 35, n.7, p. 559 - 566, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Procedural manual**. 20. ed. Roma: FAO/WHO, 2011.

COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPÉIA. Directiva 2002/657/CE: desempenho de métodos analíticos e interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, 2002. p. L 221/8 – L 221/36.

DE SIMONE, Salvatore Giovanni; SILVA JUNIOR, Floriano Paes. Proteases como alvos de quimioterapia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 4, n. 22, p. 12 - 17, set./out. 2001.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods**: a laboratory guide to method validation and related topics. Sweden: Eurachem, 1998.

GALO, André Luiz; COLOMBO, Márcio Francisco. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 488 - 492, 2009.

GERMANO, Sandro et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246 - 251, feb. 2003.

GHAFOOR, Afia; HASNAIN, Shahida. Characteristics of an extracellular protease isolated from *Bacillus subtilis* AG-1 and its performance in relation to detergent components. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 559 - 563, 2009.

GODFREY, Tony. **Industrial Enzymology**. 2. ed. New York: Stockton Press, 1996.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 29, p. 45 - 72, jul. 1960.

HIBBS, M. S. et al. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 260, n. 4, p. 2493 - 2500, feb. 1985.

HORWITZ, William. Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 331 - 343, 1995.

HORWITZ, William; ALBERT, Richard. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 89, n. 4, p. 1095 - 1109, jul./aug. 2006.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Magazine**, p. 96 - 105, feb. 1998.

ICH. **Validation of analytical procedures**: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH/IFPMA, 2005.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rev. 3. Rio de Janeiro, 2010.

IUBMB. **Enzyme Nomenclature**: recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology. Academic Press: San Diego, 1992.

JOO, Han-Seung; CHANG, Chung-Soon. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 3-4, p. 1263 - 1270, mar. 2005.

KIRK, Ole; BORCHERT, Torben Vedel; FUGLSANG, Claus Crone. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 345 - 351, aug. 2002.

KUMAR, C. Ganesh; TAKAGI, Hiroshi. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 7, p. 564 - 594, dec. 1999.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Enzimas**. São Paulo: Ed. Sarvier, 2002, p. 189 - 199.

LEITE, F. **Validação em análise Química**. 5. ed. São Paulo: Átomo, 2008.

LOPEZ-OTIN, Carlos; OVERALL, Christopher H. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 509 - 519, 2002.

LUZ, Fabrício Ferreira. **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.

MAURER, Karl-Heinz. Detergents proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 4, p. 330 - 334, aug. 2004.

MITIDIERI, S. et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 26, p. 56 - 60, 2002.

MITIDIERI, 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.

MUKHERJEE, Ashis K.; ADHIKARI, Hemanta; RAI, Sudhir K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 39, n. 9, p. 353 - 361, apr. 2008.

NASCIMENTO, Wellingtona Cristina Almeida do; MARTINS, Meire Lelis Leal. Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 307 - 311, jul./sep. 2006.

NASRI, Moncef et al. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 3, p. 299 - 306, jul. 2008.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p.772 - 776, sep./oct. 2002.

OLSEN, Hans Sejr; FALHOLT, Per. The role of enzymes in modern detergency. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 1, n. 4, p. 555 – 567, oct. 1998.

PFEIFER, M. Vali. **Validação do “Test Object Surgical Instruments” TOSI®**: monitoramento da eficiência de limpeza de lavadoras termo-desinfectoras. [S.L.], [S.N], 2010. p. 7.

QUIMISA S/A. **Protocolo N° 035/09**: avaliação comparativa – desempenho de formulação detergente enzimático para limpeza de instrumentais hospitalares contendo liquanase 2,5L x savinase 16L. São Paulo, 2009.

RAWLINGS, Neil D.; BARRET, Alan J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, London, v. 290, p. 205 – 218, 1993.

RINGBOM, A. The accuracy of the colorimetric analysis methods. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 115, p. 332 - 343, 1939.

SANTOS, P. M.; PROVAZI, M.; SOUZA, G. B. Determinação de atividades de proteases em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. **Comunicado Técnico**, São Carlos, n° 62, 2005. 5 p.

SARATH, G.; ZEECE, M. G.; PENHEITER, A. R. Protease assay methods. In: BAYNON, R.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes**. New York: Ed. Oxford Press, 2001, cap. 3. p. 45 – 76.

SCHMIDT, Denise Rodrigues Costa; YONEKURA, Christiane Sayuri Ito; GIL, Rosineide Feres. Instrumento de avaliação para detergentes enzimáticos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 382 - 389, jun. 2008.

SHOWELL, Michael S. **Hand Book of Detergents**: part D: formulation. Boca Raton: CRC Press, 2006. 530p.

SIELECKI, A. R., et al. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 219, n. 4, p. 671, jun. 1991.

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.

SNEDECOR, S. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6. ed. Ames: Iowa State University Press, 1989.

SOUZA, Scheilla V. C.; JUNQUEIRA, Roberto G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 552, p. 25 - 35, 2005.

SOUZA, S. V. C. **Procedimentos para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 272 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

SOUZA, A. M. C. **Manual de normalização de trabalhos acadêmicos**. Rio de Janeiro: INCQS, 2011. 64p.

TOSI®-TROUBLESHOOTING guide: what to do in case of... PEREG. Disponível em: <<http://www.pereg.de/details/Plakat%20A3%20englisch.pdf>> Acesso em:

TSUNENOBU, Shigematsu; MASAYUKI, Tabushi. Some experiments in precision colorimetry. **Bulletin of the Institute for Chemical Research**, Kyoto, v. 36, p. 127 - 133, 1958.

VÉVODOVÁ, Jitka et al. Crystal Structure of an intracellular subtilisin reveals novel structural features unique to this subtilisin family. **Structure**, Philadelphia, v. 18, n. 6, p. 744 - 755, jun. 2010.

ANEXO A – COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DESCRITAS NOS RÓTULOS DAS AMOSTRAS DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS ENCAMINHADAS PELOS FABRICANTES POR SOLICITAÇÃO DA GG-SAN / ANVISA

Amostra	Composição	% de Protease
AM 1	Agentes de controle de pH, essência, diluente, tensoativo anfótero, sequestrante, estabilizante, corante, veículo, <i>PROTEASE</i> .	5,5
AM 2	Álcool isopropílico, detergente não iônico derivado dos polialquilfenoletoxilados, corante, fragrância, água, <i>AMILASES</i> , <i>LIPASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .	10
AM 3	Tensoativos não iônicos, estabilizantes de enzimas, conservante, sequestrantes, corante, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> .	0,0376
AM 4	Propionato de amônio (6,30%), Cloridrato de polihexametileno de biguanida (0,96%), lauril iminodipropionato de sódio, isotridecanol etoxilado, álcool, anticorrosivo, solventes, excipientes, quelante, regulador de pH, corante, fragrância, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> .	0,0408
AM 5	Alquil glucosídeo, quelante, estabilizadores de enzima, reguladores de pH, conservante, excipientes, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> .	0,0368
AM 6	Álcool isopropílico, detergente não iônico álcool etoxilado, corante, fragrância, água, <i>AMILASES</i> , <i>LIPASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .	15
AM 7	Álcool isopropílico, tensoativo álcool etoxilado, corante, fragrância, água, <i>AMILASES</i> , <i>LIPASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .	10
AM 8	Álcool isopropílico, detergente não iônico derivado dos polialquilfenoletoxilados, água, <i>AMILASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .	3
AM 9	Polimerização do óxido de propileno e óxido de etileno, nonil fenol etoxilado (9 moles), diluente, atenuador de espuma, corante, fragrância, água, <i>LIPASE</i> , <i>AMILASE</i> , <i>PROTEASE</i> .	1,8
AM 10	Tensoativos álcool alcoxilado e xileno sulfonato de sódio, estabilizantes, conservante, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> , <i>PEPTIDASE</i> , <i>CELULASE</i> .	9,8

*As amostras foram identificadas por números, para preservar a marcas dos fabricantes

ANEXO B – DESCRIÇÃO DA PLANILHA DE AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Esta planilha consiste em ferramenta para a verificação da linearidade de uma curva analítica. A avaliação é realizada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). E 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 e a relação entre X_i e Y_i é linear.

1) TRATAMENTO DE VALORES EXTREMOS

1.1) Teste de Jackknife

Os valores extremos são avaliados pelo método dos resíduos padronizados de Jackknife. O cálculo do resíduo padronizado Jackknife J emprega uma estimativa da variância dos resíduos da regressão independente do ponto sob suspeita. Apresenta valor diferenciado para cada ponto da curva de calibração e segue a distribuição de Student t . Apesar das excelentes características do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), este método tem o inconveniente de ser muito sensível à presença de pontos de influência como valores extremos (outliers) ou pontos de alavanca (leverages). Vale a pena destacar que podem ser removidos em percentual um máximo de 22,2% do número total de replicatas. Não podendo ser retirado todos os resultados de um mesmo nível e após cada remoção novos cálculos são realizados (INCQS, 2009, SOUZA, 2005).

2) TESTES DE PREMISSAS

2.1) Teste de Normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão é verificada pelo teste de Ryan-Joiner. Este teste submete a hipótese nula de que os resíduos seguem a distribuição normal (os desvios da normalidade não são significativos) contra a hipótese alternativa de que os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade (os desvios da normalidade são significativos). A estatística deste teste baseia-se no coeficiente de correlação do gráfico de probabilidade normal ou coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. A hipótese nula é rejeitada quando o coeficiente de correlação calculado é menor do que o valor crítico estabelecido ($R_{eq} > R_{crit}$) (INCQS, 2009; SOUZA, 2005).

2.2) Teste de Homocedasticidade

A homocedasticidade de resíduos da regressão é verificada através do teste de Levene (1960), modificado por Brown & Forsythe (1974). Confronta a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si (há homoscedasticidade) contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heterocedasticidade). A estatística deste teste baseia-se no F de Levene F_L , mas no caso específico de dois grupos, ou seja, para um grau de liberdade de tratamentos, em que $t = \sqrt{F}$, pode ser usada a estatística de t de Levene t_L . A hipótese nula é rejeitada quando a estatística t_L calculada for maior que o t crítico ($t_L < t$) (Manual da Qualidade – POP INCQS N° 65.3120.126; SOUZA, SOUZA, 2005).

2.3) Teste de Independência (Autocorrelação dos resíduos)

A autocorrelação de resíduos é verificada através do teste de Durbin-Watson. O teste confronta a hipótese nula de que não há autocorrelação entre os resíduos (os resíduos são independentes) com a hipótese alternativa de que há autocorrelação de resíduos (os resíduos não são independentes). A estatística deste teste baseia-se na estatística de Durbin-Watson d . Para cada conjunto de dados, há dois limites críticos d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Se o valor de d estiver entre os limites, o teste é

inconclusivo. Valores de $d < d_L$ indicam autocorrelação e rejeição da hipótese nula a um nível de significância de 2α , enquanto valores de $d > d_U$ indicam independência dos resíduos e não rejeição da hipótese nula (INCQS, 2009; SOUZA, 2005).

2.4) Teste da significância da regressão e do desvio da linearidade

Para realizar o teste da significância da regressão e do desvio da linearidade, a variabilidade total das respostas é decomposta na soma dos quadrados dos resíduos da regressão (em torno da regressão) e na soma dos quadrados devido à regressão. A soma dos quadrados dos resíduos da regressão é então separada em soma dos quadrados do desvio da linearidade (falta de ajuste ao modelo) e soma dos quadrados do erro puro. A soma dos quadrados dos resíduos pode ser obtida pela diferença entre a soma dos quadrados total e a soma dos quadrados devida à regressão. A soma dos quadrados do erro puro é obtida pela diferença entre a soma do quadrado total e a soma do quadrados entre níveis. A estatística deste teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição F com os graus de liberdade correspondentes. É testada a hipótese nula de que a regressão linear não é significativa contra a hipótese alternativa de que a regressão linear é significativa. A hipótese nula é rejeitada quando a estatística F estimada for maior que o valor crítico F_c . Na planilha p deverá ser menor que 0,001. Para a avaliação da significância do desvio da linearidade, a hipótese nula de que o modelo linear simples é correto (não há desvios da linearidade) é confrontada com a hipótese alternativa de que o modelo linear não é correto (há desvio da linearidade). A hipótese nula é rejeitada quando a estatística estimada F for maior que o valor crítico F_c . Na planilha p deverá ser menor que 0,05 (INCQS, 2009; SOUZA, 2005).

ANEXO C – DESCRIÇÃO DAS EQUAÇÕES PARA OS CÁLCULOS DOS TESTES F-SNEDECOR E t STUDENT PARA COMPARAÇÃO DAS INCLINAÇÕES E INTERSEÇÕES DE CURVAS ANALÍTICAS

Avaliação	Estadística
	$\text{*teste F, } F = \frac{s_{res_1}^2}{s_{res_2}^2} \quad (\text{Equação 1})$
Variância residual	<p>Onde $s_{res_1}^2$ = estimativa do desvio padrão residual da curva 1; $s_{res_2}^2$ = estimativa do desvio padrão residual da curva 2. $F_{cal} < F_{tab}$ não há diferença significativa, variâncias semelhantes $F_{cal} > F_{tab}$ há diferença significativa, variâncias diferentes</p>
	$\text{Se } F_{cal} < F_{tab} \Rightarrow t_{cal} = \frac{ b_{1_1} - b_{1_2} }{S_{res_x} \sqrt{\frac{1}{\sum(x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum(x_2 - \bar{x}_2)^2}}} ; \quad (\text{Equação 2})$ <p>Onde b_{1_1} = coeficiente angular da curva 1 (curva em solvente); b_{1_2} = coeficiente angular da curva 1 (curva na matriz); x_1 = áreas da curva em solvente e x_2 = áreas da curva na matriz; \bar{x}_1 = média dos valores de x_1 e \bar{x}_2 = média dos valores de x_2; S_{res_x} = estimativa do desvio padrão residual agregado das duas curvas.</p> $S_{res_x} = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_{res_1}^2 + (n_2 - 2)S_{res_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}} \quad (\text{Equação 3})$
Comparação dos coeficientes angulares	<p>Onde S_{res_1} = estimativa do desvio padrão residual da curva 1; S_{res_2} = estimativa do desvio padrão residual da curva 2; n_1 = número de medidas da curva 1 e n_2 = número de medidas da curva 2.</p> <p>** Se $t_{cal} > t_{tab}$ o efeito matriz significativo</p>
	$\text{Se } F_{cal} > F_{tab} \Rightarrow t_{cal} = \frac{ b_{1_1} - b_{1_2} }{\sqrt{s_{b_{1_1}}^2 + s_{b_{1_2}}^2}} \quad (\text{Equação 4})$ <p>Onde b_{1_1} = coeficiente angular da curva 1 e b_{1_2} = coeficiente angular da curva 2; $s_{b_{1_1}}$ = estimativa do erro padrão do coeficiente angular da curva 1; $s_{b_{1_2}}$ = estimativa do erro padrão do coeficiente angular da curva 2.</p> $s_{b_{1_1}}^2 = \frac{(S_{res_1})^2}{\sum(x_1 - \bar{x}_1)^2} \quad (\text{Equação 5}) \quad \text{e} \quad s_{b_{1_2}}^2 = \frac{(S_{res_2})^2}{\sum(x_2 - \bar{x}_2)^2} \quad (\text{Equação 6})$ <p>Onde $s_{b_{1_1}}$ e $s_{b_{1_2}}$ são as estimativas dos erros padrão dos coeficientes angulares das curvas 1 e 2, respectivamente.</p> <p>Se $t_{cal} > t'$ o efeito matriz significativo</p> $t' = \frac{t_1 s_{b_{1_1}}^2 + t_2 s_{b_{1_2}}^2}{s_{b_{1_1}}^2 + s_{b_{1_2}}^2} \quad (\text{Equação 7})$ <p>Onde t_1 = valor teórico de t para curva 1 e t_2 = valor teórico de t para curva 2.</p>

* teste F, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e (n₁-1) e (n₂-1) graus de liberdade para o numerador e o denominador.

** teste t, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e (n₁ + n₂ - 4).

***teste t, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e (n₁ - 2) e (n₂ - 2) graus de liberdade para o numerador e o denominador.

Se o valor de F_{calc} for menor que o valor de F_{tab} (Equação 1), pode se considerar que não há diferença significativa entre as variâncias residuais e que as mesmas são iguais. Neste caso a matriz não tem efeito sobre a precisão do método na faixa de estudo avaliada.

O teste t (Equação 2) será aplicado após cálculo do desvio padrão agrupado (Equação 3). Se o valor de t_{cal} for menor que o valor de t_{tab} indicará que a matriz não afeta o ensaio. Entretanto, se o valor de F_{cal} for maior que o valor de F_{tab} (Equação 1) as variâncias não serão consideradas iguais demonstrando que a matriz tem efeito sobre a precisão do método e uma abordagem diferente será considerada.

O valor de t_{cal} segue a Equação 4, utilizando os valores das estimativas dos erros padrão dos coeficientes angulares obtidos através das Equações 5 e 6. Se o valor de t_{cal} for maior que o valor de t' (Equação 7), a diferença é significativa demonstrando que o efeito matriz afeta o ensaio (CARDOSO, 2008).

ANEXO D – DESCRIÇÃO DAS EQUAÇÕES PARA OS CÁLCULOS DOS TESTES F-SNEDECOR E t STUDENT PARA COMPARAÇÃO DE n REPLICATAS

Avaliação	Estatística
-----------	-------------

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{Equação 1})$$

Variância Onde s_1^2 = amostra com maior variância
 s_2^2 = amostra com menor variância
 $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ não há diferença significativa, variâncias semelhantes
 $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ há diferença significativa, variâncias diferentes

Se $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}} \Rightarrow$

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde \bar{x}_1 = média das respostas dos analitos na amostra com matriz x_1
 \bar{x}_2 = média das respostas dos analitos na amostra sem matriz x_2
 s_1 = desvio-padrão na amostra com matriz x_1
 s_2 = desvio-padrão na amostra sem matriz x_2
 n_1 = tamanho da amostra 1
 n_2 = tamanho da amostra 2
 s^2 = estimativa do desvio-padrão agregado nas duas amostras

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde s_1 = desvio-padrão na amostra com matriz x_1
 s_2 = desvio-padrão na amostra sem matriz x_2

*Se $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$ o efeito matriz não é significativo

Se $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}} \Rightarrow$

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde v = grau de liberdade para obtenção do t_{tab}

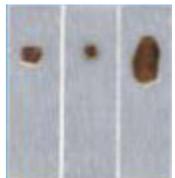
*Se $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$ o efeito matriz não é significativo

Se o valor de F_{calc} for menor que o valor de F_{tab} (Equação 1), pode-se considerar que não há diferença significativa entre as variâncias e que as mesmas são iguais. Neste caso a matriz não tem efeito sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo.

O teste t (Equação 2) será aplicado após cálculo do desvio padrão agrupado (Equação 3). Se o valor de t_{cal} for menor que o valor de t_{tab} indicará que a matriz não afeta o ensaio. Entretanto, se o valor de F_{cal} for maior que o valor de F_{tab} (Equação 1) as variâncias não serão consideradas iguais demonstrando que a matriz tem efeito sobre a precisão do método e uma abordagem diferente será considerada.

O valor de t_{cal} segue a Equação 4, utilizando o número de graus de liberdade v obtido através da Equações 5. Se o valor de t_{cal} for maior que o valor de t_{tab} , a diferença é significativa demonstrando que o efeito matriz afeta o ensaio (INMETRO, 2007).

ANEXO E – INTERPRETAÇÕES DO TESTE DE TRIAGEM UTILIZANDO O SIMULADOR DE SUJIDADE TOSI®

Resultados dos Testes de TOSI®	Classificação	Descrição	Possíveis Razões para os Resultados do Teste TOSI
	0	Resultado Ótimo Simulador de sujeidade dissolve-se completamente; nenhum resíduo do simulador de sujeidade permanece	Resultado Ótimo
	1	Resultado Negativo 1 TOSI® é totalmente enxaguado = sem proteínas solúveis na água visíveis, mas pequena quantidade de resíduos de fibrina permanece	a) TOSI posicionado incorretamente ou bloqueado b) Tempo de limpeza muito reduzido c) Temperatura não ótima d) Dosagem de detergente muito reduzida
	2	Resultado Negativo 2 TOSI® é totalmente enxaguado = sem proteínas solúveis na água visíveis, mas a maior parte ou toda a camada de fibrina permanece	a) TOSI posicionado incorretamente ou bloqueado b) Sobrecarga/carga incorreta c) Tempo de limpeza muito reduzido d) Temperatura não ótima f) Dosagem de detergente muito reduzida g) Eficiência de detergente inadequada
	3	Resultado Negativo 3 TOSI® é enxaguado de forma incompleta = pequenos resíduos de proteínas (vermelhas) solúveis na água são visíveis. Nenhuma ou somente uma pequena quantidade de camada de fibrina permanece visível	a) TOSI posicionado incorretamente ou bloqueado b) Sobrecarga/carga incorreta c) Distribuição desigual da água d) Sistema de irrigação bloqueado e) Filtro bloqueado f) Pressão de água insuficiente g) Resíduos de espuma deixados da pré-limpeza ou banho
	4	Resultado Negativo 4 TOSI é totalmente enxaguado = resíduos significativos de proteínas (vermelhas) solúveis na água são visíveis. Além disso, a maior parte ou toda a camada de fibrina permanece	a)-g) igual à classificação 3, mas mais aparente j) Temperatura incorreta do detergente k) Falha da química em uso
	5	Resultado Negativo 5 Simulador de sujeidade TOSI ampla ou totalmente não influenciado	a)-k) igual à classificação 4 l) Nenhuma etapa de pré-enxágüe a frio definida ou pré-enxágüe quente demais m) Ruptura completa da lavadora e/ou da química

Fonte: (Adaptado de PEREG)

ANEXO F – FORMULAÇÃO DE CADA FABRICANTE E RECOMENDAÇÕES INDICADAS EM CADA RÓTULO SOBRE A DILUIÇÃO DE USO, TEMPERATURA E TEMPO DE SUBMERSÃO DO PRODUTO

Amostras*	Diluição	Temperatura	Tempo	Composição
AM 1	8 mL → 1L	Morna**	1 min.	Agentes de controle de pH, essência, diluente, tensoativo anfótero, sequestrante, estabilizante, corante, veículo, <i>PROTEASE</i> .
AM 2	4 mL → 1L	Ambiente**	2 a 5 min.	Álcool isopropílico, detergente não iônico derivado dos polialquilfenoletoxilados, corante, fragrância, água, <i>AMILASES</i> , <i>LIPASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .
AM 3	5 mL → 1L	Morna	5 min.	Tensoativos não iônicos, estabilizantes de enzimas, conservante, sequestrantes, corante, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> .
AM 4	5 mL → 1L	Ambiente	15 min.	Propionato de amônio (6,30%), Cloridrato de polihexametileno de biguanida (0,96%), lauril iminodipropionato de sódio, isotridecanol etoxilado, álcool, anticorrosivo, solventes, excipientes, quelante, regulador de pH, corante, fragrância, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> .
AM 5	5 mL → 1L	40°C (morna) / 70°C (quente)	---	Alquil glucosídeo, quelante, estabilizadores de enzima, reguladores de pH, conservante, excipientes, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> .
AM 6	4 mL → 1L	Ambiente	2 min.	Álcool isopropílico, detergente não iônico álcool etoxilado, corante, fragrância, água, <i>AMILASES</i> , <i>LIPASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .
AM 7	2 mL → 1L	Ambiente	1 a 3 min.	Álcool isopropílico, tensoativo álcool etoxilado, corante, fragrância, água, <i>AMILASES</i> , <i>LIPASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .
AM 8	4 mL → 1L	Máx. 40°C	5 min.	Polimerização do óxido de propileno e óxido de etileno, nonil fenol etoxilado (9 moles), diluente, atenuador de espuma, corante, fragrância, água, <i>LIPASE</i> , <i>AMILASE</i> , <i>PROTEASE</i> .
AM 9	---	Ambiente	---	Álcool isopropílico, detergente não iônico derivado dos polialquilfenoletoxilados, água, <i>AMILASES</i> , <i>PROTEASES</i> , <i>CARBOHIDRASES</i> .
AM 10	2 mL → 1L	40 a 55°C	5 min.	Tensoativos álcool alcoxilado e xileno sulfonato de sódio, estabilizantes, conservante, água, <i>AMILASE</i> , <i>LIPASE</i> , <i>PROTEASE</i> , <i>PEPTIDASE</i> , <i>CELULASE</i> .

*As amostras foram identificadas por números, para preservar a marcas dos fabricantes

**Considerou-se 25°C e 40°C como temperaturas ambiente e da água morna, respectivamente

ANEXO G – PLANILHA DE AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCQS
---	--

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Protease - Linearidade		
Data de Confeccção da Curva:		Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Espectrofotômetro - Cary	Responsável:	Leonardo

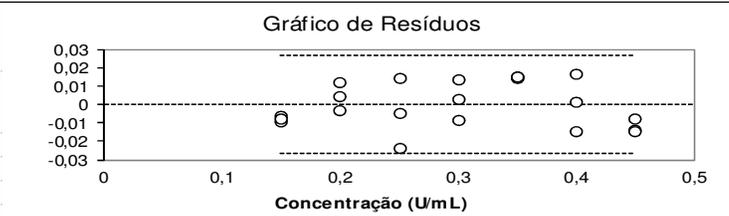
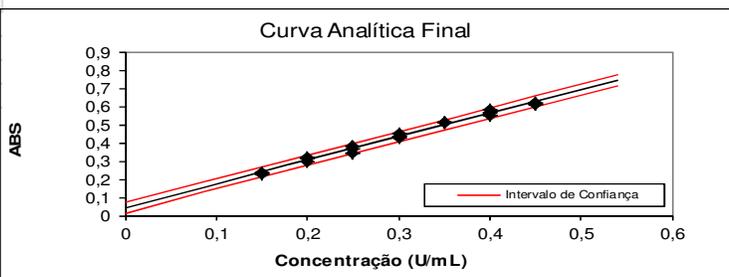
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. U/mL	Resposta ABS
1	01	0,15	0,2327
	02	0,15	0,2294
	03	0,15	0,2311
2	04	0,20	0,2999
	05	0,20	0,3156
	06	0,20	0,3078
3	07	0,25	0,3442
	08	0,25	0,3818
	09	0,25	0,3630
4	10	0,30	0,4243
	11	0,30	0,4464
	12	0,30	0,4354
5	13	0,35	0,5112
	14	0,35	0,5126
	15	0,35	0,5119
6	16	0,40	0,5474
	17	0,40	0,5786
	18	0,40	0,5630
7	19	0,45	0,6129
	20	0,45	0,6191
	21	0,45	0,6122

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	0,97
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,01
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,61E-04
t_L calculado	-6,56E-01
t_{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	5,19E-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	$Req > Rcrit$

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

Coefficiente Angular (b):	1,29E+00	Coefficiente Linear (a):	4,44E-02
r	0,9958	R ²	0,9916
N	21	Graus de Liberdade	19

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	2,47E-02	Limite de Quantificação	7,29E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

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

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,51E-01	3,51E-01	2,23E+03	3,64E-21
resíduos	19	2,99E-03	1,57E-04		
Ajuste	5	1,39E-03	2,79E-04	2,45E+00	8,59E-02
erro puro	14	1,60E-03	1,14E-04		
total	20	3,54E-01			

Observações

Fonte: (BAZILIO, 2012)

ANEXO H – PLANILHA DE AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NA CURVA MATRIZ

	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:	Protease - Efeito Matriz		
Data de Confeção da Curva:		Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Espectrofotômetro - Cary	Responsável:	Leonardo

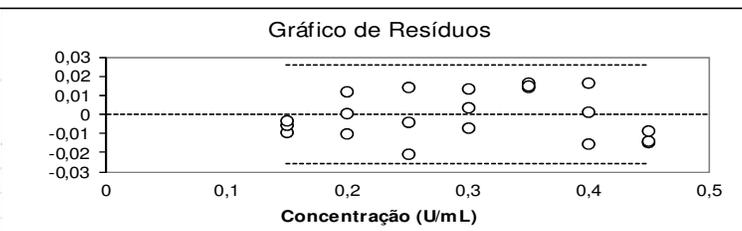
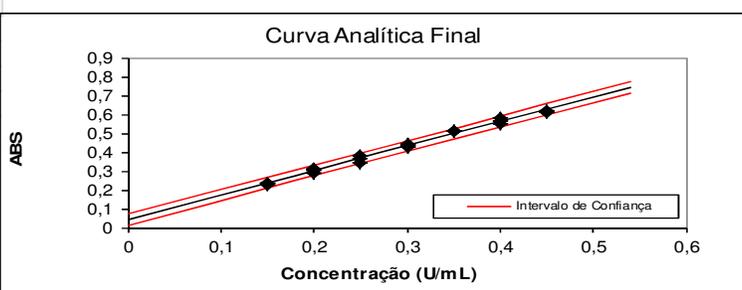
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. U/mL	Resposta ABS
1	01	0,15	0,2275
	02	0,15	0,2311
	03	0,15	0,2334
2	04	0,20	0,2916
	05	0,20	0,3025
	06	0,20	0,3140
3	07	0,25	0,3623
	08	0,25	0,3460
	09	0,25	0,3811
4	10	0,30	0,4243
	11	0,30	0,4349
	12	0,30	0,4450
5	13	0,35	0,5110
	14	0,35	0,5134
	15	0,35	0,5117
6	16	0,40	0,5629
	17	0,40	0,5466
	18	0,40	0,5778
7	19	0,45	0,6120
	20	0,45	0,6130
	21	0,45	0,6182

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	0,96
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,76
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

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

Coefficiente Angular (b):	1,30E+00	Coefficiente Linear (a):	4,15E-02
r	0,9959	R ²	0,9918
N	21	Graus de Liberdade	19

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,57E-04
t _L calculado	-8,12E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	4,27E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	2,44E-02	Limite de Quantificação	7,21E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

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

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,55E-01	3,55E-01	2,29E+03	2,90E-21
resíduos	19	2,95E-03	1,55E-04		
Ajuste	5	1,34E-03	2,67E-04	2,32E+00	9,83E-02
erro puro	14	1,61E-03	1,15E-04		
total	20	3,58E-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	$Req > Rcrit$

Observações

--

Fonte: (BAZILIO, 2012)

ANEXO I – TABELA DE DADOS DE CÁLCULO EFEITO MATRIZ EM CURVA ADIÇÃO PADRÃO E ANALÍTICA

Conc. (U/mL) (X ₁)	Abs (Y ₁)	Y _{1est}	Y ₁ -Y _{1est}	(X ₁ -X _{1med}) ²	X ₁ ²
0,15	0,2327	0,238420833	-0,00572083	0,0225	0,0225
0,15	0,2294	0,238420833	-0,00902083	0,0225	0,0225
0,15	0,23105	0,238420833	-0,00737083	0,0225	0,0225
0,2	0,2999	0,303079762	-0,00317976	0,01	0,04
0,2	0,3156	0,303079762	0,01252024	0,01	0,04
0,2	0,30775	0,303079762	0,00467024	0,01	0,04
0,25	0,3442	0,36773869	-0,02353869	0,0025	0,0625
0,25	0,3818	0,36773869	0,01406131	0,0025	0,0625
0,25	0,363	0,36773869	-0,00473869	0,0025	0,0625
0,3	0,4243	0,432397619	-0,00809762	3,08149E-33	0,09
0,3	0,4464	0,432397619	0,01400238	3,08149E-33	0,09
0,3	0,43535	0,432397619	0,00295238	3,08149E-33	0,09
0,35	0,5112	0,497056548	0,01414345	0,0025	0,1225
0,35	0,5126	0,497056548	0,01554345	0,0025	0,1225
0,35	0,5119	0,497056548	0,01484345	0,0025	0,1225
0,4	0,5474	0,561715476	-0,01431548	0,01	0,16
0,4	0,5786	0,561715476	0,01688452	0,01	0,16
0,4	0,563	0,561715476	0,00128452	0,01	0,16
0,45	0,6129	0,626374405	-0,0134744	0,0225	0,2025
0,45	0,6191	0,626374405	-0,0072744	0,0225	0,2025
0,45	0,6122	0,626374405	-0,0141744	0,0225	0,2025

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	0,000149537
S ² res Matriz	0,00014748
GL _{(n1 + n2) - 4}	38
F _(1-α/2;GL)	2,17
Teste F	1,013949178

Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	1,293178571
Interceção	0,044444048
Sxx ₁	0,21
s ² res ₁	0,000149537
n ₁	21
ΣX ₁ ²	2,1
X ₁ med	0,3

Conc. (U/mL) (X ₂)	Abs (Y ₂)	Y _{2est}	Y ₂ -Y _{2est}	(X ₂ -X _{2med}) ²	X ₂ ²
0,15	0,2275	0,236489286	-0,00898929	0,0225	0,0225
0,15	0,2311	0,236489286	-0,00538929	0,0225	0,0225
0,15	0,2334	0,236489286	-0,00308929	0,0225	0,0225
0,2	0,2916	0,30147381	-0,00987381	0,01	0,04
0,2	0,3025	0,30147381	0,00102619	0,01	0,04
0,2	0,3140	0,30147381	0,01252619	0,01	0,04
0,25	0,3623	0,366458333	-0,00415833	0,0025	0,0625
0,25	0,3460	0,366458333	-0,02045833	0,0025	0,0625
0,25	0,3811	0,366458333	0,01464167	0,0025	0,0625
0,3	0,4243	0,431442857	-0,00714286	3,08149E-33	0,09
0,3	0,4349	0,431442857	0,00345714	3,08149E-33	0,09
0,3	0,4450	0,431442857	0,01355714	3,08149E-33	0,09
0,35	0,5110	0,496427381	0,01457262	0,0025	0,1225
0,35	0,5134	0,496427381	0,01697262	0,0025	0,1225
0,35	0,5117	0,496427381	0,01527262	0,0025	0,1225
0,4	0,5629	0,561411905	0,0014881	0,01	0,16
0,4	0,5466	0,561411905	-0,0148119	0,01	0,16
0,4	0,5778	0,561411905	0,0163881	0,01	0,16
0,45	0,6120	0,626396429	-0,01439643	0,0225	0,2025
0,45	0,6130	0,626396429	-0,01339643	0,0225	0,2025
0,45	0,6182	0,626396429	-0,00819643	0,0225	0,2025

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	1,299690476
Interceção	0,041535714
Sxx ₂	0,21
s ² res ₂	0,00014748
n ₂	21
ΣX ₂ ²	2,1
X ₂ med	0,3

Avaliação	
s ² p	0,000148508
t _b	0,173151999
t _a	0,244547738
GL _{(n1 + n2) - 4}	38
t _(1-α/2;GL)	2,02