

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

Maria Pasionaria Blanco Centurión

**ESTUDO DA LIPASE EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS DE USO RESTRITO EM  
ESTABELECIMENTOS DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

Rio de Janeiro

2017

Maria Pasionaria Blanco Centurión

**ESTUDO DA LIPASE EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS DE USO RESTRITO EM ESTABELECIMENTOS DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

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

Orientadora: Célia Maria Carvalho Araujo  
Pereira Romão

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Centurión, Maria Pasionaria Blanco

Estudo da lipase em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde. / Maria Pasionaria Blanco. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

89 f. : il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Orientadora: Célia Maria Carvalho Araújo Pereira Romão.

1. Lipase. 2. Detergente enzimático. 3. Vigilância Sanitária.

Study of lipase in enzymatic detergents for restricted use in health care assistance establishments

Maria Pasionaria Blanco Centurión

**ESTUDO DA LIPASE EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS DE USO RESTRITO EM ESTABELECIMENTOS DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE**

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

Aprovado em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Elisabete Pereira dos Santos (Doutor)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Filipe Soares Quirino da Silva (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão (Doutor) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho aos meus pais  
Ermelinda e Victor, pelo  
incondicional apoio em todos os  
momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ser perfeito em tudo que faz, sempre colocando as pessoas certas nas horas que mais precisei.

À minha família, que mesmo de longe, sempre demonstra que o amor ultrapassa fronteiras, me dando forças acima de tudo para continuar e não desistir pelo caminho.

À minha irmã gêmea, Consuelo, pelo apoio incondicional para chegar até aqui.

À minha irmã Lilian, meu melhor exemplo, pelo apoio e pelos dois sobrinhos maravilhosos, Rafael e Carlos, que são minha fonte de alegria, fortaleza e amor.

Ao meu irmão Victor, um grande sonhador, que me incentiva a persistir nos meus sonhos.

À meu namorado Hivo, pelo apoio, amor, carinho, respeito e compreensão.

À minha orientadora Célia Romão, pelo apoio e ensinamento em todos os momentos que precisei.

Aos orientadores do Laboratório de Saneantes e Cosméticos do INCQS, Adriana Sant'ana e Leonardo Lopes, pelo apoio na execução da minha dissertação.

À Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, por aceitar ser revisora deste trabalho, assim contribuir significativamente para realização desta dissertação.

Ao Dr. Vlamir por disponibilizar o uso do espectrômetro de microplacas do laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS.

Ao Dr. Fernando Conte do Laboratório de Tecnologia de anticorpos monoclonais – LATAM Biomanguinhos/Fiocruz, por disponibilizar o uso do espectrômetro de microplacas.

Aos meus amigos que conheci ao longo da minha caminhada no INCQS, Ana Simões, Ana Lucia, Sibebe, Virginia, Terezinha, Solange, Janete, Rosa, Marina, Luciana, Paulo, Gerardo e Pedro Paulo, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao Dr. Frederico Peres, pelo exemplo, apoio e incentivo recebido.

Aos amigos da ACI, Marcelo, Luís Pedro, Edilene e Ana Laura pelas palavras de apoio em todo momento.

As minhas amigas Patrícia e Juliana, pelo incentivo e apoio especial.

Aos amigos, professores, coordenadores e equipe do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, especialmente ao meu colega Deivid por toda ajuda e apoio.

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e contribuir com sugestões para a qualidade deste trabalho.

Não deixe o barulho da opinião dos outros abafar sua voz interior. E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o mais é secundário.

*Steve Jobs*

## RESUMO

A etapa de limpeza de artigos hospitalares torna-se fundamental para os processos de desinfecção e esterilização e a falta de eficácia pode comprometer o reprocessamento de dispositivos médicos. Artigos não descontaminados adequadamente após o uso colocam em risco a segurança do paciente e dos profissionais que atuam nesses serviços, pois podem se tornar veículos de agentes infecciosos. O uso de detergentes adicionados de enzimas, tem se apresentado como uma vantagem em relação aos detergentes tradicionais na limpeza de instrumentais críticos em hospitais e outras entidades de assistência à saúde, principalmente no que diz respeito à conservação desses materiais. Essas formulações podem conter várias combinações de enzimas, como: protease, lipase e amilase. Atualmente, existem metodologias analíticas para determinação da concentração da atividade enzimática da protease e amilase em detergentes enzimáticos de uso restrito em Estabelecimentos de Assistência à Saúde, que estão contidas na Resolução RDC nº 55, de 14 de novembro de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Entretanto, a não disponibilidade de um método analítico para determinação concentração da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos de uso restrito em Estabelecimentos de Assistência à Saúde impossibilita o controle desta enzima nos detergentes, sem garantir a eficácia desses produtos. O objetivo deste estudo foi avaliar três métodos visando propor uma metodologia analítica para o controle da atividade lipolítica. Foram estudados três métodos, sendo que a determinação da concentração da atividade lipolítica foi realizada através da quantificação do *p*-nitrofenol, liberado pela reação de hidrólise do substrato caprilato de *p*-nitrofenil. Os métodos I e II foram realizados em espectrofotômetro convencional, com a utilização de soluções de inibição. Para o método III, foi utilizando espectrofotômetro de microplacas, sem a utilização de solução de inibição, sendo um ensaio cinético contínuo que demonstrou ser o mais aplicável para determinar a atividade lipolítica. Mostrando-se também satisfatória quanto aos parâmetros de precisão e especificidade, após conclusão de validação, a metodologia poderá ser incorporada na Resolução RDC Anvisa nº55/2012.

Palavras chave: Lipolase. Detergente enzimático. Ensaio cinético. Vigilância Sanitária

## RESUMEN

La etapa de limpieza de artículos hospitalares se convierte en algo esencial para los procesos de desinfección y esterilización y la falta de eficacia puede comprometer el reprocesamiento de productos médicos. Los artículos no descontaminados adecuadamente después de su uso ponen en peligro la seguridad de los pacientes y los profesionales que trabajan en estos servicios, ya que pueden convertirse en portadores de agentes infecciosos. El uso de detergentes con enzimas añadidas, ha demostrado ser una ventaja sobre los detergentes tradicionales para la limpieza de instrumentos críticos en hospitales y otras entidades de atención de la salud, en particular con respecto a la conservación de estos materiales. Estas formulaciones pueden contener varias combinaciones de enzimas, tales como proteasa, lipasa y amilasa. Actualmente, existen métodos analíticos para la determinación de la concentración de la actividad enzimática de la proteasa y amilasa en detergentes enzimáticos de uso restringido en Establecimientos de Asistencia a la Salud, que están contenidos en la resolución N° 55, 14 de noviembre de 2012, de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Sin embargo, al no disponer de un método analítico para la determinación de la concentración de la actividad lipolítica en detergentes enzimáticos de uso restringido en Establecimientos de Asistencia a la Salud, imposibilita el control de esta enzima en los detergentes, sin garantizar la eficacia de esos productos. El objetivo de este estudio fue evaluar tres métodos para proponer una metodología analítica para el control de la actividad lipolítica. Se estudiaron tres métodos, siendo que la determinación de la concentración de la actividad lipolítica fue realizada a través de la cuantificación del *p*-nitrofenol, liberado por la reacción de hidrólisis del sustrato caprilato de *p*-nitrofenil. Los métodos I y II se realizaron en espectrofotómetro convencional, con la utilización de soluciones de inhibición. Para el método III, fue utilizado espectrofotómetro de microplacas, sin la utilización de solución de inhibición, siendo un ensayo cinético continuo que demostró ser el más aplicable para determinar la actividad lipolítica. Mostrando también satisfactoria en cuanto a los parámetros de precisión y especificidad, después de la finalización de la validación, la metodología podrá ser incorporada en la Resolución RDC Anvisa n°55/2012.

Palabras claves: Lipolase. Detergente enzimático. Ensayo cinético. Vigilancia Sanitaria

## ABSTRACT

The stage of cleaning hospital materials becomes essential for disinfection and sterilization processes and the lack of efficacy can compromise the reprocessing of medical devices. Materials that are not properly decontaminated after use put at risk the safety of patients and the professionals who are working in those places could become vehicles of infectious agents. The use of enzymatic detergents has been shown to be an advantage over traditional detergents in the cleaning of critical instruments in hospitals and other healthcare facilities, especially, regarding to the conservation of these materials. These formulations may contain various combinations of enzymes, such as protease, lipase and amylase. Currently, there are analytical methodologies to determine the enzymatic activity concentration of protease and amylase in enzymatic detergents of restricted use in Health Care Facilities, according to established in Brazilian National Health Oversight Agency Resolution No. 55 of November 14<sup>th</sup>, 2012. However, the lack of availability of an analytical method for determination concentration of lipolytic activity in enzymatic detergents for restricted use in Health Care Facilities makes it impossible to control this enzyme in detergents, without guaranteeing the efficacy of these products. The objective of this study was to evaluate three methods to propose an analytical methodology for the control of lipolytic activity. Three methods were studied, and the concentration of lipolytic activity was determined by quantification of *p*-nitrophenol, released by the hydrolysis reaction of the substrate *p*-nitrophenylcaprylate. The methods I and II were performed in a conventional spectrophotometer, using inhibition solutions. For method III, it was used a microplate spectrophotometer, without the use of inhibition solution, being a continuous kinetic test that proved to be the most applicable to determine the lipolytic activity. It is also satisfactory for the parameters of precision and specificity, after completion of validation, the methodology can be incorporated in Resolution RDC Anvisa nº55 / 2012.

Keywords: Lipolase, Enzymatic detergent, Kinetic test, Vigilance Surveillance

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Determinação da repetibilidade.....	37
Equação 2	Determinação da concentração na curva analítica do <i>p</i> -nitrofenol para o Método I e Método II.....	46
Equação 3	Determinação da concentração de atividade lipolítica para o Método I e Método II.....	46
Equação 4	Dedução da Equação determinação da concentração de atividade lipolítica para o Método I e Método II.....	46
Equação 5	Determinação da concentração na curva analítica do <i>p</i> -nitrofenol para o Método III.....	47
Equação 6	Equação de Horwitz - desvio padrão relativo de reprodutibilidade.....	55
Equação 7	Equação de Horwitz - desvio padrão relativo de repetibilidade.....	55
Equação 8	Equação de $HorRat_{repe}$ .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	27
Figura 2	Reação catalisada por lipase.....	33
Figura 3	Fluxograma do estudo das metodologias para determinação da concentração da atividade lipolítica.....	52
Figura 4	Gráfico da Curva analítica do <i>p</i> -nitrofenol no comprimento de onda de 412 nm – Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	59
Figura 5	Espectro de absorção referente ao <i>p</i> -nitrofenol – Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	60
Figura 6	Curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica - Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	61
Figura 7	Gráfico da Curva analítica do Método II no comprimento de onda de 400 nm para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	62
Figura 8	Gráfico da Curva analítica 1 do <i>p</i> -nitrofenol – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	64
Figura 9	Espectro de absorção referente ao <i>p</i> -nitrofenol – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	65
Figura 10	Curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	66
Figura 11	Gráfico da Curva analítica 2 do <i>p</i> -nitrofenol – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	66
Figura 12	Curva de progresso da reação enzimática da lipase com o substrato caprilato de <i>p</i> -nitrofenil em espectrofotômetro de microplacas – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	67
Figura 13	Varredura da solução estoque de lipolase® na região de 300 a 550 nm.....	70
Figura 14	Varredura da solução padrão de <i>p</i> -nitrofenol na região de 300 a 550 nm.....	70
Figura 15	Varredura da amostra de trabalho na região de 300 a 550 nm.....	70
Figura 16	Varredura da matriz sem analito na região de 300 a 550 nm.....	70
Figura 17	Varredura do branco do ensaio na região de 300 a 550 nm.....	71
Figura 18	Gráfico da 1° curva analítica para o <i>p</i> -nitrofenol na faixa de	

	concentração de 0,0060 a 0,0562 $\mu\text{mol/mL}$ .....	71
Figura 19	Gráfico da 2° curva analítica para o <i>p</i> -nitrofenol na faixa de concentração de 0,0060 a 0,0562 $\mu\text{mol/mL}$ .....	72
Figura 20	Gráfico da 3° curva analítica para o <i>p</i> -nitrofenol na faixa de concentração de 0,0060 a 0,0562 $\mu\text{mol/mL}$ .....	72

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação internacional das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biología Molecular.....	24
Quadro 2 - Aplicações industriais das lipases.....	26
Quadro 3 - Composição de Detergentes enzimáticos.....	29
Quadro 4 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos 7 níveis da curva analítica de <i>p</i> -nitrofenol – Método II.....	43
Tabela 2	Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método II para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	44
Tabela 3	Concentrações dos 7 níveis da curva analítica 1 de <i>p</i> -nitrofenol – Método III para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	48
Tabela 4	Concentrações dos 7 níveis da curva analítica 2 de <i>p</i> -nitrofenol – Método III para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	49
Tabela 5	Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método III para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	50
Tabela 6	Absorbâncias obtidas no Método I para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos .....	56
Tabela 7	Absorbâncias obtidas no Método I com mudança na preparação do substrato para determinação da atividade lipolítica.....	57
Tabela 8	Absorbâncias obtidas no Método II com a utilização do caprilato de <i>p</i> -nitrofenil como substrato.....	57
Tabela 9	Absorbâncias obtidas no Método II com a utilização do valerato de <i>p</i> -nitrofenil como substrato.....	58
Tabela 10	Absorbâncias obtidas na avaliação do branco para o Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	58
Tabela 11	Absorbâncias obtidas com novo branco para zerar o equipamento no Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	59
Tabela 12	Leituras das absorbâncias realizadas com o Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.....	63
Tabela 13	Determinação de atividade lipolítica em detergente enzimático comercial - amostra AM 1.....	68
Tabela 14	Determinação de atividade lipolítica em detergente enzimático comercial - amostra AM 2.....	69
Tabela 15	Concentração da atividade lipolítica da amostra de trabalho.....	73
Tabela 16	Concentração em fração de massa da amostra de trabalho.....	73

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IRAS	Infecções relacionadas à assistência em saúde
CME	Centros de Material e Esterilização
Abs	Unidade de absorbância
ANOVA	Análise de Variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coeficiente de Variação
DPRr	Desvio Padrão Relativo de Repetitividade
DQ	Departamento de Química
EAS	Estabelecimentos de Assistência à Saúde
EC	<i>Enzyme Commission</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry And Molecular Biology</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
POP	Procedimento Operacional Padronizado
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UI	<i>Unit International</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 INFECÇÃO HOSPITALAR E PROCESSAMENTO DE PRODUTOS PARA A SAÚDE.....	18
1.2 USO DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS NA LIMPEZA DE ARTIGOS E INSTRUMENTOS DE EAS.....	21
1.3 ENZIMAS E CLASSIFICAÇÃO .....	23
1.3.1 Definição .....	23
1.3.2 Classificação das enzimas .....	23
1.3.3 Lipases em detergentes enzimáticos .....	28
1.4 REGULAÇÃO SANITÁRIA DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS.....	30
1.5 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE.....	32
1.6 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	34
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	38
2.1 OBJETIVO GERAL .....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	39
3.1 AMOSTRA DE TRABALHO.....	39
3.1.1 Amostra de trabalho.....	39
3.1.1.1 <i>Amostra de detergente enzimático de uso hospitalar</i> .....	39
3.2 REAGENTES.....	39
3.3 METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA ESTUDADAS.....	40
3.3.1 Método I.....	40
3.3.1.1 <i>Alterações realizadas na preparação do substrato</i> .....	41
3.3.2 Método II.....	42
3.3.2.1 <i>Avaliação do branco da amostra</i> .....	43
3.3.2.2 <i>Curva analítica</i> .....	43
3.3.2.3 <i>Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção</i> .....	43
3.3.2.4 <i>Avaliação da faixa linear da curva analítica – Curva de Ringbom</i> .....	44
3.3.2.5 <i>Ensaio com a amostra de trabalho</i> .....	46
3.3.3 Determinação da concentração da atividade lipolítica para a o Método I e Método II.....	46
3.3.4 Método III (em microplacas) .....	47
3.3.4.1 <i>Curva analítica 1</i> .....	48
3.3.4.2 <i>Curva analítica 2</i> .....	48

3.3.4.3 Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção.....	49
3.3.4.4 Avaliação da faixa linear da curva analítica – Curva de Ringbom.....	49
3.3.4.5 Avaliação da curva de progresso da reação enzimática.....	51
3.3.4.6 Fluxograma do estudo.....	52
3.4 MÉTODO III OTIMIZADO.....	53
3.4.1 Atividade lipolítica nas amostras de detergentes enzimáticos – Método III.....	53
<b>4 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA III.....</b>	<b>54</b>
4.1 ESPECIFICIDADE.....	54
4.2 DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA.....	54
4.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO.....	55
4.3.1 Determinação da repetibilidade.....	55
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
5.1 MÉTODO I.....	56
5.2 MÉTODO II.....	57
5.2.1 Curva analítica.....	59
5.2.2 Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção.....	60
5.2.3 Avaliação da faixa linear da curva analítica – Curva de Ringbom.....	60
5.2.4 Definição da curva do <i>p</i> -nitrofenol.....	61
5.2.5 Ensaio com a amostra de trabalho.....	62
5.3 MÉTODO III.....	64
5.3.1 Curva analítica.....	64
5.3.2 Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção.....	65
5.3.3 Avaliação da faixa linear da curva analítica – Curva de Ringbom.....	65
5.3.4 Definição da curva de <i>p</i> -nitrofenol.....	66
5.3.5 Avaliação da curva de progresso da reação enzimática.....	67
5.4 MÉTODO III OTIMIZADO.....	67
5.4.1 Atividade lipolítica nas amostras de detergentes enzimáticos – Método III.....	67
5.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO III.....	70
5.5.1 Especificidade.....	70
5.5.2 Determinação da linearidade da curva de analítica.....	71
5.5.3 Determinação da precisão.....	73
5.5.3.1 Determinação da repetibilidade.....	73
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE A - PLANILHA DE AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA.....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 INFECÇÃO HOSPITALAR E PROCESSAMENTO DE PRODUTOS PARA A SAÚDE

As infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) são aquelas que se manifestam durante a internação ou mesmo após a alta do paciente, quando puder ser relacionada com a hospitalização (BRASIL, 1998). Essas infecções são um grave problema de saúde pública em todo o mundo, pois são os eventos adversos associados à assistência à saúde mais frequentes e apresentam uma alta morbidade e mortalidade, repercutindo diretamente na segurança do paciente e por sua vez na qualidade dos serviços de saúde (COSTA, 2016).

A repercussão da incidência das IRAS pode ser notada com o aumento da morbidade e mortalidade hospitalar, bem como com o prolongamento da internação e o aumento dos custos assistenciais. Os três desafios fundamentais para a prevenção e controle das IRAS são: a) resistência bacteriana; b) o processamento de produtos para saúde; c) e o comportamento do profissional de saúde diante da adoção das recomendações do controle de infecção (OLIVEIRA; DAMASCENO; RIBEIRO, 2009).

Os produtos para saúde envolvem uma diversidade de artigos médicos utilizados na prática clínica e hospitalar. A partir da RDC nº 15 de março de 2012, a expressão “produtos para saúde” vem em substituição ao “artigo médico-hospitalar”, sendo classificados em:

- *Produtos para saúde críticos* que são aqueles utilizados em procedimentos invasivos com penetração de pele e mucosas adjacentes, tecidos subepiteliais, e sistema vascular, incluindo também todos os produtos para saúde que estejam diretamente conectados com esses sistemas;

- *Produtos para saúde semi-críticos* definido como produtos que entram em contato com pele não íntegra ou mucosas íntegras colonizadas;

- *Produtos para saúde não-críticos* são produtos que entram em contato com pele íntegra ou não entram em contato com o paciente;

- *Produtos para saúde passíveis de processamento* são os produtos para saúde fabricados a partir de matérias primas e conformação estrutural, que

permitem repetidos processos de limpeza, preparo e desinfecção ou esterilização, até que percam a sua eficácia e funcionalidade;

- *Produtos para saúde crítico de conformação complexa*: produtos para saúde que possuam lúmen inferior a cinco milímetros ou com fundo cego, espaços internos inacessíveis para a fricção direta, reentrâncias ou válvulas;

- *Produtos para saúde de conformação não complexa*: produtos para saúde cujas superfícies internas e externas podem ser atingidas por escovação durante o processo de limpeza e tenham diâmetros superiores a cinco milímetros nas estruturas tubulares (BRASIL, 2012a).

O processamento de produto para saúde é o conjunto de ações relacionadas à pré-limpeza, recepção, limpeza, secagem, avaliação da integridade e da funcionalidade, preparo, desinfecção ou esterilização, armazenamento e distribuição para as unidades consumidoras (BRASIL, 2012a). Esses produtos para a saúde podem se transformar em reservatórios ou fontes de microrganismos, em decorrência de práticas inadequadas de limpeza, desinfecção e esterilização, e assim causar infecção hospitalar em pacientes expostos (COSTA; COSTA, 2011).

A limpeza é a remoção de material estranho (por exemplo, solo e material orgânico) a partir de objetos e é normalmente realizada utilizando-se água com detergentes ou produtos enzimáticos (RUTALA; WEBER, 2008).

O processamento de produtos para saúde é uma etapa crítica, pois é necessária uma limpeza completa das superfícies e dos canais internos de instrumentos antes da desinfecção de alto nível e esterilização porque os materiais inorgânicos e orgânicos que permanecem nos instrumentos podem interferir com a eficácia destes processos. A matéria orgânica presente nos instrumentos após o uso, se não removida adequadamente, interfere no processo de desinfecção, de duas maneiras: reage com o agente químico impedindo sua ação ou protege o microrganismo da ação do produto. (RUTALA; WEBER, 2008). Dois principais tipos de riscos estão associados com o reuso de um dispositivo médico, o risco de transmissão de microrganismos infecciosos e o risco de alteração do desempenho do produto após o reprocessamento, podendo resultar em um dano e um problema de segurança para pacientes e profissionais de saúde (COSTA et al, 2011). Entretanto, a reutilização é uma prática frequente nos hospitais e demais serviços de saúde em todo o mundo, tendo como justificativa o alto custo dos artigos médicos.

O curto tempo de imersão nos detergentes enzimáticos pode agilizar os procedimentos de preparo e esterilização, sendo este aspecto favorável para o

gerenciamento nos Centros de Materiais e Esterilização (CME). A maior agilidade no processo de limpeza pode, inclusive, facilitar a distribuição de cirurgias no centro cirúrgico devido a maior rapidez na liberação de materiais esterilizados (SCHMIDT; YONEKURA; GIL, 2007).

Os detergentes enzimáticos têm sido amplamente utilizados para a limpeza de produtos para saúde. Pesquisas realizadas na Itália (SPINZI et al., 2008) e anteriormente na Espanha (BRULLET; RAMIREZ-ARMENGOL; CAMPO, 2001) mostraram que 76,9% e 61% dos serviços, respectivamente, empregavam esses detergentes para endoscópios.

Segundo Chiu, Lu e Chiou (2015), o reprocessamento de endoscópios gastrointestinais é uma questão complexa, onde três etapas devem ser destacadas: lavagem manual utilizando detergente enzimático compatível, desinfecção de alto nível e secagem.

Estudos têm revelado a presença de microrganismos de importância clínica em endoscópios após o reprocessamento. Chiu et al (2012) mostraram, em pesquisa prospectiva de 5 anos na Tailândia, que o número de culturas positivas obtidas no canal de biópsia foi de 13,6% (57/420), considerado significativo. Mais de 68,4% dos organismos identificados eram bactérias Gram negativas não fermentadoras da glicose, frequentemente associadas a uma variedade de infecções predominantemente em pacientes imunocomprometidos. Pesquisa realizada no Brasil, em 2011, revelou que 80,6% dos gastroscópios apresentavam contaminação, após o reprocessamento, inclusive com microrganismos importantes em infecções. O autor concluiu que a etapa mais crítica do processo foi a limpeza, por diversos fatores, incluindo a utilização inadequada do detergente enzimático, no que diz respeito à temperatura e ao tempo de imersão (RIBEIRO, 2011). Surtos epidêmicos de infecções após procedimentos vídeo-assistidos foram relatados no Rio de Janeiro e em outros estados. Foram detectadas irregularidades no reprocessamento dos artigos médicos, onde a limpeza manual inadequada e a possível tolerância do microrganismo causador das infecções ao desinfetante utilizado pode ter facilitado a ocorrência de surtos por micobactérias de crescimento rápido (DUARTE et al, 2009).

## 1.2 USO DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS NA LIMPEZA DE ARTIGOS E INSTRUMENTOS DE EAS

Segundo a Resolução nº 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 (BRASIL, 2008). 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 frequentemente, 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).

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

Os detergentes enzimáticos para limpeza de dispositivos médicos são produtos cuja formulação contém, além de um tensoativo, pelo menos uma enzima hidrolítica da subclasse das proteases, podendo conter também outras enzimas como amilase e lipase, tendo como finalidade, através de sua atividade enzimática, catalisar uma reação degradando substratos específicos e com isso remover a sujidade clínica (BRASIL, 2012b). Essas formulações podem conter várias combinações de protease (degrada proteína), lipase (degrada lipídeo) e amilase (degrada carboidratos) (ALFA; JACKSON, 2001).

As enzimas adicionadas às formulações de detergentes de uso hospitalar, doméstico e industrial agem digerindo e dissolvendo resíduos orgânicos (sangue, fezes, urina, vômitos, manchas diversas) higienizando as partes externas e internas de instrumentos cirúrgicos, desobstruindo canais com resíduos e substâncias coaguladas, eliminando resíduos fecais dos canais e superfícies dos fibroscópios e removendo contaminantes da roupa hospitalar (GODFREY, 1996).

Segundo Jurado et al (2007), produtos de limpeza contemporâneos são misturas compostas de vários ingredientes ativos que diferem de acordo com a finalidade do detergente. Além dos surfactantes como componentes principais, os

detergentes contêm aditivos, inibidores de corrosão, branqueadores ópticos, reguladores de espuma, agentes branqueadores e enzimas, entre outros aditivos auxiliares. Desta maneira, esses detergentes têm grande destaque na etapa de limpeza em áreas médico-hospitalares, contribuindo para plena eficácia dos processos de desinfecção e esterilização.

Fórmulas de detergentes à base de enzimas foram comercializados pela primeira vez na década de 1960, e desde então têm atraído interesse da indústria e da academia, ambos devido às numerosas vantagens decorrentes do uso de enzimas como agentes de limpeza (JURADO et al, 2007). Essas enzimas são muito utilizadas nas indústrias devido ao alto grau de especificidade das reações que catalisam, pois efetuam conversões eficientes, econômicas, podem atuar em concentrações baixas, sob condições brandas de pH e temperatura e, principalmente, são biodegradáveis (SANTOS, 2011).

As enzimas podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana. Claude Bernard (1856) isolou pela primeira vez a lipase de suco pancreático e verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo. Anos mais tarde, o interesse pelas lipases microbianas aumentou devido à estabilidade e facilidade de obtenção em comparação com as de origem animal (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Dentre as enzimas de origem animal, são exemplos, a pancreatina, tripsina, renina e catalase; dentre as enzimas de origem vegetal, a papaína e bromelina (LIMA et al. 2001). As lipases, amilases e proteases de origem microbiana são destaque no mercado industrial (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007) apresentando procedimentos mais simples de isolamento e maior possibilidade de manipulação genética (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006).

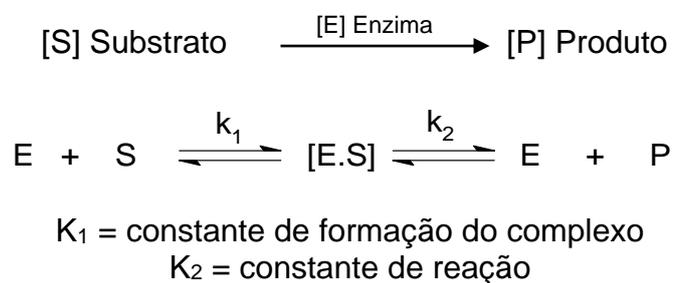
As lipases extracelulares são produzidas por muitos microrganismos quando em condições favoráveis. Os fungos filamentosos são os melhores produtores de lipases, principalmente os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Thermomyces* e *Trichoderma* (CARDENAS et al, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2010).

## 1.3 ENZIMAS E CLASSIFICAÇÃO

### 1.3.1 Definição

As enzimas são proteínas de ação catalítica, que dependem 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).

As enzimas afetam a velocidade mas não o equilíbrio químico das reações, que podem ser escritas 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. São catalisadores extraordinários, sendo também muito específicas, discriminando entre substratos com estrutura muito similares (LEHNINGER, 2002).

### 1.3.2 Classificação das enzimas

Mais de 6800 enzimas foram catalogadas até hoje e estão divididas em 6 grupos, classificados de acordo com o substrato e a reação de catálise específica, pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB; 1992). As enzimas podem ser classificadas em seis classes, com base nas reações catalisadas: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação internacional das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biología Molecular

GRUPO DE ENZIMAS	TIPO DE REAÇÃO	Nº ENZIMAS LISTADAS NO NC-IUBMB*
OXIRREDUTASES	Catalisam reações de oxidação-redução, envolvendo oxigenação ou remoção de hidrogênio.	2058
TRANSFERASES	Mediam a transferência de grupos acil, açúcares, fosforil e aldeído ou porções de cetonas de uma molécula para outra.	1912
HIDROLASES	Promovem hidrólise e formação de ésteres, glicosídeos, amidas, éteres peptídeos e outros grupos que contenham C-N	1714
LIASES	Catalisam reações de adição, usualmente de HX, as duplas ligações como C=C, C=N e C=O, e também os processos reversos.	718
ISOMERASES	Efetuem várias isomerações, incluindo migração da ligação C-C, isomerização cis-trans e racemização.	290
LIGASES	Mediam a formação ou clivagem de C-O, C-S, C-N, C-C, e ligações ésteres fosfato, por meio de reações acopladas a quebra de ATP	204

Fonte: Adaptado de União Internacional de Bioquímica e Biología Molecular \*Atualização Dezembro -2016

As amilases são hidrolases, enzimas capazes de degradar especificamente as ligações glicosídicas do amido (amilose, amilopectina) e de seus produtos de degradação (maltodextrinas) até o estágio de oligossacarídeos. São amplamente distribuídas na natureza, onde participam em vários processos biológicos tais como a digestão de alimentos por animais e microrganismos, e na germinação e maturação de grãos. Na formulação de detergentes, são utilizadas para a remoção de resíduos insolúveis de alimentos ricos em amido, tornando-os solúveis e, portanto, facilmente removíveis (MITIDIÈRE, 2002).

As proteases são as enzimas mais utilizadas na indústria de detergentes para a remoção de resíduos protéicos ou proteínas, como sangue, manchas de ovo, suor humano, entre outros. Esse grupo inclui uma larga variedade de enzimas que clivam ligações peptídicas em substratos menores (peptídeos) ou maiores (proteínas), atuando na porção central dos substratos protéicos (endopeptidases) ou nas

porções externas (exopeptidases). O grupo mais comumente empregado na indústria de detergentes é o das endopeptidases de especificidade não restrita, as quais degradam substratos protéicos a peptídeos solúveis (MITIDIÈRE, 2002).

As lipases são hidrolases, enzimas que catalisam a quebra das ligações éster das gorduras sendo de grande importância industrial devido à hidrólise de óleos vegetais, como o azeite ou óleo de coco, para a produção de gordura, aminoácidos e glicerol, os quais encontram aplicações generalizadas, principalmente, em sabões e detergentes, cosméticos, produtos farmacêuticos, e alimentos. A flexibilidade aliada a diferentes possibilidades de especificidade de substratos existentes entre as diferentes lipases confere a estas enzimas um potencial enorme de aplicações (GANDHI, 1997). Segundo Hasan et al, (2006), o mais importante campo de atuação comercial de lipases é a indústria de detergente.

As reações catalisadas por enzimas são  $10^{12}$  a  $10^{17}$  vezes mais rápidas do que as reações correspondentes não catalisadas (SUAN; SARDIMI, 2004; CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004). Segundo Coelho, Salgado e Ribeiro (2008), para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores de natureza não proteica, chamadas de cofatores, que são divididos em: metais e coenzimas. As lipases, por exemplo, não requerem essas moléculas, uma das características que as tornam bastante atrativas (TORRES et al, 2006). Essa versatilidade faz destas enzimas, biocatalisadores potenciais devido a sua grande aplicabilidade em vários setores. O Quadro 2 mostra a possibilidade de uso das lipases em diferentes segmentos industriais.

Quadro 2 - Aplicações industriais das lipases

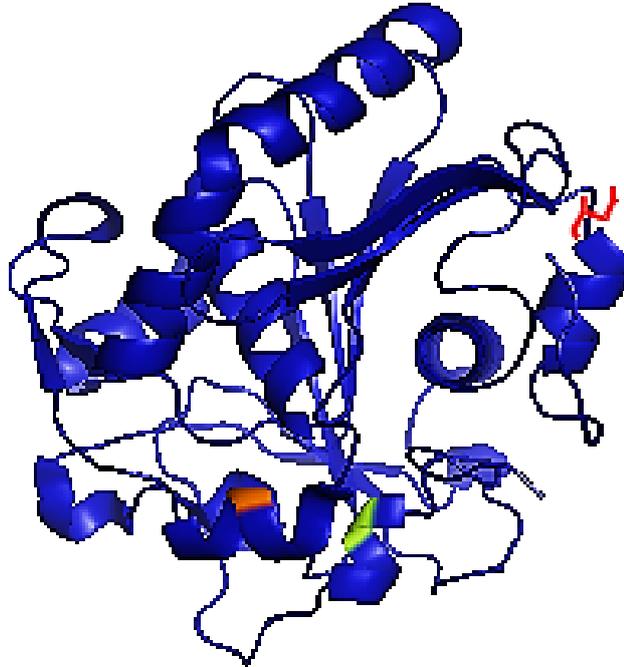
<b>Indústria</b>	<b>Aplicação</b>
Laticínio	Hidrólise de gordura do leite Aumento do aroma, da qualidade e da vida de prateleira Maturação de queijos e melhora do sabor
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração do processo fermentativo
Molhos e condimentos	Aumento das propriedades funcionais da gema de ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução no conteúdo de gorduras Desengorduramento de ossos para produção de gelatina
Processamento de derivados de ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos, introdução de ácidos graxos de interesse em óleos e gorduras naturais Hidrólise de óleos para manufatura de sabão
Química fina	Sínteses de ésteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares de digestão Síntese de trigliceróis específicos
Cosméticos	Remoção de lipídeos
Medica	Determinação de lipídeo no sangue (biossensores)
Couro	Remoção da gordura da matéria-prima
Tratamento de resíduo	Decomposição de lipídeos em efluentes

Fonte: Adaptado de (CASTRO,1995; BON 1999; GANDHI,1997)

Na maioria destas enzimas o sítio ativo é formado pela tríade catalítica serina-histidina- ácido aspártico/glutâmico, que se repete em todas as estruturas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004). O sítio ativo das lipases é cercado por áreas hidrofóbicas. Em meios aquosos homogêneos, a lipase apresenta uma estrutura em que o sítio ativo está totalmente isolado do meio reacional por uma cadeia polipeptídica, a “tampa”, a qual impede o acesso do substrato ao sítio ativo. A tampa possui resíduos hidrofóbicos em sua face interna, os quais interagem com as regiões hidrofóbicas em torno do sítio ativo quando a enzima está na conformação fechada, inativa. Por outro lado, quando a enzima está na presença de interfaces hidrofóbicas predomina uma conformação totalmente distinta. A tampa se desloca, interagindo por meio de ligações salinas, ligações de hidrogênio, entre outras, com outra região da superfície da lipase, deixando o sítio ativo da enzima livre e acessível a seus substratos, originando a conformação aberta (ativa) da enzima ocorrendo desta forma a “ativação interfacial” (PALOMO et al, 2004). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é extensamente estudada e sua estrutura é bem conhecida (BRZOZOWSKI et al., 2000;

FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Esta enzima possui em torno de 30 kDa, sendo mono-glicosilada (com resíduos de N-acetilglicosamina, galactose e/ou manose no resíduo de asparagina - N33) (Figura 1), o que adiciona aproximadamente 2 kDa à massa molecular da enzima nativa (BOEL et al., 1998; PINHOLT et al., 2010).

Figura 1 - Estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus*



Fonte: Adaptado de (BRZOZOWSKI et al., 2000)  
O código de acesso no Protein Data Bank (PDB) 1DT3. Distribuição de resíduos de Asparagina (Asn33) mostrado em vermelho, Histidina (His258) mostrado em verde e Tripsina (Trp89) mostrado em laranja na superfície de *Thermomyces lanuginosus*.

Na presença de uma interface hidrofóbica, as lipases sofrem a ativação interfacial, ocorrendo a fixação da conformação aberta sobre esta interface, possibilitada pelo deslocamento da tampa. As lipases podem, portanto, atuar em interfaces ou em superfícies hidrofóbicas. Como os substratos naturais das lipases são os óleos e gorduras, a atividade em interface é um requerimento importante para a função biológica destas enzimas (MILED et al, 2001; PALOMO et al, 2004).

### 1.3.3 Lipases em detergentes enzimáticos

O primeiro detergente contendo enzimas foi introduzido no mercado em 1913, na Alemanha, constituído de tripsina de pâncreas de porco. No entanto, apenas em 1963 a comercialização desses produtos passou a ser significativa, com o desenvolvimento, pela empresa Novozymes, de um detergente enzimático à base de protease bacteriana. Inicialmente, estes detergentes eram considerados úteis apenas para limpeza de roupas sujas de sangue de hospitais e abatedouros. A partir de 1980, amilases, celulasas e lipases começaram a ser utilizadas como componentes da formulação de detergentes (FERREIRA, 2007).

Segundo Castro et al (2004), a enzima lipase que já está estabelecida no mercado de produção de detergentes é a Lipolase®, empregada na formulação de um grande número de marcas importantes de detergentes em todo mundo, desde 1988; sendo a mais difundida e utilizada em detergentes (JURADO et al, 2007). A lipase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (TLL) é responsável pela atividade lipolítica da Lipolase®. A Lipolase® é uma preparação solúvel de lipase (TLL), produzida (“em grande escala”) por uma cepa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificada. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; GILLIS, 1988; SHINTRE, GHADGE, SAWANT, 2002). Outros exemplos de comerciais obtidas através de engenharia de proteínas são a Lumafast® (Genencor, USA) e a Lipomax® (Gist-Brocades, Holanda), lipases bacterianas provenientes de *Pseudomonas mendocina* e *P. alcaligenes* (JAEGER; REETZ, 1998).

Esta tecnologia permite a modificação genética de microrganismos para produzir a enzima desejada em condições específicas. Isso ajuda a produzir um determinado tipo de enzima ou a aumentar a quantidade de enzima produzida a partir do único microrganismo recombinante (HASAN et al, 2010). Teoricamente é possível expressar qualquer enzima de interesse, codificadas por genes de origem animal, vegetal ou de microrganismos, em microrganismos hospedeiros bem adaptados à fermentação em larga escala (BOM et al, 2008). É de especial importância a expressão heteróloga nas bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *B. licheniformes*, nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha* e nos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISEN, 2000; ADRIO; DEMAIN, 2003; OLEMPSKA-BEER et al.,2006).

As principais características necessárias para o emprego de lipases como componente funcional na formulação de detergentes são a estabilidade nas condições de lavagem (pH entre 10 e 11 e temperatura entre 30 e 60°C), a resistência aos componentes da formulação como surfactantes e protease (Quadro 1) e a baixa especificidade pelo substrato, isto é, a capacidade de catalisar a hidrólise de óleos e/ou gorduras de composições distintas. Enzimas que tem estas características são obtidas através de uma combinação de lipases de diferentes fontes (CARDENAS et al, 2001) e da aplicação da engenharia de proteínas (KZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; AKOH et al, 2004; JURADO et al, 2007).

Quadro 3 - Composição de Detergentes enzimáticos

<b>Constituinte</b>	<b>Composição (%)</b>
Tripolifosfato de sódio	38
Dodecilbenzeno sulfonato de sódio (surfactante) (catiônico/aniônico /não iônico /anfotérico)	25
Perborato de sódio tetra-hidratado (agente oxidante)	25
Sabão (carboxilatos de alcano de sódio)	3,0
Sulfato de sódio (enchimento, amaciador de água)	2,5
Carboximetilcelulose de sódio/poliacrilato de sódio/polietilenoglicol (agente de suspensão de sujeira / (agentes antiredeposição)	1,6
Metassilicato de sódio	1,0
<i>Bacillus</i> protease (3% ativo) e outras enzimas	0,8
Clarificadores fluorescentes	0,3
Agentes de controle de espuma	Traços
Perfume	Traços
Água	100%

Fonte: Adaptado de (HASAN, 2010)

Há uma tendência de utilizar baixas temperaturas nos processos de lavagem por razões ambientais e econômicas, situações estas que tornam indispensáveis o uso de enzimas em produtos detergentes. As lipases são excelentes catalisadoras em soluções e em interface água-óleo e são potencialmente apropriadas para aplicação na remoção de manchas de gorduras em lavanderia industrial e detergentes domésticos (PRAZERES; CRUZ; PASTORE, 2006).

A aplicação de lipases na indústria de detergentes é bastante difundida, sendo utilizada como aditivos nas formulações de detergente reduzindo o tempo e a temperatura da lavagem dos tecidos. Como resultado ocorre um processo de menor gasto de energia (GANDHI, 1997; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), facilitando os

processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água (PANDEY, 2003). Sua capacidade de catalisar estas reações com elevada eficiência e estabilidade tornam estas enzimas muito atraentes e versáteis para as indústrias (BON et al, 2008). E ainda, a sua vantagem nos detergentes em substituição aos polissulfatos está na biodegradabilidade e redução dos impactos ambientais, incluindo-se a vida aquática (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases encontram-se amplamente distribuídas na natureza e apresentam ampla faixa de atuação em pH, variando entre 3,0 a 11,0 (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Podem apresentar massa molecular entre 20-75 KDa e faixa ótima de temperatura entre 30°C e 40°C, entretanto, algumas lipases tem mostrado níveis de estabilidade consideráveis mesmo em temperaturas extremas, como 5°C e 70°C. Sua termoestabilidade pode variar consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as de melhor estabilidade (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004), propriedade que é frequentemente associada à estabilidade em solventes e detergentes, conferindo a estas enzimas um potencial considerável para muitas aplicações biotecnológicas e industriais (COOLBEAR; DANIEL; MORGAB, 1992; HAKI; RAKSHIT, 2003)

Como as enzimas possuem ação direta sobre determinada substância, são consideradas substâncias ativas em uma formulação (MITIDIERI et al, 2002).

No Brasil atualmente, existem métodos analíticos para determinação da concentração da atividade proteolítica e amilolítica em detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS (BRASIL, 2012b). Entretanto, não há metodologia analítica para determinação da concentração da atividade da lipase impossibilitando o controle da qualidade desta enzima nos detergentes.

#### 1.4 REGULAÇÃO SANITÁRIA DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS

De acordo com a RDC nº 59 de 2010 (BRASIL, 2010), os produtos saneantes são definidos como: “substância ou preparação destinada à aplicação em objetos, tecidos, superfícies inanimadas e ambientes, com finalidade de limpeza e afins, 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, destinados à comercialização direta ao público ou de uso profissional, ou seja, aqueles que não podem ser vendidos diretamente ao

público e devem ser aplicados ou manipulados exclusivamente por profissional devidamente treinado ou por empresa especializada.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) atua no registro e notificação desses produtos, antes de sua comercialização, observando e controlando critérios de qualidade para garantir sua eficácia e segurança. Além de elaborar normas e padrões, atua apoiando a organização de informações sobre a ocorrência de problemas de saúde causados por esse tipo de produto. Atua no controle e avaliação de riscos, acompanha o desenvolvimento técnico-científico de substâncias e, quando necessário, adota medidas corretivas para eliminar, evitar ou minimizar os perigos relacionados aos saneantes (BRASIL, 1999).

Para efeito de notificação/registro, os produtos são classificados como de Risco I e Risco II.

Os produtos de Risco I são considerados de menor risco, compreendem os produtos saneantes que não apresentem características de corrosividade, atividade microbiana, ação desinfetante e não sejam a base de microrganismos viáveis, e cujo valor de pH, na forma pura à temperatura de 25°C, seja maior que 2 e ou menor que 11,5. Esses produtos somente podem ser comercializados após a notificação realizada por meio do peticionamento totalmente eletrônico e divulgada na página da Anvisa.

Os de Risco II são considerados de maior risco, compreendem os produtos saneantes que apresentem características de corrosividade, atividade antimicrobiana, ação desinfetante ou que sejam à base de microrganismos viáveis, e cujo valor de pH, na forma pura à temperatura de 25°C, seja igual ou menor que 2 ou igual ou maior que 11,5. Esses produtos podem ser comercializados após a concessão do registro publicada em Diário Oficial da União (BRASIL, 2010).

Em 2012, foi aprovado o regulamento que estabelece os requisitos mínimos para detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS, com indicação para limpeza de dispositivos médicos a RDC Nº 55. Por este regulamento, os detergentes enzimáticos são considerados de risco II e estão sujeitos ao registro na Anvisa. Uma das exigências para o registro é a apresentação do laudo de atividade enzimática, compreendendo a determinação da atividade proteolítica e atividade amilolítica, quando esta estiver declarada. A falta da metodologia para determinação da atividade da lipase impossibilitou que a exigência para esta enzima fosse incluída nesta Resolução. Entretanto, a maioria dos detergentes enzimáticos registrados na

Anvisa possuem na sua formulação as três enzimas: protease, amilase e lipase (BRASIL, 2012).

Antes da publicação da RDC N°55/2012 os detergentes enzimáticos eram considerados de risco I, sendo submetidos somente à notificação para comercialização. Após a publicação da RDC, esses detergentes ficaram disponibilizados no mercado até a data de validade do mesmo.

Os detergentes enzimáticos notificados à época somavam um total de 248 produtos. Atualmente existem 92 detergentes enzimáticos, registrados com comprovação da atividade das enzimas proteolíticas e amilolíticas (ANVISA, 2017). Este fato demonstra a importância de se ter um controle para comercialização destes tipos de produtos de uso hospitalar.

## 1.5 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE

Vários métodos têm sido descritos para detectar e quantificar a concentração da atividade lipolítica em outras matrizes, como o leite (BENDICHO et al, 2001; HUMBERT; GUINGAMP; LINDEN, 1997). A atividade da concentração da lipase tem sido determinada através da quantificação dos ácidos graxos liberados durante a hidrólise mediada pela enzima. Estes produtos podem ser determinados por métodos físico-químicos avaliando-se o desaparecimento do substrato ou a formação dos produtos da reação. Dentre os métodos que avaliam o desaparecimento do substrato podem ser citados a nefelometria e turbidimetria, tensiometria interfacial, microscopia de força atômica e espectroscopia de infravermelho. Os principais métodos que avaliam o aparecimento dos produtos da reação de hidrólise compreendem ensaios indiretos da liberação de prótons (indicadores coloridos e titulometria), análise de ácidos graxos liberados a partir de ésteres carboxílicos derivados do glicerol (ensaios colorimétricos, fluorimétricos, cromatográficos, microscopia eletrônica por detecção “in situ”) e análise de ácidos graxos liberados a partir de ésteres carboxílicos sintéticos (ensaios radioativos, colorimétricos, fluorimétricos) e métodos imunológicos, entre outros (BEISSON et al, 2000; GUPTA et al, 2003; HASAN, SHAH, HAMEED, 2009).

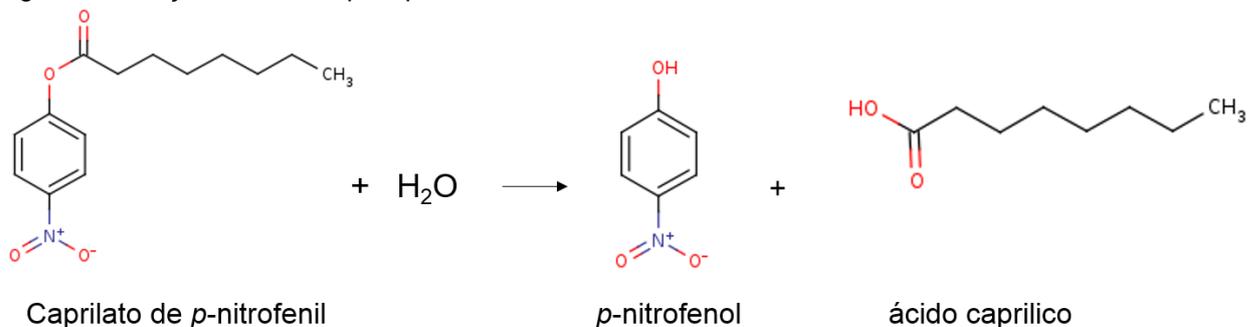
Os mais simples e acessíveis utilizam reações colorimétricas, que são detectadas e quantificadas por espectrofotometria (BENDICHO et al, 2001). A espectrofotometria tem ampla aplicação em laboratórios de análises e pesquisas

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 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 reação 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).

Devido à relativa facilidade de manuseio e à baixa suscetibilidade a interferências, ensaios espectrofotométricos são aplicados para observar as reações enzimáticas. Estes ensaios permitem o seguimento contínuo, dependente do tempo da reação enzimática, importante para a determinação da velocidade da reação e para a avaliação da atividade da enzima (HANS; 2014)

Um das técnicas que podem ser utilizadas na determinação da concentração da atividade enzimática da lipase em detergentes enzimáticos, é a técnica espectrofotométrica com leitor de microplacas, onde a concentração é avaliada através da reação de hidrólise catalisada pela lipase utilizando-se por exemplo o *caprilato de p-nitrofenil* como substrato. Ocorre a formação do produto cromóforo *p*-nitrofenol que absorve luz em um comprimento de onda em torno de 410 nm, permitindo acompanhar quantitativamente a sua aparição no transcurso da reação enzimática, como é demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Reação catalisada por lipase



Fonte: Adaptado de (BRENDA, 2017)

Segundo a Enzyme Commission, uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato ou a formação de 1 micromol de produto por minuto, nas condições de ensaio estabelecidas (temperatura, pH, concentração de substrato). As unidades enzimáticas servem para quantificar a quantidade de uma enzima; a quantidade da enzima não é definida pela sua massa (proteína) e sim pelo seu funcionamento. Isto é razoável, porque o potencial catalítico é a característica essencial da enzima (HANS, 2014). Em muitas situações emprega-se a atividade específica, que é expressa em unidades (U) por massa de proteína ( $U \cdot mg^{-1}$ ) (LIMA et al, 2001). Em outros casos emprega-se a concentração da atividade enzimática, que é expressa em unidades (U) por mililitro de amostra ( $U \cdot mL^{-1}$ ).

Para garantir informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra de um determinado detergente, o método analítico deve ser submetido a ensaios de validação para comprovar, através de evidências objetivas, que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos

## 1.6 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2016).

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, documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 (Revisão 01, 02, 03, 04 e atualmente a última edição nº 05) de agosto de 2016, sendo necessária a validação de um método para: métodos não normalizados; métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; ampliações e modificações de métodos normalizados (INMETRO, 2016).

A validação de metodologias é um processo complexo que envolve diversos parâmetros e avaliações (Quadro 3). Segundo os parâmetros de validação recomendados pela Anvisa, a Categoria I compreende os testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias - primas; a Categoria II refere-se aos testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação

de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas; a Categoria III são testes de performance; e a Categoria IV são testes de identificação.

Quadro 4 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa

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

A – Ensaio quantitativo

B – Ensaio limite

\*dependendo da natureza do ensaio específico pode ser necessário

\*\*se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2003)

Alguns desses parâmetros foram contemplados neste trabalho:

- *Especificidade e seletividade*: é a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição (INMETRO, 2016). Em métodos espectrofotométricos, a especificidade pode ser determinada comparando resultados de detecção (espectrograma de varredura) obtidos em amostras, matriz sem analito, padrões e reagentes em branco.

- *Faixa de trabalho*: 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 que deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. 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, 2016). Para tanto pode ser utilizada a curva de Ringbom que 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 (LOPES, 2012; RINGBOM, 1939).

- *Linearidade*: é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A linearidade de um método não pode ser observada apenas por meio do gráfico dos resultados dos ensaios de resposta em função da concentração do analito. Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores aberrantes (em inglês, *outliers*) para cada nível de concentração e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados. A verificação da ausência de valores aberrantes pode ser feita pelo teste de Grubbs ou com base nos resíduos padronizados Jackknife (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005) e a homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos pelos testes de Cochran, de Levene (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005) ou de Brown-Forsythe (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Deve ser calculado os coeficientes do modelo da regressão linear simples, os resíduos (resíduo é a diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de x) e o coeficiente de correlação linear (r). Esse último é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo. Desse modo, devem ser avaliados os resíduos para verificar essa adequação. Deve-se também avaliar a linearidade por meio do teste F (também conhecido como F-Snedecor) na análise da variância (ANOVA) da regressão (INMETRO, 2016).

- *Precisão*: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão abrange:

*Repetibilidade (precisão intra-corrida)*: concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

Pode-se determinar a repetibilidade determinando-se o coeficiente de variação (CV) conforme a Equação 1.

$$CV_{repe}(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:  $s$  = desvio padrão

$\bar{x}$  = concentração média determinada

Considerando que o contínuo crescimento da utilização de detergentes enzimáticos no ambiente hospitalar é uma realidade brasileira, e ainda que o controle da qualidade dos produtos enzimáticos é necessário, estudos sobre este tema são fundamentais para garantir a eficácia desses produtos. A avaliação laboratorial possui papel relevante no suporte às ações de vigilância e garante à população um produto com uma melhor qualidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar métodos analíticos espectrofotométricos visando propor uma metodologia analítica para o controle da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar parâmetros experimentais em métodos espectrofotométricos para determinação da concentração da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos;
- ✓ Avaliar alguns parâmetros de validação como especificidade, linearidade da curva analítica, precisão (repetibilidade) da metodologia proposta de acordo com os critérios e normas sobre validação analítica da Anvisa e do Inmetro.
- ✓ Utilizar o método para determinar a concentração da atividade enzimática em detergente enzimático de uso restrito em EAS.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 AMOSTRAS DE TRABALHO

##### 3.1.1 Amostra de trabalho

Como amostra de trabalho foi utilizada uma base detergente enriquecida com Lipolase®, fornecida pela empresa 3M do Brasil.

##### 3.1.1.1 Amostra de detergente enzimático de uso hospitalar

Amostras comerciais de detergente enzimático de uso hospitalar que foram codificadas como AM1 e AM2. Os componentes descritos no rótulo da amostra AM1 são:

Água deionizada, Álcool isopropilico, Propilenoglicol Emulsão de polidimetilsiloxano, Enzima lipolítica (lipase), enzima amilolítica (carboidrase, alfa-amilase, celulose), enzimas proteolíticas (protease, peptidase), Derivado de isotiazolina, nonilfenol 9,5 E.O., nonifenol 7 E.O., formiato de sódio, cloreto de cálcio, amida de trietanolamina 85%, corantes: CI42090, CI19140. A composição descrita no rótulo da amostra AM2 é: enzimas lipase, protease, amilase e liquanase; acidificante, neutralizante, corretor de pH, estabilizante, tensoativo não iônico, solvente e água purificada.

#### 3.2 REAGENTES

Foram utilizados como substratos o caprilato de *p*-nitrofenil (SIGMA - ALDRICH), palmitato de *p*-nitrofenil (SIGMA - ALDRICH), valerato de *p*-nitrofenil (SIGMA - ALDRICH). As soluções de inibição foram: etanol P. A. (MERCK), ácido etilenodiamino tetra-acético (SIGMA - ALDRICH) e fluoreto de fenilmetanosulfonila (SIGMA - ALDRICH). A solução padrão de *p*-nitrofenol (SIGMA - ALDRICH).

Foi empregada a Lipolase® (NOVOZYMES), lipase de *Thermomyces lanuginosus* em solução fornecido pela empresa 3M do Brasil.

### 3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA ESTUDADAS

Os métodos espectrofotométricos estudados baseiam-se na hidrólise de substratos sintéticos. Nesse trabalho foram utilizados ésteres de *p*-nitrofenila, como o palmitato de *p*-nitrofenil, caprilato de *p*-nitrofenil e valerato de *p*-nitrofenil (PRAZERES, 2006; BENDICHO, 2001).

No método I foi utilizado o palmitato de *p*-nitrofenil como substrato baseado na metodologia descrita por Prazeres (2006) onde a reação é interrompida com a adição de etanol 96% e o *p*-nitrofenol liberado monitorizado espectrofotometricamente a 420 nm.

O método II é baseado no método C, com algumas modificações, descrita por Bendicho (2001) que otimizou e validou três métodos para determinação da atividade lipolítica em leite onde a concentração da atividade lipolítica é determinada pela quantificação do *p*-nitrofenol a 412 nm, liberado pela reação de hidrólise do substrato caprilato de *p*-nitrofenil. A solução de inibição é uma mistura de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) na proporção 3:1. No presente estudo, foram testados dois substratos: o caprilato de *p*-nitrofenil e o valerato de *p*-nitrofenil diluídos em dimetilsulfóxido.

O método III é também baseada no método C descrita por Bendicho (2001), com algumas modificações e adaptação a microplacas. A determinação da concentração da atividade lipolítica é feita pela quantificação do *p*-nitrofenol a 400 nm, liberado pela reação de hidrólise do substrato caprilato de *p*-nitrofenil. Por ser um método enzimático contínuo não requer a utilização da solução de inibição.

Para os métodos II e III foram determinadas curvas analíticas de *p*-nitrofenol. Para isso foi determinado o comprimento de onda de trabalho de máxima absorção e a melhor faixa linear de trabalho.

Alguns parâmetros de validação foram avaliados para o método III: especificidade, linearidade da curva analítica e precisão (repetibilidade).

#### 3.3.1 Método I

Em um microtubo foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,04 M (pH 8,0), 100  $\mu$ L de substrato palmitato de *p*-nitrofenil 0,02 M. A solução de palmitato de *p*-nitrofenil 0,02 M foi preparada dissolvendo 0,755 g de palmitato de *p*-nitrofenil em

isopropanol P.A. no balão volumétrico de 100 mL. A solução foi mantida ao abrigo da luz. Este microtubo foi incubado em banho-termostático a 40°C até atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos). Foram adicionados 100 µL da amostra de trabalho, em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições, e incubados por 15 minutos em banho-termostático a 40°C. Para interromper a reação foi adicionando 800 µL de etanol a 96%, observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos), sendo o tempo de reação (15 minutos) o mesmo em todos os microtubos. Em seguida, a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-VIS Hitachi U2900 a 420 nm e utilizou-se o sistema tamponante Tris-HCl para zerar o equipamento.

Foi preparado um branco para cada amostra adicionando 200 µL de tampão Tris-HCl 0,04 M (pH 8,0), 100 µL do substrato, 800 µL de etanol a 96% e 100 µL da amostra de trabalho no microtubo. A seguir cada branco foi incubado por 15 minutos em banho-termostático a 40°C.

A amostra de trabalho foi preparada a partir de diluições de 100.000 vezes de uma solução concentrada de Lipolase®.

#### 3.3.1.1 Alterações realizadas na preparação do substrato

O tampão tris-HCl 0,04 M (pH:8,0) foi substituído por tris-HCl 0,05 M (pH:8,0);

O preparo do substrato foi realizado a partir de duas soluções:

Solução I – 3mg/mL palmitato de *p*-nitrofenil em isopropanol: dissolvendo 30 mg de palmitato de *p*-nitrofenil em 10 mL de isopropanol.

Solução II – Em um becker de 500 mL foi pesado 2 g de Triton X-100, e adicionado 0,5 g de goma arábica e 450 mL de tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,0.

No preparo da emulsão contendo o substrato, foi gotejado vagarosamente a solução I na solução II sob forte agitação na proporção de 1:9. Ambas as soluções foram previamente equilibradas a 40°C.

Em um microtubo foram adicionados 900 µL de emulsão contendo o substrato palmitato de *p*-nitrofenil 0,02 M. O microtubo foi incubado em banho-termostático a 40°C até atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos). Foram adicionados 100 µL da amostra de trabalho, à temperatura ambiente, nos microtubos, em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições, e incubados por 15 minutos em banho-termostático a 40°C, com volume final de 1000 µL. A reação foi interrompida adicionando-se 800 µL de etanol

a 96% observando-se os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) com o tempo total de reação de 15 minutos para todos os microtubos. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-VIS Hitachi U2900 a 400 nm, utilizando-se o sistema tamponante Tris-HCl para zerar o equipamento.

Foi preparado um branco para cada amostra adicionando-se 900 µL de emulsão contendo o substrato palmitato de *p*-nitrofenil 0,02 M, 800 µL de etanol 96% e 100 µL da amostra de trabalho. A seguir cada branco foi incubado por 15 minutos em banho-termostático a 40°C.

A solução amostra de trabalho foi preparada com diluição de 100.000 vezes de uma solução concentrada de Lipolase®.

### 3.3.2 Método II

Para este ensaio analítico foram utilizados dois substratos o caprilato de *p*-nitrofenil (0,005 M) e o valerato de *p*-nitrofenil (0,005 M) diluídos em dimetilsulfóxido.

Em um microtubo foram adicionados 1000 µL de tampão tris-HCl 0,2 M e 50 µL do substrato. Incubou-se em banho-termostático a 37°C até atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos). Foram adicionados 100 µL da solução amostra de trabalho, à temperatura ambiente nos microtubos, em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições, e incubados no banho por 15 minutos na mesma temperatura. A reação foi interrompida adicionando-se 400 µL da solução de inibição (EDTA/PMSF) observando-se os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) com o tempo total de reação de 15 minutos para todos os microtubos. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-VIS Hitachi U2900 a 412 nm, utilizando-se o sistema tamponante para zerar o equipamento.

Foi preparado um branco para cada replicata, adicionando-se 1000 µL de tampão Tris-HCl 0,2 M, 50 µL do substrato, 400 µL da solução de inibição e 100 µL da amostra de trabalho. A leitura foi realizada no comprimento de onda do ensaio.

A amostra de trabalho foi preparada com uma diluição de 100.000 vezes de uma solução concentrada de Lipolase®.

### 3.3.2.1 Avaliação do branco da amostra

Para avaliar o branco do ensaio, foram preparados, em triplicata, três diferentes brancos do ensaio. O Branco 1 com solução tampão Tris-HCl, substrato, solução de inibição (EDTA/PMSF) e por último a adição da amostra de trabalho; esse branco serve para avaliar se a solução de inibição é eficaz. Para o Branco 2, foi adicionado tampão Tris-HCl, substrato e solução de inibição (EDTA/PMSF). Já o Branco 3 foi preparado com a adição de tampão Tris-HCl, solução de inibição (EDTA/PMSF), amostra de trabalho, sem adição do substrato. O equipamento foi zerado com o sistema tamponante Tris-HCl 0,2 M pH 8,0.

### 3.3.2.2 Curva analítica

Foram tomadas alíquotas de 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120 e 140  $\mu\text{L}$  da solução padrão de *p*-nitrofenol com concentração de  $0,7180 \mu\text{mol.mL}^{-1}$  e foram adicionadas alíquotas de 600; 580; 560; 540; 520; 500; 480 e 460  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,04 M (pH 8,0). Os microtubos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Após a incubação foram adicionados 1400  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,04 M (pH 8,0). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS Hitachi U2900 no comprimento de onda a 412 nm. As medidas das absorbâncias obtidas através das análises foram utilizadas para a construção da curva analítica. Utilizou-se o primeiro ponto para zerar o equipamento. Na Tabela 1 estão descritas as concentrações dos 7 níveis da curva analítica de *p*-nitrofenol.

Tabela 1 - Concentrações dos 7 níveis da curva analítica de *p*-nitrofenol – Método II

Solução de <i>p</i> -nitrofenol	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6	Nível 7
Concentração ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )	0,007180	0,01436	0,02154	0,02872	0,03590	0,04308	0,05026

### 3.3.2.3 Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção

Foi realizada uma análise de varredura entre 300 a 550 nm de espectros de absorção molecular com o ponto central da curva analítica de *p*-nitrofenol ( $0,02872 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ )

### 3.3.2.4 Avaliação da faixa linear da curva analítica - Curva de Ringbom

Foi construída uma curva de Ringbom com 50 pontos. A partir de uma solução diluída 10 vezes da solução estoque de *p*-nitrofenol, foram preparados os 10 primeiros pontos. Os demais pontos foram realizados a partir da solução estoque conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método II para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

Microtubo N°	Volume da solução de <i>p</i> -nitrofenol (0,07180 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )	Volume de tampão ( $\mu\text{L}$ )	Conc. final de <i>p</i> -nitrofenol ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )
0	0	600	0
1	10	590	0,000359
2	20	580	0,000718
3	30	570	0,001077
4	40	560	0,001436
5	50	550	0,001795
6	60	540	0,002154
7	70	530	0,02513
8	80	520	0,002872
9	90	510	0,003231
10	100	500	0,00359

Tabela 2 - Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método II para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos (continuação)

Microtubo N°	Volume da solução de <i>p</i> -nitrofenol (0,7180 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )	Volume de tampão ( $\mu\text{L}$ )	Conc. final de <i>p</i> -nitrofenol ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )
11	20	580	0,00718
12	40	560	0,01436
13	60	540	0,02154
14	80	520	0,02872
15	100	500	0,0359
16	120	480	0,04308
17	140	460	0,05026
18	160	440	0,05744
19	180	420	0,06462
20	200	400	0,0718
21	220	380	0,07898
22	240	360	0,08616
23	260	340	0,09334
24	280	320	0,10052
25	300	300	0,1077
26	320	280	0,1149
27	340	260	0,1221
28	360	240	0,1292
29	380	220	0,1364
30	400	200	0,1436
31	420	180	0,1508
32	440	160	0,158
33	460	140	0,1651
34	480	120	0,1723
35	500	100	0,1795
36	520	80	0,1867
37	540	60	0,1939
38	560	40	0,201
39	580	20	0,2082
40	600	0	0,2154
41	640	0	0,2298
42	680	0	0,2441
43	720	0	0,2585
44	760	0	0,2728
45	800	0	0,2872
46	840	0	0,3016
47	880	0	0,3159
48	920	0	0,3303
49	960	0	0,3446
50	100	0	0,359

### 3.3.2.5 Ensaios com a amostra de trabalho

Realizou-se ensaios com a amostra de trabalho como descrito no item 3.3.2.

### 3.3.3 Determinação da concentração da atividade lipolítica para o Método I e Método II

A concentração da atividade lipolítica para o Método I e Método II foi determinada através do cálculo da concentração na curva analítica ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) do *p*-nitrofenol realizado através da Equação 2:

$$x = \frac{y - b}{a} \Rightarrow C = \frac{(A_a - A_b) - b}{a} \quad (2)$$

Onde:

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

A<sub>a</sub> = absorvância da amostra

A<sub>b</sub> = absorvância do branco da amostra

b = coeficiente linear (interseção da curva analítica)

a = coeficiente angular (inclinação da curva analítica)

No caso em que a leitura do branco da amostra (sem substrato) foi negativa, o cálculo foi desconsiderado.

O cálculo da concentração de atividade lipolítica ( $\text{UL.mL}^{-1}$ ) na Equação 4 foi deduzida a partir da Equação 3:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \therefore \frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol}}{0,1\text{mL}} \therefore \frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \times \frac{1}{0,1\text{mL}} \therefore \frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol} \times 10}{15\text{min}} \therefore \frac{U}{\text{mL}} = \frac{C \times 10}{15} \quad (3)$$

$$\text{UL} / \text{mL} = \frac{C \times 10}{15} \times Fd \quad (4)$$

Onde:

C = concentração ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ), determinada através da curva analítica do *p*-nitrofenol.

$F_d$  = fator de diluição da amostra, quando houver.

Uma unidade de atividade lipolítica (UL) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol a 420 ou 412 nm em uma cubeta de 1cm de caminho óptico por minuto, conforme condições descritas acima.

### 3.3.4 Método III (em microplacas)

Em microplaca de 96 poços foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de substrato, 170  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5. A microplaca foi incubada para ambientação a 37°C até atingir o equilíbrio térmico (1 a 2 minutos). Imediatamente foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da amostra e iniciada a análise no espectrofotômetro de microplacas VersaMax™. A absorbância foi medida a 400 nm, em modo cinético por um intervalo de tempo de 5 minutos, sendo a leitura realizada a cada 1 minuto.

Foi preparado o branco do ensaio, substituindo-se a amostra pelo tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,5. As absorbâncias do ensaio em branco foram descontadas dos valores obtidos para as amostras.

A amostra de trabalho foi preparada a partir de diluições de 100000 vezes de uma solução concentrada de Lipolase®.

Para o cálculo da concentração de atividade lipolítica, primeiramente, foram empregados os valores de absorbância acompanhada em intervalos de tempos, ao longo da reação. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração na curva analítica de *p*-nitrofenol ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ), realizado através da Equação 5:

$$x = \frac{y - b}{a} \Rightarrow C = \frac{(A_a - A_b) - b}{a} \quad (5)$$

Onde:

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

$A_a$  = absorbância da amostra

$A_b$  = absorbância do branco da amostra

$b$  = coeficiente linear (interseção da curva analítica)

$a$  = coeficiente angular (inclinação da curva analítica)

Foi construído um gráfico de concentração de *p*-nitrofenol *versus* o tempo. A inclinação da reta obtida gerou um coeficiente angular, que corresponde a velocidade da reação e é diretamente convertida em unidades de atividade enzimática.

A concentração de atividade lipolítica (UL.mL<sup>-1</sup>) na amostra foi determinada levando-se em consideração o volume da amostra utilizado e o volume da diluição caso fosse necessário.

Uma unidade de atividade lipolítica (UL) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol a 400 nm por minuto, conforme condições descritas acima.

#### 3.3.4.1 Curva analítica 1

Foram transferidos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 μL da solução padrão de *p*-nitrofenol 0,07180 μmol.mL<sup>-1</sup> aos poços da microplaca e adicionados respectivamente 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240 e 230 μL de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,5. A microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos no espectrômetro de microplaca VersaMax™. A leitura das amostras foi realizada em modo Endpoint a 400 nm. A absorbância do ponto 0, contendo somente tampão Tris-HCl 0,2 M, foi utilizada para descontar das leituras finais dos outros pontos. Na Tabela 3 estão descritas as concentrações dos 7 níveis da curva analítica de *p*-nitrofenol.

Tabela 3 - Concentrações dos 7 níveis da curva analítica de *p*-nitrofenol – Método III para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

Solução de <i>p</i> -nitrofenol	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6	Nível 7
Concentração (μmol.mL <sup>-1</sup> )	0,0239	0,0479	0,0718	0,0958	0,1197	0,1436	0,1675

#### 3.3.4.2 Curva analítica 2

Foram transferidos 0, 25, 60, 95, 130, 165, 200 e 235 μL da solução padrão de *p*-nitrofenol (0,07180 μmol.mL<sup>-1</sup>) aos poços com capacidade de 300 μL e adicionados respectivamente 300, 275, 240, 205, 170, 135, 100 e 65 μL de tampão

Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5. A microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos no espectrômetro de microplaca VersaMax™. As leituras das amostras foram realizadas em modo Endpoint a 400 nm. A absorbância do ponto 0, contendo somente tampão Tris-HCl 0,2 M, foi utilizada para descontar das leituras finais dos outros pontos. Na Tabela 4 estão descritas as concentrações dos 7 níveis da curva analítica de *p*-nitrofenol.

Tabela 4 - Concentrações dos 7 níveis da curva analítica 2 de *p*-nitrofenol – Método III para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

<b>Solução de <i>p</i>-nitrofenol</b>	<b>Nível 1</b>	<b>Nível 2</b>	<b>Nível 3</b>	<b>Nível 4</b>	<b>Nível 5</b>	<b>Nível 6</b>	<b>Nível 7</b>
<b>Concentração (<math>\mu\text{mol.mL}^{-1}</math>)</b>	0,0060	0,0144	0,0227	0,0311	0,0395	0,0479	0,0562

#### 3.3.4.3 Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção

Foi realizada uma análise de varredura entre 300 a 550 nm de espectros de absorção molecular com o ponto central da curva analítica de *p*-nitrofenol (0,0958  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )

#### 3.3.4.4 Avaliação da faixa linear da curva analítica – Curva de Ringbom

Foi construída uma curva de Ringbom a partir de uma solução diluída 10 vezes da solução estoque de *p*-nitrofenol (0,07180  $\mu\text{mol}$ ). Foram transferidas alíquotas em 45 pontos de concentrações crescentes, conforme a Tabela 5

Tabela 5 - Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método III para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

Poço N°	Volume da solução de p-nitrofenol (0,07180 µmol)	Volume de tampão (µL)	Conc. final de p-nitrofenol (µmol.mL-1)
0	0	300	0
1	15	285	0,0036
2	20	280	0,0048
3	25	275	0,0060
4	30	270	0,0072
5	35	265	0,0084
6	40	260	0,0096
7	60	240	0,0144
8	65	235	0,0156
9	70	230	0,0168
10	75	225	0,0180
11	80	220	0,0191
12	85	215	0,0203
13	90	210	0,0215
14	95	205	0,0227
15	100	200	0,0239
16	105	195	0,0251
17	110	190	0,0263
18	115	185	0,0275
19	125	175	0,0299
20	130	170	0,0311
22	140	160	0,0335
23	145	155	0,0347
24	150	150	0,0359
25	155	145	0,0371

Tabela 5 - Preparo da curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método III para atividade lipolítica em detergentes enzimáticos (continuação)

Poço N°	Volume da solução de p-nitrofenol (0,07180 µmol)	Volume de tampão (µL)	Conc. final de p-nitrofenol (µmol.mL <sup>-1</sup> )
26	160	140	0,0383
27	165	135	0,0395
28	170	130	0,0407
29	175	125	0,0419
30	180	120	0,0431
31	185	115	0,0443
32	190	110	0,0455
33	195	105	0,0467
34	200	100	0,0479
35	205	95	0,0491
36	210	90	0,0503
37	215	85	0,0515
38	220	80	0,0527
39	225	75	0,0539
40	230	70	0,0551
41	235	65	0,0562
42	240	60	0,0574
43	245	55	0,0586
44	250	50	0,0598
45	255	45	0,0610

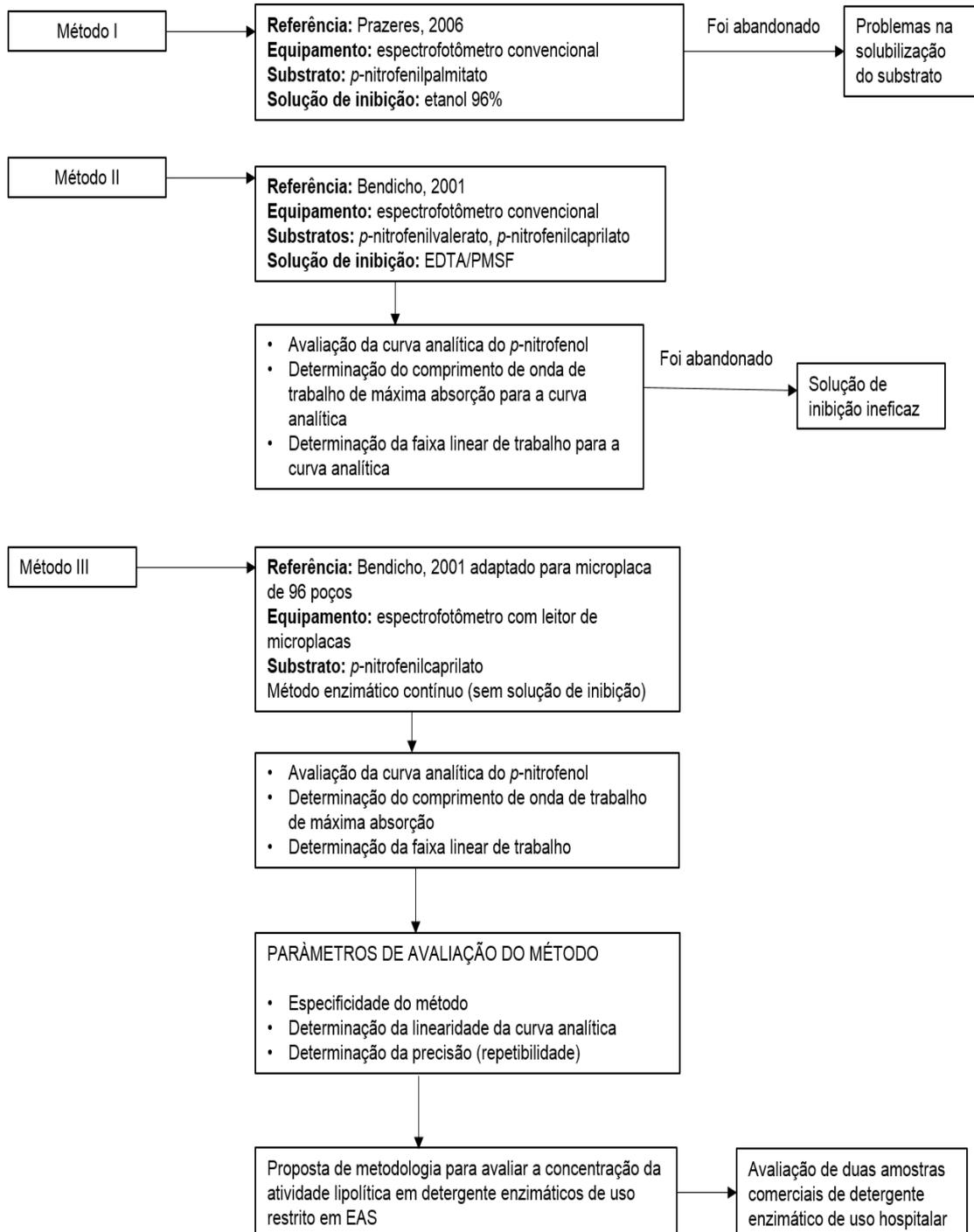
#### 3.3.4.5 Avaliação da curva de progresso da reação enzimática

A curva de progresso da reação enzimática da lipase com o substrato caprilato de p-nitrofenil foi acompanhada por um período de 60 minutos, realizada conforme o item 3.3.3. Uma reação catalisada deve inicialmente seguir uma relação linear, a partir da qual a sua velocidade é derivada. Devido ao esgotamento dos substratos durante a progressão posterior, a reação diminui e finalmente cessa (HANS; 2014).

### 3.3.4.6 Fluxograma do estudo

O estudo foi desenvolvido segundo o Fluxograma apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma do estudo das metodologias para determinação da concentração da atividade lipolítica



### 3.4 MÉTODO III OTIMIZADO

Inicialmente preparou-se uma curva analítica; foram transferidas alíquotas 0, 25, 60, 95, 130, 165, 200 e 235  $\mu\text{L}$  da solução padrão de *p*-nitrofenol ( $0,07180 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) aos poços com capacidade de  $300\mu\text{L}$  e adicionados, respectivamente, 300, 275, 240, 205, 170, 135, 100 e 65  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5. A microplaca foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos no leitor de microplaca VersaMax™. A leitura das amostras foi realizada em modo Endpoint a 400 nm. A absorbância do ponto 0, contendo somente tampão Tris-HCl 0,2 M, foi utilizada para descontar das leituras finais dos outros pontos. Foi construída a equação da reta para cálculo posterior.

A amostra foi preparada conforme recomendação do fabricante. Para a amostra AM 1, 200  $\mu\text{L}$  de detergente enzimático em 100 mL de água destilada. Para a amostra AM 2, 500  $\mu\text{L}$  de detergente enzimático em 100 mL de água destilada.

Em microplaca de 96 poços foram adicionadas 10  $\mu\text{L}$  de substrato *caprilato de p-nitrofenil* e 170  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5. A placa foi incubada para ambientação a  $37^\circ\text{C}$ , até atingir o equilíbrio térmico (1 a 2 minutos). Imediatamente foram adicionadas 20  $\mu\text{L}$  da amostra e iniciada a análise no leitor de microplacas. A absorbância foi medida a 400 nm, em modo cinético por um intervalo de tempo de 5 minutos, sendo a leitura realizada a cada 1 minuto.

Foi preparado o branco do ensaio, substituindo-se a amostra pelo tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,5. As absorbâncias do ensaio em branco foram descontadas dos valores obtidos para as amostras.

#### 3.4.1 Atividade lipolítica nas amostras de detergentes enzimáticos – Método III

Foram determinadas as atividades lipolíticas em triplicata utilizando-se o método III nas duas amostras de detergentes enzimáticos.

## 4 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO METODO III

Definidas as condições analíticas que apresentaram os melhores resultados em relação aos parâmetros de adequação do sistema para a realização do ensaio em microplacas, o método foi submetido a alguns parâmetros de avaliação como: especificidade, linearidade da curva analítica e precisão (repetibilidade).

Estes parâmetros de avaliação foram baseados no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, da Anvisa, e Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, do Inmetro (ANVISA, 2003; INMETRO, 2016).

### 4.1 ESPECIFICIDADE

Foram realizadas varreduras de 300 a 550 nm de espectros de absorção molecular, no espectrofotômetro de microplacas xMark™, BIO-RAD (Laboratório de Tecnologia de anticorpos monoclonais – LATAM Biomanguinhos/Fiocruz) após o ensaio enzimático, na solução estoque de Lipolase®, na solução padrão de *p*-nitrofenol, na amostra de trabalho e na matriz sem analito, e no branco do ensaio.

### 4.2 DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA

Definida a faixa de concentração de interesse, a linearidade foi determinada preparando-se três curvas analíticas em sete níveis de concentração, igualmente espaçados, preparados independentemente, com três replicatas independentes de cada nível.

Após a aquisição dos dados experimentais, foi realizada uma inspeção visual dos dados no gráfico x-y referente às respostas das absorbâncias versus as concentrações do analito. Utilizando-se a planilha de cálculo em Excel de Bazílio et al. (2012) adaptada de Souza e Junqueira (2005), foi realizada a avaliação da linearidade pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (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, 2007).

### 4.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO

#### 4.3.1 Determinação da repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através de 10 dosagens da amostra de trabalho, 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 (Equação 6 e 7) (HORWITZ; ALBERT, 2006).

$$DPR_R = 2C^{-0,15} \quad (6)$$

$$DPR_r = \frac{2}{3} DPR_R \quad (7)$$

Onde:

- $DPR_R$  = desvio padrão relativo de reprodutibilidade previsto pela equação de Horwitz
- $C$  = concentração do analito em fração de massa
- $DPR_r$  = desvio padrão relativo de repetibilidade

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

$$HorRat_{repe} = \frac{CV_{repe}(\%)}{\frac{2}{3} PRSD_R} \quad (8)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MÉTODO I

A concentração da atividade enzimática foi determinada a 420 nm, pelo desenvolvimento de coloração amarela devida à liberação do *p*-nitrofenol. Foi utilizado o substrato palmitato de *p*-nitrofenil e as absorbâncias obtidas neste ensaio são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Absorbâncias obtidas no Método I para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

REPLICATAS	LEITURAS – absorbâncias (nm)	
	Branco da amostra	Amostra
1	0,161	0,441
2	0,147	0,334
3	0,099	0,345
4	0,164	0,384
5	-	0,338
6	-	0,405

Composição do branco da amostra: tampão, substrato, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

Composição da amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho, solução de inibição. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

O preparo do substrato realizado com diluição em isopropanol não apresentou boa solubilização, mostrando uma solução turva e tendo necessidade de aquecimento. Na tentativa de eliminar a turbidez que interfere na leitura de absorbância foram feitas algumas mudanças na preparação deste substrato. O trabalho de Gupta (2002) propõe minimizar o problema de turbidez, através da adição de Triton X-100 à solução de substrato para se obter uma solução límpida. Triton X-100 é um surfactante que provoca a dispersão dos ácidos graxos libertados devido à hidrólise enzimática de palmitato de *p*-nitrofenil, resultando numa solução transparente.

Com as mudanças realizadas tendo como referência o trabalho de Gupta (2002) e Lopes (2009) os resultados são mostrados nas Tabela 7.

Tabela 7 - Absorbâncias obtidas no Método I com a mudança na preparação do substrato para determinação da atividade lipolítica

REPLICATAS	LEITURAS – absorbâncias (nm)	
	Branco da amostra	Amostra
1	0,624	0,640
2	0,671	0,619
3	0,638	0,595
4	0,663	0,582
5	-	0,582
6	-	0,617

Composição do Branco da amostra: tampão, substrato, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

Composição da Amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho, solução de inibição. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

As leituras dos brancos foram altas e semelhantes às leituras das amostras indicando possível interferência do substrato e apresentando turbidez. Segundo Abd-Elhakeem e colaboradores (2013) a principal desvantagem desses métodos que utilizam o palmitato de *p*-nitrofenil como substrato é a liberação de ácido palmítico que é insolúvel e provoca turbidez no tubo de ensaio de medição, alterando as leituras espectrofotométricas. Neste sentido, Palacios et. al (2011) relataram resultados não reproduzíveis na medida da atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosus* por métodos cinéticos, como consequência da complexidade de avaliar a cor da emulsão. Tendo esses resultados, o estudo dessa metodologia foi abandonada passando-se ao estudo do Método II.

## 5.2 MÉTODO II

Os resultados das absorbâncias obtidas com a utilização do substrato caprilato de *p*-nitrofenil (0,005 M) são mostrados nas Tabela 8, e os resultados com a utilização do substrato valerato de *p*-nitrofenil (0,005 M) encontram-se na Tabela 9

Tabela 8 - Absorbâncias obtidas no Método II com a utilização do caprilato de *p*-nitrofenil como substrato

REPLICATAS	LEITURAS – absorbâncias (nm)	
	Branco da amostra	Amostra
1	0,502	0,381
2	0,461	0,391
3	0,424	0,328
4	0,439	0,429
5	-	0,453
6	-	0,376

Composição do Branco da amostra: tampão, substrato, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

Composição da Amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho, solução de inibição. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

Tabela 9 - Absorbâncias obtidas no Método II com a utilização do valerato de *p*-nitrofenil como substrato

REPLICATAS	LEITURAS – absorbâncias (nm)	
	Branco da amostra	Amostra
1	0,186	0,250
2	0,193	0,293
3	0,191	0,236
4	0,191	0,263
5	-	0,267
6	-	0,298

Composição do Branco da amostra: tampão, substrato, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

Composição da Amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho, solução de inibição. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

Observou-se maior sensibilidade com a utilização do substrato caprilato de *p*-nitrofenil, estando de acordo com o estudo realizado por Palacios et. al (2014), onde os resultados obtidos demonstraram que a hidrólise do substrato caprilato de *p*-nitrofenil exibiu uma atividade mais elevada para a lipase de *T. lanuginosus* quando comparada com outros substratos. Porém, o branco apresentou alta absorbância. Assim, optou-se por realizar mais ensaios com o substrato caprilato de *p*-nitrofenil.

Os resultados para avaliação do branco da amostra são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Absorbâncias obtidas na avaliação do branco para a Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

REPLICATAS	LEITURAS – absorbância (nm)		
	Branco 1	Branco 2	Branco 3
1	0,538	0,428	-0,001
2	0,546	0,398	-0,002
3	0,508	0,393	-0,001

Branco 1: tampão, substrato, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

Branco 2: tampão, substrato, solução de inibição. \*

Branco 3: tampão, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

Os resultados mostraram leituras próximas entre o branco 1 e 2, indicando possível interferência do substrato que apresenta uma coloração levemente amarelada, uma vez que no branco 3, onde não há adição de substrato, a leitura da absorbância foi próximo do zero do equipamento.

Na tentativa de eliminar a possível interferência da coloração pelo caprilato de *p*-nitrofenil observada no estudo do branco do ensaio, realizou-se um branco para zerar o equipamento contendo 1100 µL de tampão Tris-HCl 0,2 M, 50 µL do

substrato e 400  $\mu\text{L}$  da solução de inibição. O ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente. Como as leituras do branco da amostra foram negativas (Tabela 11), o valor do branco não foi descontado para o cálculo da concentração da atividade lipolítica da amostra de trabalho.

Tabela 11 - Absorbâncias obtidas com novo branco para zerar o equipamento no Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

REPLICATAS	LEITURAS – absorbâncias (nm)	
	Branco da amostra	Amostra
1	-0,414	0,419
2	-0,416	0,397
3	-	0,392

Composição do Branco da amostra: tampão, substrato, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

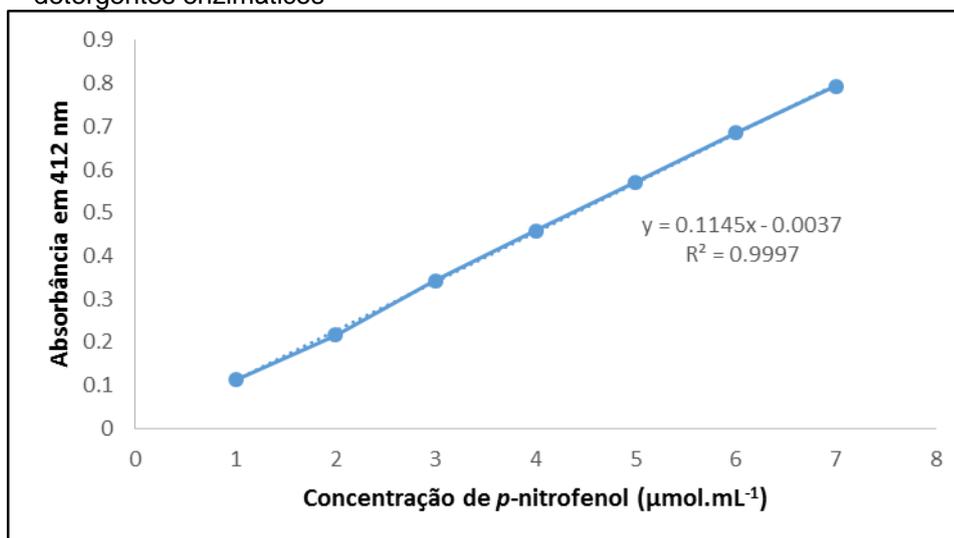
Composição da Amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho, solução de inibição. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

### 5.2.1 Curva analítica

Após a construção do gráfico de concentração (eixo x) versus absorbância (eixo y) (Figura 4), a observação visual inicial mostrou aparência gráfica de linearidade, confirmada pelo valor de coeficiente de correlação.

Figura 4 - Gráfico da Curva analítica do *p*-nitrofenol no comprimento de onda de 412 nm – Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

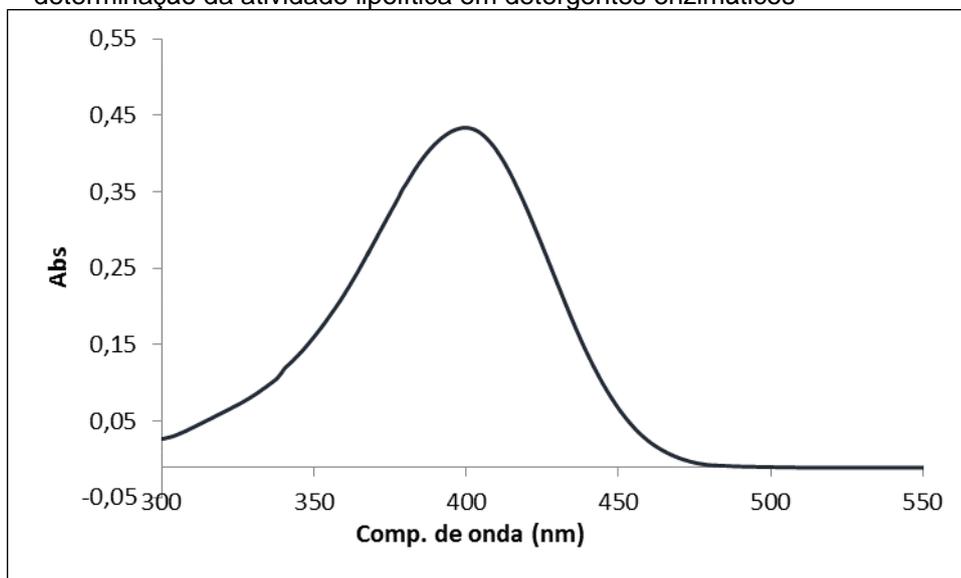


O valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) foi satisfatório, com  $r$  igual a 0,9998. Assim, optou-se pelo uso de tampão nas diluições para garantir um meio favorável para formação do íon *p*-nitrofenolato (de cor amarela).

### 5.2.2 Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção

Após a análise de varredura entre 300 a 550 nm de espectros de absorção molecular para definir o melhor comprimento de onda, observou-se que os maiores valores de unidade de absorbância (Abs) em 400 nm (Figura 5). Para aumentar a sensibilidade do método, definiu-se trabalhar com este comprimento de onda, uma vez que no estudo de Bendicho (2001), o comprimento de onda de trabalho é de 412 nm.

Figura 5 - Espectro de absorção referente ao *p*-nitrofenol – Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos



Abs: absorbância

### 5.2.3 Avaliação da faixa linear da curva analítica – Curva de Ringbom

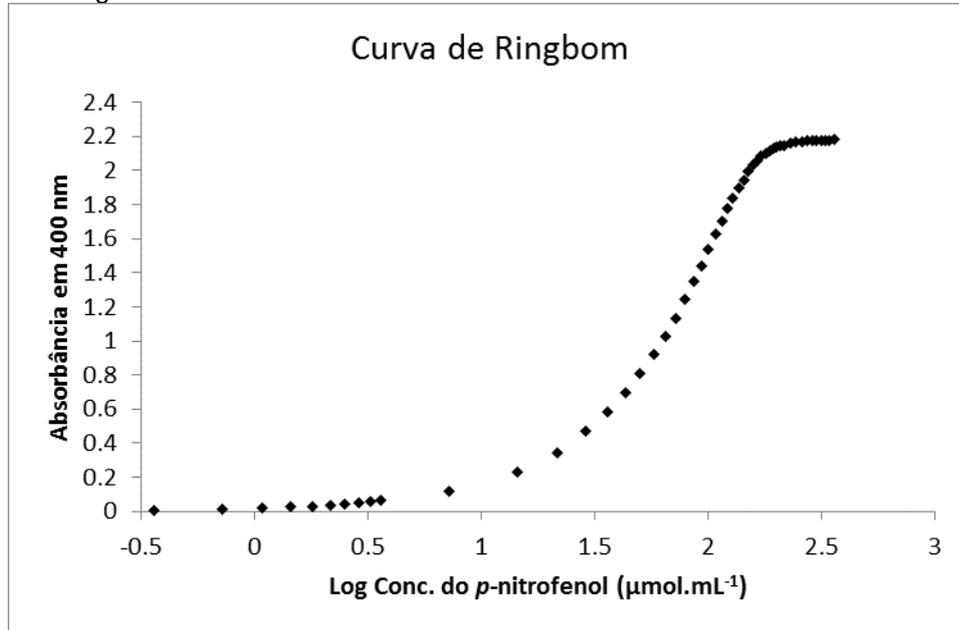
Para um estudo mais criterioso, foi feita uma curva de Ringbom, para determinar o intervalo de concentrações mais adequado para a curva analítica.

Para a maioria dos sistemas a curva de Ringbom corresponde a uma curva de comportamento sigmoide, que apresenta uma faixa linear entre absorbância e concentração (RINGBOM, 1939; TSUNENOBU; MASAYUKI, 1958). A faixa linear de trabalho pode ser determinada com a realização da curva analítica.

A curva de Ringbom é representada pela construção de um gráfico de Absorbância x logaritmo da concentração (Abs x Log Conc.) (Figura 6). Nota-se o traçado sigmoide característico da curva, no qual apresenta mais de uma faixa

linear. Portanto a faixa linear de trabalho foi definida com intervalo de 0,007180 a 0,05026  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ .

Figura 6 - Curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica - Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

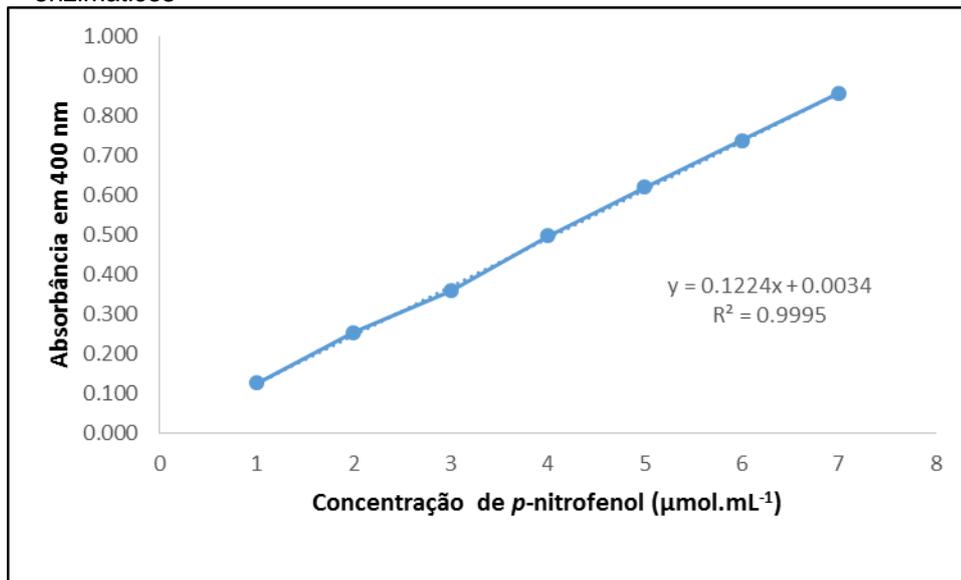


#### 5.2.4 Definição da curva de p-nitrofenol

Esta curva analítica foi realizada conforme descrito em 3.3.2.1 porém com alguns ajustes, após realização de ensaio de varredura onde foi definido o melhor comprimento de onda de trabalho para o p-nitrofenol. As leituras foram realizadas em 400 nm e o tampão Tris-HCl 0,04 M (pH: 8,0) substituído por tampão Tris-HCl 0,2 M (pH: 8,0) para adequação a metodologia descrita por Bendicho (2001).

Após a aquisição dos dados experimentais, foi realizada uma inspeção visual a partir da construção de um gráfico de concentração (eixo x) versus absorbância obtidas após a leitura das soluções (eixo y), conforme podemos observar na Figura 7.

Figura 7 - Gráfico da Curva analítica do Método II no comprimento de onda de 400 nm para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos



A curva analítica se mostrou linear, o valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) se manteve satisfatório com  $r$  igual a 0,9997.

Na avaliação da curva analítica do *p*-nitrofenol, e com base nos resultados obtidos através do método matemático aplicado e parâmetros que permitiram uma estimativa da qualidade da curva obtida, definiu-se como a curva analítica do método II. Esta curva também contempla a faixa linear de trabalho definida com a curva de Ringbom de 0,007180 a 0,05026 µmol.mL<sup>-1</sup>.

#### 5.2.5 Ensaio com a amostra de trabalho

Com isto realizou-se mais ensaios, porém após um período foi observado o aumento da intensidade da cor confirmado com o aumento da absorbância quando comparado com a primeira leitura realizada no equipamento como demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Leituras das absorbâncias realizadas com o Método II para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

REPLICATAS	LEITURAS – absorbância (nm)			
	Branco da amostra		Amostra	
	1ª leitura	2ª leitura	1ª leitura	2ª leitura
1	0,186	0,828	0,250	0,916
2	0,193	0,708	0,293	0,878
3	0,191	0,701	0,236	0,811
4	0,191	0,707	0,263	0,903
5	-	-	0,267	0,853
6	-	-	0,298	0,881

Composição do Branco da amostra: tampão, substrato, solução de inibição, amostra de trabalho. \*

Composição da Amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho, solução de inibição. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada; 1ª leitura: 15 min.; 2ª leitura: 30 min.

Esses resultados indicam que a solução de inibição (EDTA/PMSF) não conseguiu parar a reação. Bendicho (2001), avaliando o método C conseguiu inibir a ação enzimática. Isto talvez se deva à diferença entre a matriz (leite) e origem da lipase (de *Pseudomonas fluorescens*) utilizada nos seus estudos, diferentes da matriz (detergente) e Lipolase (lipase de *Thermomyces lanuginosus* utilizadas neste trabalho. Também Humbert et al. (1997) que propôs uma metodologia para determinar a concentração da atividade lipolítica em leite não teve sucesso na inativação da lipase usando EDTA e PMSF separadamente. Por outro lado, Kanwar et al (2005) fizeram um estudo comparativo utilizando vários inibidores para a atividade residual de lipase em métodos espectrofotométrico utilizando o palmitato de *p*-nitrofenil como substrato, para lipases de várias fontes. Entre eles a Lipolase®, que se mostrou sensível à inibição por EDTA, mas não por PMSF. Outras soluções de inibição podem ser empregadas descritas na literatura como: etanol 96%, acetona, dimetilformamida e EDTA 0,5 M. Entretanto, a maioria dos estudos com esses inibidores difere em relação às condições do ensaio, como tampão, pH, substrato e origem da lipase (PRAZERES; CRUZ; PASTORE, 2006; TENG; XU, 2007; GOMES et al. 2011; MOHAMMADI et al. 2016).

Com resultados não favoráveis e considerando que estudos com outros inibidores demandariam um longo tempo, e em casos de metodologia de ponto final, como este, é essencial a inibição da atividade enzimática para manter a reprodutibilidade dos resultados (KANWAR et al, 2005) a avaliação do Método II foi abandonada passando-se ao estudo do método III, baseado em método de ensaio

enzimático contínuo, sem a utilização de solução de inibição, utilizando-se o espectrofotômetro de microplacas VersaMax™.

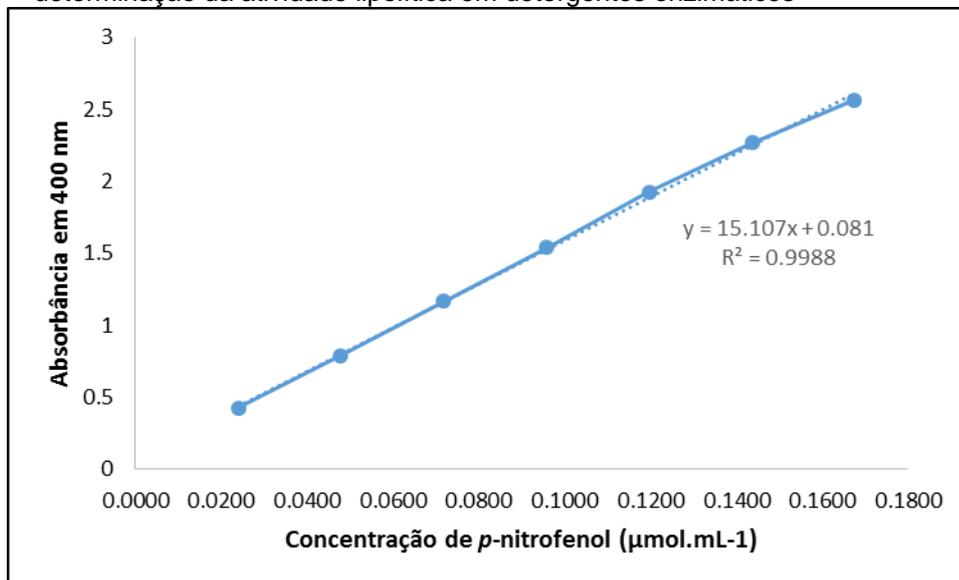
### 5.3 MÉTODO III

O Método III foi baseada no método C de Bendicho (2001), introduzindo-se modificações e adaptação à utilização de microplacas, reduzindo o volume total de trabalho a 300 µL. Assim, pode ser efetuado de forma cinética, ou seja, a absorbância do meio de reação foi acompanhada em intervalos de tempos, ao longo da reação, não sendo necessária a utilização de uma solução de inibição.

#### 5.3.1 Curva analítica

Após a construção do gráfico de concentração (eixo x) versus absorbância (eixo y) (Figura 8), a observação visual inicial mostrou aparência gráfica de linearidade, confirmada pelo valor de coeficiente de correlação.

Figura 8 - Gráfico da Curva analítica 1 do *p*-nitrofenol – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

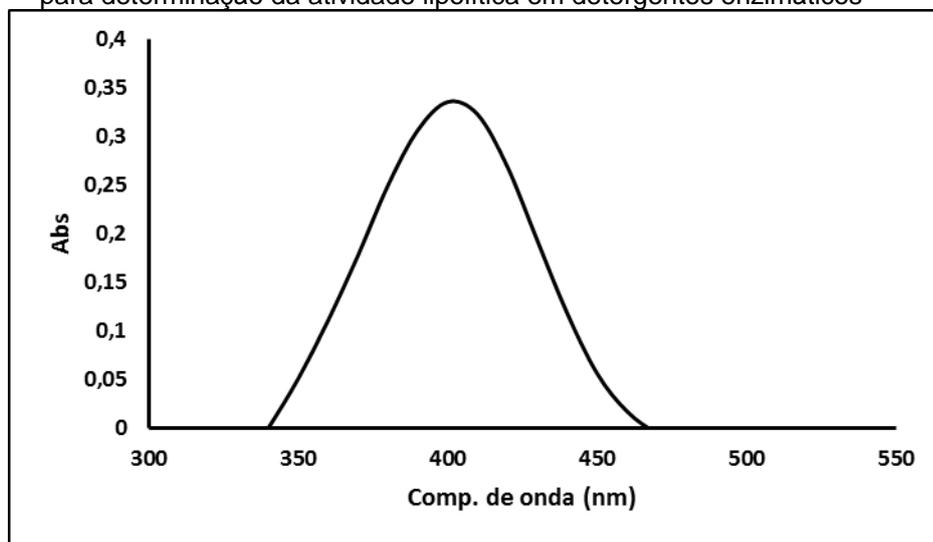


O valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) foi satisfatório com  $r$  igual a 0,9993, porém, como as absorbâncias foram maiores que 1, optou-se por avaliar a melhor faixa linear de trabalho através da Curva de de Ringbom.

### 5.3.2 Avaliação do comprimento de onda de trabalho de máxima absorção

Para aumentar a sensibilidade do método em microplacas e garantir que o ensaio estivesse sendo realizado no melhor comprimento de onda, foi realizada análise de varredura entre 300 a 550 nm de espectros de absorção molecular. Foi possível observar maiores valores de unidade de absorbância (Abs) em 400 nm (Figura 9). Portanto, optou-se trabalhar com este comprimento de onda que foi igual ao espectrofotômetro convencional estudado na metodologia anterior.

Figura 9 - Espectro de absorção referente ao *p*-nitrofenol – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

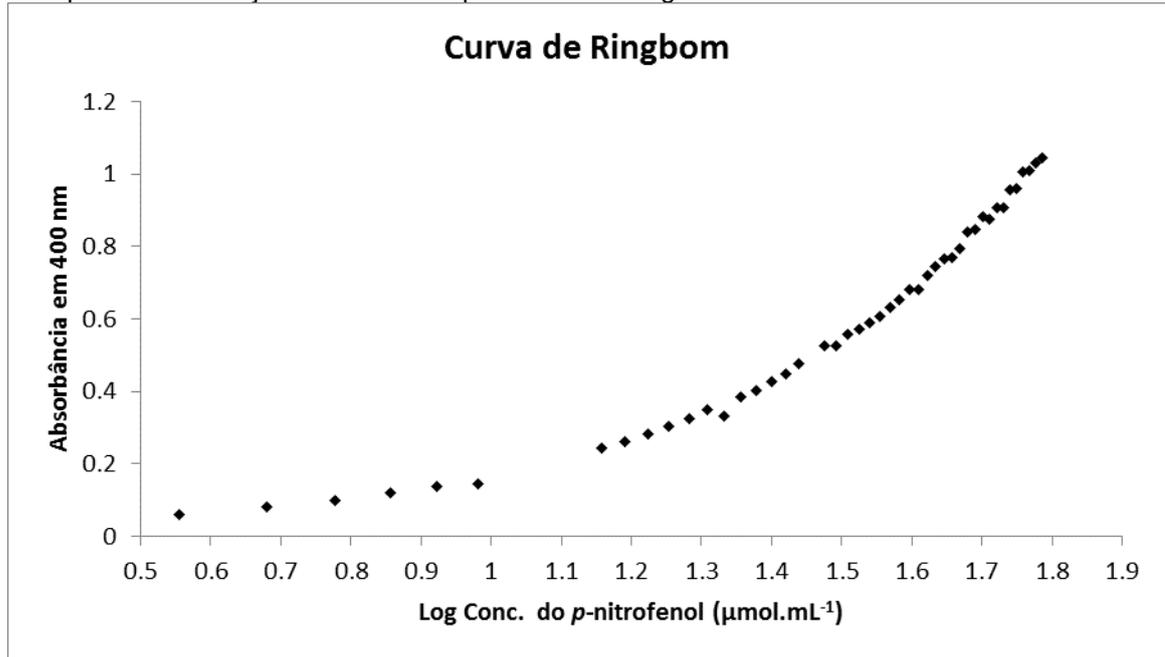


Abs: absorbância

### 5.3.3 Avaliação da faixa linear da curva analítica – Curva de Ringbom

A curva de Ringbom é representada pela construção de um gráfico de Absorbância x logaritmo da concentração (Abs x Log Conc.) como mostra a Figura 10. Nota-se o traçado sigmoide característico da curva, no qual apresenta mais de uma faixa linear. Portanto, a faixa linear de trabalho definida com intervalo de 0,005983 a 0,05624  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ .

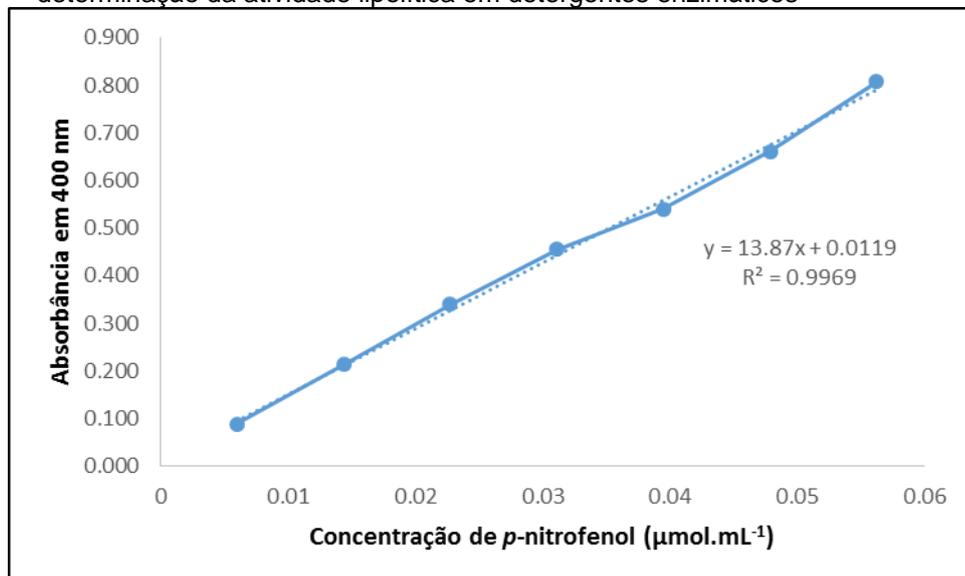
Figura 10 - Curva de Ringbom para determinação da faixa linear da curva analítica – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos



#### 5.3.4. Definição da curva de *p*-nitrofenol

Após a aquisição dos dados experimentais, foi realizada uma inspeção visual a partir da construção de um gráfico de concentração (eixo x) versus absorbância obtidas após a leitura das soluções (eixo y) (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico da Curva analítica 2 do *p*-nitrofenol – Método III para determinação da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos

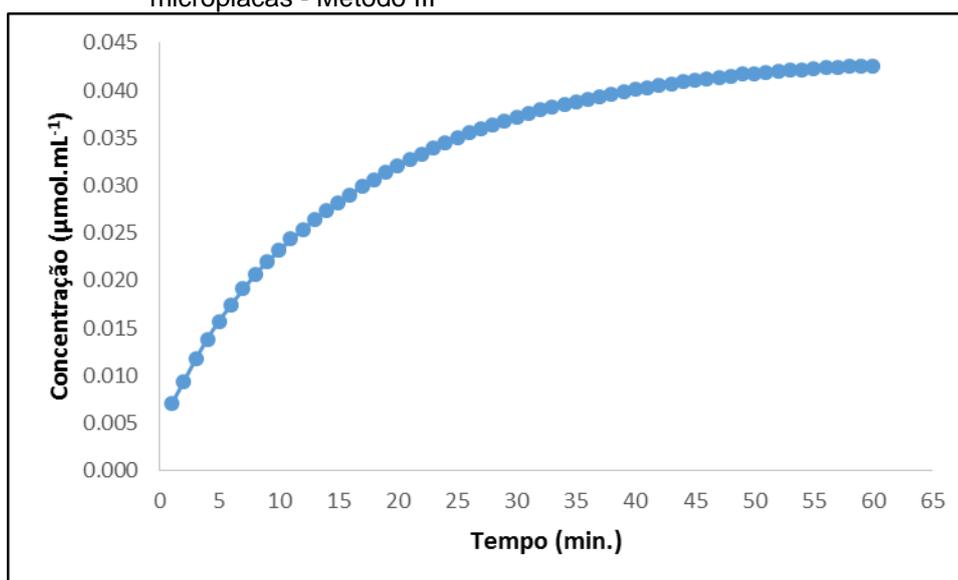


Esta curva contempla a faixa linear de trabalho definida com a curva de Ringbom de 0,0060 a 0,0562  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , com um coeficiente de correlação ( $r$ ) satisfatório com  $r$  igual a 0,9984 e assim ficou definida como a curva analítica do *p*-nitrofenol para o Método III.

### 5.3.5 Avaliação da curva de progresso da reação enzimática

Na Figura 12 é demonstrada a curva de progresso de reação enzimática com liberação do substrato em função do tempo. A velocidade é obtida a partir da inclinação da parte linear da curva e, portanto, o tempo de reação escolhido foi de 5 minutos.

Figura 12 - Curva de progresso da reação enzimática da lipase com o substrato caprilato de *p*-nitrofenil em espectrofotômetro de microplacas - Método III



## 5.4 MÉTODO III OTIMIZADO

### 5.4.1 Atividade lipolítica nas amostras de detergentes enzimáticos – Método III

As amostras comerciais de detergentes enzimáticos de uso hospitalar (AM 1 e AM 2) foram analisadas para a determinação atividade lipolítica, na diluição de uso recomendada.

Os resultados negativos em absorvância indicam que não há atividade lipolítica na amostra AM 1 (Tabela 13). Provavelmente fatores associados à formulação tenham influenciado na estabilidade da enzima, diminuindo sua atividade ou inativando-a.

Tabela 13 - Determinação de atividade lipolítica em detergente enzimático comercial - amostra AM 1

<b>REPLICATA 1</b>			
<b>LEITURAS – absorvância (nm)</b>			
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Branco (Média)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Amostra - Branco</b>
1	0,361	0,306	-0,054
2		0,312	-0,048
3		0,312	-0,044
4		0,321	-0,039
5	0,361	0,324	-0,036
<b>REPLICATA 2</b>			
<b>LEITURAS – absorvância (nm)</b>			
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Branco (Média)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Amostra - Branco</b>
1	0,361	0,296	-0,064
2		0,300	-0,060
3		0,306	-0,054
4		0,310	-0,050
5		0,315	-0,045
<b>REPLICATA 3</b>			
<b>LEITURAS – absorvância (nm)</b>			
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Branco (Média)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Amostra - Branco</b>
1	0,361	0,307	-0,054
2		0,312	-0,048
3		0,315	-0,045
4		0,321	-0,040
5		0,326	-0,034

Composição do Branco: tampão, substrato, amostra de trabalho. \*

Composição da Amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

Para a determinação da concentração da atividade lipolítica da amostra AM 2, foi preparada uma curva analítica de *p*-nitrofenol (Tabela 4) e as absorvâncias obtidas foram de 0,095 a 0,954 nm. Esta amostra apresentou valores em

absorbância fora da faixa linear da curva analítica (Tabela 14). Esses resultados indicam uma baixa concentração de atividade da lipase, entretanto não foi possível expressar o resultado em termos de limite de quantificação (LD) uma vez que, este parâmetro não foi contemplado.

Tabela 14 - Determinação de atividade lipolítica em detergente enzimático comercial - amostra AM 2

<b>REPLICATA 1</b>			
<b>LEITURAS – absorbância (nm)</b>			
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Branco (Média)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Amostra - Branco</b>
1	0,301	0,364	0,063
2		0,367	0,066
3		0,370	0,068
4		0,372	0,071
5		0,375	0,074
<b>REPLICATA 2</b>			
<b>LEITURAS – absorbância (nm)</b>			
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Branco (Média)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Amostra - Branco</b>
1	0,301	0,349	0,048
2		0,355	0,054
3		0,357	0,056
4		0,359	0,058
5		0,362	0,060
<b>REPLICATA 3</b>			
<b>LEITURAS – absorbância (nm)</b>			
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Branco (Média)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Amostra - Branco</b>
1	0,301	0,349	0,048
2		0,355	0,054
3		0,357	0,056
4		0,359	0,058
5		0,362	0,060

Composição do Branco: tampão, substrato, amostra de trabalho. \*

Amostra: tampão, substrato, amostra de trabalho. \*

\*as adições foram realizadas na ordem citada.

## 5.5 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO III

### 5.5.1 Especificidade

Para avaliar a especificidade da metodologia, contidos na matriz/formulação do detergente enzimático, foram realizadas varreduras na região de 300 a 550 nm para a solução estoque de Lipolase®, solução padrão de *p*-nitrofenol, amostra de trabalho, matriz sem analito e branco da amostra (Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 respectivamente).

Os espectros de absorção das soluções estoque de Lipolase®, de *p*-nitrofenol e amostra de trabalho foram bem próximos, apresentando um pico máximo de absorção em 400 nm, os espectros de absorção da matriz sem o analito e o branco do ensaio não apresentaram nenhum pico de absorção. Com isso, pode-se confirmar que neste comprimento de onda é possível quantificar especificamente a atividade lipolítica.

Figura 13 – Varredura da solução estoque de Lipolase® na região de 300 a 550 nm

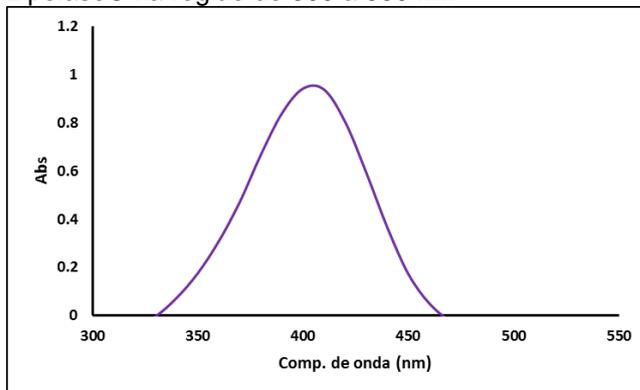


Figura 14 – Varredura da solução padrão de *p*-nitrofenol na região de 300 a 550 nm

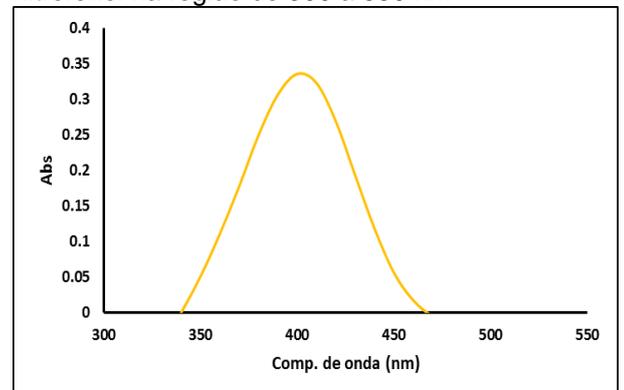


Figura 15 – Varredura da amostra de trabalho na região de 300 a 550 nm

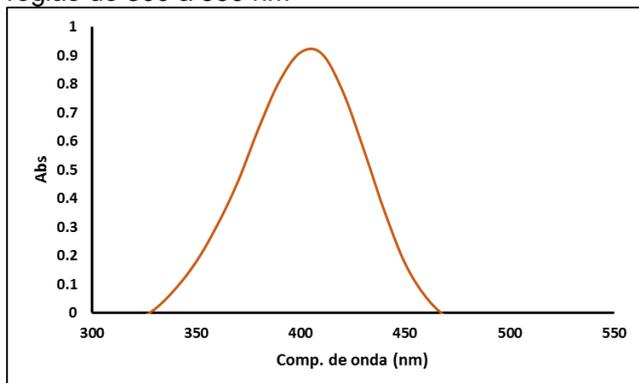


Figura 16 – Varredura da matriz sem analito na região de 300 a 550 nm

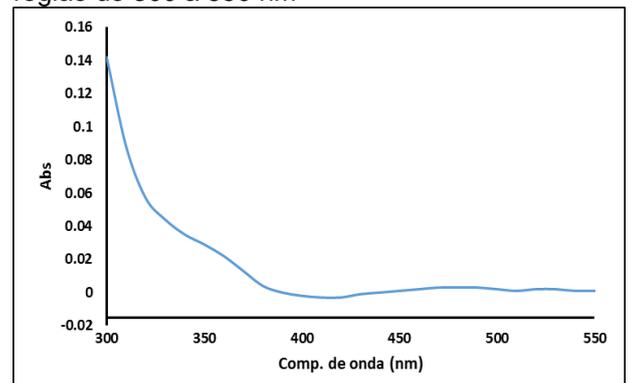
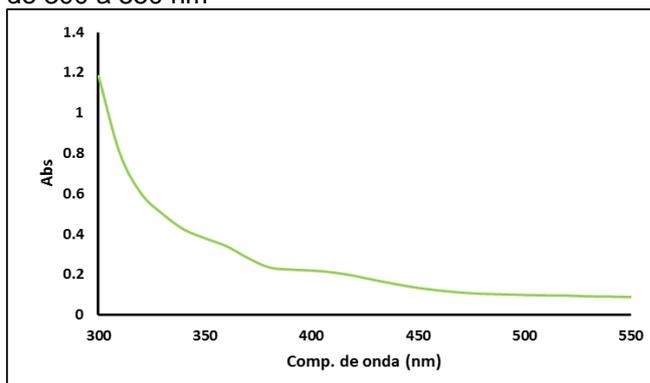


Figura 17 - Varredura do branco do ensaio na região de 300 a 550 nm



### 5.5.2 Determinação da linearidade da curva analítica

Com as condições da análise definidas, iniciou-se a avaliação da parte quantitativa do método, avaliando-se inicialmente a curva de calibração do *p*-nitrofenol. Foram preparadas três curvas analíticas em sete níveis de concentração, igualmente espaçados, preparados independentemente, com três replicatas independentes de cada nível.

A linearidade da curva analítica para o *p*-nitrofenol na faixa de concentração de 0,0060 a 0,0562  $\mu\text{mol/mL}$  foi confirmada, apresentado nas figuras 18, 19 e 20. Não foram retirados valores extremos pelo teste de Jacknife na planilha.

Figura 18 - Gráfico da 1ª curva analítica para o *p*-nitrofenol na faixa de concentração de 0,0060 a 0,0562  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$

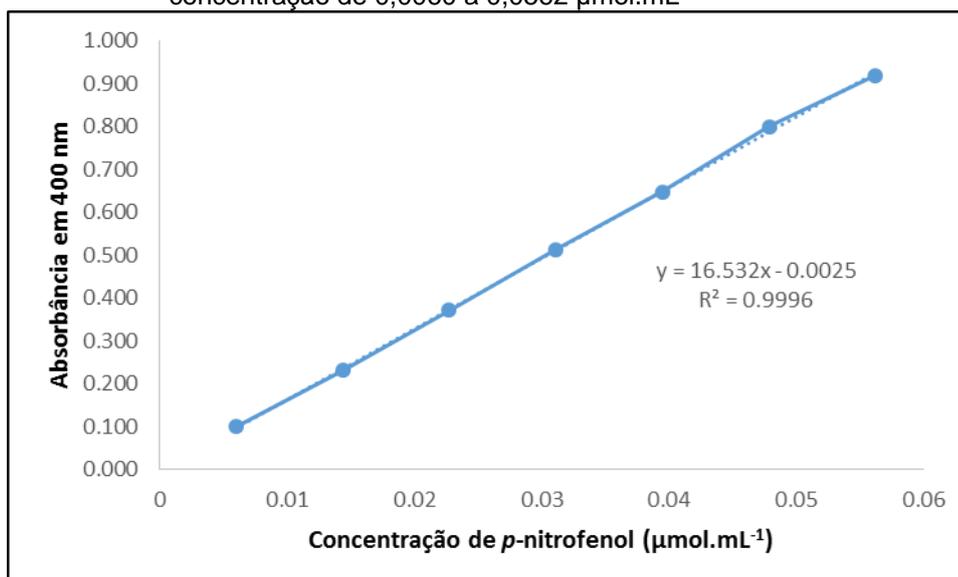


Figura 19 - Gráfico da 2ª curva analítica para o *p*-nitrofenol na faixa de concentração de 0,0060 a 0,0562  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$

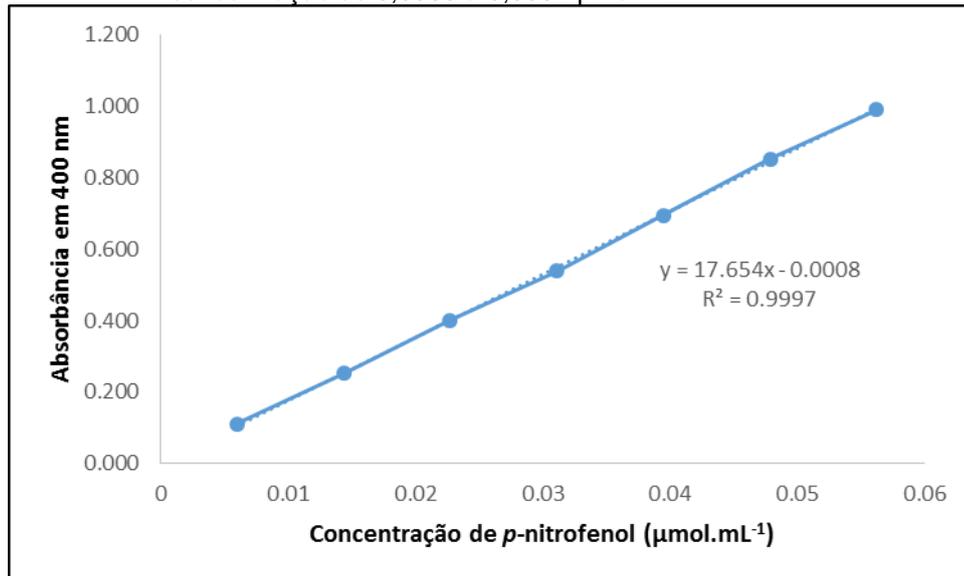
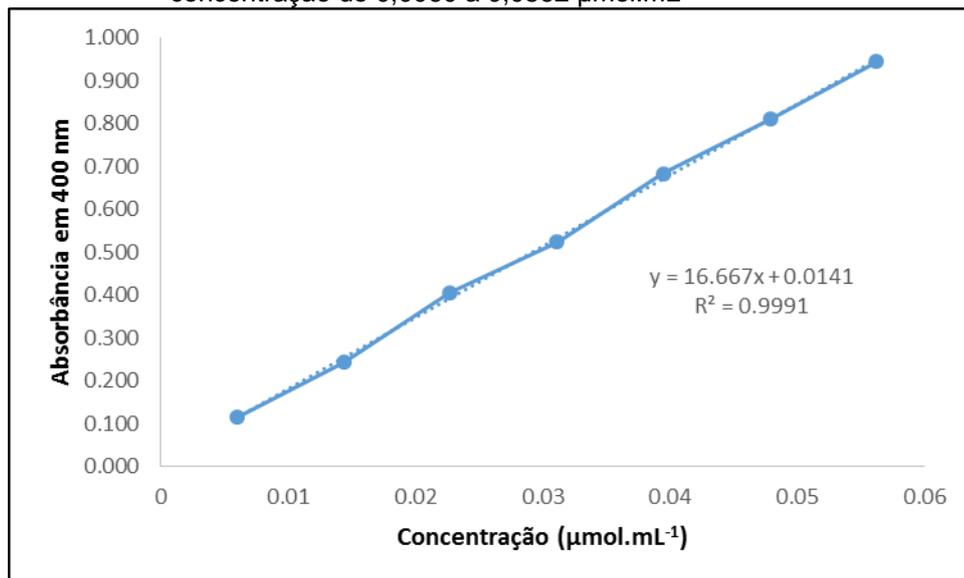


Figura 20 - Gráfico da 3ª curva analítica para o *p*-nitrofenol na faixa de concentração de 0,0060 a 0,0562  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$



Os coeficientes de correlação ( $r$ ) são todos eles superiores ao usualmente requerido e proposto pela RDC N° 899 de 29 de maio de 2003, de  $r$  critério mínimo aceitável é  $r = 0,99$ .

A linearidade da curva analítica para o *p*-nitrofenol 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 APÊNDICE A mostra resumidamente as premissas para a curva analítica do *p*-nitrofenol.

### 5.5.3 Determinação da precisão

#### 5.5.3.1 Determinação da repetibilidade

Os resultados das dosagens da atividade lipolítica da amostra de trabalho estão indicados na Tabela 15 e as concentrações em fração de massa para o cálculo de  $HorRat_{repe}$  na Tabela 16.

Tabela 15 - Concentração da atividade lipolítica da amostra de trabalho

Replicatas (U/mL)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,260	0,240	0,245	0,210*	0,235	0,245	0,190*	0,250	0,240	0,240
<b>Média: 0,244 U/mL</b>									

\* Valores aberrantes verificados pelo teste de Grubbs (GRUBBS, 1972).

Tabela 16 - Concentração em fração de massa da amostra de trabalho

Replicatas (Fração de Massa)							
1	2	3	5	6	8	9	10
$36,17 \times 10^{-6}$	$33,39 \times 10^{-6}$	$34,08 \times 10^{-6}$	$32,69 \times 10^{-6}$	$34,08 \times 10^{-6}$	$34,78 \times 10^{-6}$	$33,39 \times 10^{-6}$	$33,39 \times 10^{-6}$
<b>Média: 33,99</b>			<b><math>CV_{Horwitz}(\%)</math>: 6,27</b>			<b><math>HorRat_{repe}</math>: 0,51</b>	

$HorRat_{repe} \leq 2\%$

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

No estudo de Bendicho (2001) avaliação da precisão foi realizada com seis medições para cada um dos métodos estudados, com valor de desvio padrão relativo comparado com o DPR de Horwitz. Em todos os métodos foi satisfatório o DPR de Horwitz (4,94), com valor de DPR menor que 5%, mas não foi considerado o valor de  $HorRat_{repe}$ .

Esta metodologia apresenta vantagens em relação ao uso de espectrofotômetro convencional, utilizado nas duas metodologias anteriores contemplados neste trabalho, principalmente, quanto à análise simultânea de várias amostras, graças à possibilidade de pipetagem com micropipetas multicanais e ao menor consumo de reagentes e amostras. Além disso, o método desenvolvido permitiu ser realizado sem solução de inibição.

Neste sentido Gomes et al (2011) otimizaram e validaram um método espectrofotométrico em microplacas para determinar a atividade da lipase em meios complexos bifásicos, baseado na liberação de um outro substrato cromogênico o *p*-nitrofenilbutirato. Segundo os autores o fato de medir as absorvâncias das amostras em um leitor de microplacas, permite analisar um grande número de amostras ao mesmo tempo e obter uma considerável economia de tempo.

Entre as desvantagens deste método utilizado em microplacas destaca-se a necessidade de equipamento apropriado para incubação e leitura de microplacas; considerando que o uso de corante em detergentes enzimáticos é permitido pode ocorrer interferência no ensaio, uma vez que a técnica é espectrofotométrica. Contudo, consideramos este método cinético como o mais apropriado em relação aos outros métodos estudados para determinar a concentração da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos.

## 6 CONCLUSÃO

Para o estudo da lipase utilizada em detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS foram avaliadas três metodologias analíticas.

✓ O método I apresentou limitações devido à baixa solubilidade do substrato palmitato de *p*-nitrofenil. Mesmo após tentativas para eliminar os problemas de turbidez os resultados obtidos demonstraram que o método não poderia ser aplicável.

✓ No método II foram obtidos resultados não favoráveis em relação a eficácia da solução de inibição (EDTA/PMSF) que impossibilitou inibir a reação.

✓ Os resultados encontrados nas metodologias anteriores levaram a propor o método III, onde a determinação da concentração da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS é feita de forma cinética, sem a utilização de solução de inibição. Definiu-se uma curva padrão de *p*-nitrofenol, com comprimento de onda de trabalho de máxima absorção de 400 nm. A metodologia demonstrou ser específica e precisa (repetibilidade) para determinar a atividade lipolítica.

Os resultados dos testes realizados na metodologia III demonstram ser a mais aplicável para determinar concentração da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos de uso em EAS disponíveis no mercado e que atualmente são comercializados sem o controle desta enzima.

De acordo com a RDC N° 55/2012 a atividade da protease e amilase é avaliada conforme a atividade enzimática mínima declarada no rótulo do produto. Embora, este parâmetro ainda não seja definido para lipase, os resultados obtidos nas amostras analisadas, na diluição de uso recomendado pelo fabricante, não evidenciaram atividade lipolítica. Esse fato destaca ainda mais a importância de dar continuidade ao estudo de forma mais criteriosa, no que diz respeito à influência dos componentes da formulação e a estabilidade da enzima.

## 7 PERSPECTIVAS

✓ Tendo em vista os resultados promissores obtidos no presente estudo, consideramos de fundamental importância para o INCQS a continuidade da pesquisa referente ao estudo do método III contemplando todos os parâmetros de validação como: seletividade, linearidade / faixa de trabalho / faixa linear de trabalho / sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez para posteriormente propor sua inclusão na RDC nº 55 de 2012 que trata dos registros dos detergentes enzimáticos, onde estão incluídos somente os critérios para as enzimas amilase e protease.

✓ Ressaltamos pontos importantes a serem investigados como: a possível interferência dos componentes da formulação na concentração da atividade lipolítica em detergentes enzimáticos de uso hospitalar.

✓ Destacamos ainda como perspectiva, determinar a atividade lipolítica em um número maior de detergentes enzimáticos de uso restrito em EAS disponíveis no mercado; e também contribuir para os processos de fabricação e controle com perspectiva de melhoria da qualidade dos produtos na pós comercialização.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ELHAKEEM, M. A.; ELSAYED, A. M.; ALKHULAQI, T.A. New Colorimetric Method for Lipases Activity Assay in Microbial Media. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 4, p. 442–444, 2013.
- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Fungal biotechnology. **Int. Microbiol.**, v. 6, p. 191–199, 2003.
- AKOH, C.C.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. **Lipids**, v.39, n. 6, p. 513-526, 2004.
- ALFA, MJ; JACKSON M. A new hydrogen peroxide-based medical-device detergent with germicidal properties: comparison with enzymatic cleaners. **Am J Infect Control**, v. 29, p. 168-177, 2001.
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Saneantes. Consulta a Saneantes registrados. Disponível em:<[http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta\\_Produto/consulta\\_saneante.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_saneante.asp)> Acessos em: 11 mai. 2017.
- ASHOUR, M. A.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. D. Use of 96-well microplate reader for measuring routine enzyme activities. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 353-360,1987.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 17025: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
- BAZILIO, F.S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Analytica*, Rio de Janeiro, 2012.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIERE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology, Weinheim**, v. 102, p. 133-153, 2000.
- BENDICHO, S.; TRIGUEROS, M. C., HERNANDEZ, T.; MARTÍN, O. Validation and Comparison of Analytical Methods Based on the Release of p-Nitrophenol to Determine Lipase Activity in Milk. **J. Dairy Sci**, v. 84, p. 1590 - 1596, 2001.
- BOEL, E., CHRISTENSEN, T., WOLDIKE, H.F., HUGE-JENSEN, I.B. US PATENT 5,766,912, Humicola lipase produced in *Aspergillus*, 1998.
- BON, E. P.S.; FERRARA; M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência /UFRJ /CAPES/ FAPERJ/ FCT(Portugal), 2008.
- BON, E.P.S.; PEREIRA Jr., N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: E.P.S. Bon, p.110,1999.

BRASIL. Portaria nº 2616 de 13 de maio de 1998. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 15 maio 1998. Seção I.

\_\_\_\_\_. Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, jan 1999.

\_\_\_\_\_. Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, maio 2003.

\_\_\_\_\_. Resolução (RDC) nº 40, de 05 de junho de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Limpeza e Afins harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC Nº 47/07. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008.

\_\_\_\_\_. Resolução (RDC) nº 59, de 19 de novembro 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, nov de 2010.

\_\_\_\_\_. Resolução (RDC) nº 15, de março de 2012. Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para a saúde e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, mar 2012.

\_\_\_\_\_. Resolução (RDC) nº 55, de 14 de novembro de 2012. Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 nov. 2012.

BRENDA. Disponível em: < <http://www.brenda-enzymes.org/structure.php?show=reaction&id=364037&type=S&displayType=marvin> >. Acesso em: 06 jan.2017

BRULLET, E.; RAMIREZ-ARMENGOL, J.A.; CAMPO, R. BOARD OF THE SPANISH ASSOCIATION FOR DIGESTIVE ENDOSCOPY. Cleaning and Disinfection Practices in Digestive endoscopy in Spain: results of a national survey. **Endoscopy**, v. 33, p. 864-868, 2001.

BRZOZOWSKI, M., SAVAGE, H., VERMA, C.S., TURKENBURG, J.P., LAWSON, D.M., SVENDSEN, A., PATKAR, S. Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces* (Humicola) lanuginosa Lipase. **Biochemistry**, v. 39, p. 15071-15082, 2000.

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

CARDENAS, F.; DE CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZA, E. ARDENAS, F. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 28, p. 145-154, 2001.

CASTRO, H. F. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n.6, p. 544-555, 1995.

CASTRO, H. F.; A. A. MENDES; SANTOS, J. C. Modificação de óleo e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 146-156, 2004.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 16, p. 396-403, 1998.

CHIU, K. W.; TSAI, M.; WU, K.; CHIU, Y.; LIN, M.; HU, T. Surveillance cultures of samples obtained from biopsy channels and automated endoscope reprocessors after high-level disinfection of gastrointestinal endoscopes. **BMC Gastroenterology**. v. 12, n 120, p 1-7, 2012.

CHIU, K.W.; LU, L.S.; CHIOU, S.S. High-level disinfection of gastrointestinal endoscope reprocessing. **World Journal of Experimental Medicine**, Feb v. 5, n. 1, p 33 – 39, 2015.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: Epub, p. 288, 2008.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 881–885, 2006.

COOLBEAR, T; DANIEL, R M; MORGAN, HW. The enzymes from extreme thermophiles: bacterial source, thermostabilities and industrial relevance. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 45, p. 57-98, 1992.

COSTA, E. A. M.; COSTA, E. A. Reprocessamento de produtos médicos: da política regulatória à prática operacional. **Ciênc. saúde coletiva**. v.16, n.12, pp.4787-4794, 2011.

COSTA, E. A. M.; COSTA, E. A.; GRAZIANO, K. U.; PADOVEZE, M. C. Reprocessamento de produtos médicos: uma proposta de modelo regulatório para hospitais brasileiros. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 6, p. 1459-65, 2011.

COSTA, M. M. M. **Efeitos de um ciclo de melhoria da qualidade nacional aplicado à estruturação das ações de prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde em hospitais brasileiros**. 2016. 124f. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão da Qualidade em Serviços de Saúde) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, maio 2004.

DUARTE, R. S.; LOURENÇO, M. C. S.; FONSECA, L.; LEÃO, S. C.; AMORIM, E. T.; ROCHA, I. L. L.; COELHO, F. S.; VIANA-NIERO, C.; GOMES, M. K.; M. G. SILVA, LORENA, N. S.; PITOMBO, M. B.; FERREIRA, R. M. C.; GARCIA, M. H.; OLIVEIRA, G. P.; LUPI, O.; VILAÇA, B. R.; SERRADAS, L. R.; CHEBABO, A.; MARQUES, E. A.; TEIXEIRA, L. M.; DALCOLMO, M.; SENNA, S. G.; SAMPAIO, J. L. M. Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2149-2155, 2009.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197 – 212, 2010.

FERREIRA, F. **Desenvolvimento de um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - UFRGS, Rio Grande do Sul, 2007.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. 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.

GANDHI, N. N. Applications of lipase-Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 6, p. 621 – 634, 1997.

GELLISEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 54(6), p.741-50, 2000.

GILLIS, A. Research discovers new roles for lipases. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 65, p. 846–852, 1988.

GODFREY, T. **Industrial Enzimology**. Stockton Press, New York, p. 609, 1996

GRUBBS, F. E.; BECK, G. Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations. **Technometrics**, v. 14, p. 847-856, 1972.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, N. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2002.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 37, p. 63-71, 2003.

HAKI, GD, RAKSHIT, SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour Technol**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HANS, B. Enzyme assays. **Perspective in Science**, v.1, p. 41-55, 2014.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, p. 782-798, 2009.

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.

HUMBERT, G.; GUINGAMP, M; LINDEN, G. Method for the measurement of lipase activity in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 465 – 469, 1997.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 5. Rio de Janeiro, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE. POP 65.3120.126: validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear. Rev.3 Rio de Janeiro, 2008. 24 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3)

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY NOMENCLATURE. Enzyme nomenclature. San Diego: IUBMB, p. 862,1992.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY NOMENCLATURE. ExplorEnz-The Enzyme Database. Enzyme count. Disponível em: < <http://www.enzyme-database.org/stats.php>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

JURADO, E.; BRAVO, V.; LUZON, G.; FERNANDEZ-SERRANO, M., GARCIA-ROMAN, M., ALTMAJER-VAZ, D., VICARIA, J.M. Hard-surface cleaning using lipases: enzyme–surfactant interactions and washing tests. **J. Surfactants Deterg**, v. 10, p. 61–70, 2007.

KANWAR, S.S.; KAUSHAL, R. K.; JAWED, A.; GUPTA, R.; CHIMMI, S. S. Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: a comparative study. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.42, p. 233-237, 2005.

KAZLAUSKAS, R.J.; BORNSCHEUER, U.T. Biotransformations with lipases. *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 24, p. 45–66, 1998.

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

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. v. 3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 593, 2001.

LOPES, L. Estudo da atividade proteolítica e desempenho em detergentes enzimáticos de uso restrito em Estabelecimento de Assistência à Saúde. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2012.

MILED, N., BEISSON, F., DE CARO, J., DE CARO, A., ARONDEL, V., VERGER, R. Interfacial catalysis by lipases. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 11, p. 65-171, 2001.

MITIDIERI, S. Produção de enzimas hidrolíticas para formulação de detergentes biodegradáveis. 2003. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - UFRGS, Rio Grande do Sul, 2003.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; CAMASSOLA, S.; MENGUER, P. K.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Detergentes biológicos biodegradáveis. Avaliação das formulações do mercado. *Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento*, n. 26, p. 56-60, 2002.

MOHAMMADIA, M.; SEPEHRIZADEHB, Z.; EBRAHIM-HABIBIC, A; SHAHVERDIB, A. R.; FARAMARZIB, M. A.; SETAYESHB, N. Enhancing activity and thermostability of lipase A from *Serratia marcescens* by site-directed mutagenesis. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 93 – 94, p. 19 – 28, 2016.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas – Poderosa ferramenta na indústria. **Revista Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NELSON, A. N.; LIPSKY, J.J. Microtiter Plate-Based determination of multiple concentration-inhibition relationships. **Analytical Biochemistry**, v. 231, p. 437-439, 1995.

OLEMPSKA-BEER, Z. S.; MERKER, R. I., DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 144–158, 2006.

OLIVEIRA, A. C.; DAMASCENO, Q. S.; RIBEIRO, S. M. C. P. Infecções relacionadas à Assistência em Saúde: desafios para prevenção e controle. **Revista Mineira de Enfermagem**, Minas Gerais, v.13, n 3, p. 445-450, jul/set. 2009.

PALACIOS, D.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M.; PILAR-IZQUIERDO, M. C.; ORTEGA, N. Desarrollo de un método a punto final para la evaluación de actividad lipasa. In Book of abstracts of the 34th congress of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology p. 305 - 306, Barcelona, Spain. 2011.

PALACIOS, D; BUSTO, M. D.; ORTEGA N. Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. **Food Science and Technology**, v. 55, p. 536 -542, 2014.

PALOMO, J., ORTIZ, C., FUENTES, M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUISÁN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **J. Chromat, A** 1038, p. 267-273, 2004.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, p. 81-84, 2003.

PINHOLT, C., FANO, M., WIBERG, C., HOSTRUP, S., BUKRINSKY, J.T., FROKJAER, S., NORDE, W., JORGENSEN, L. Influence of glycosylation on the adsorption of *Thermomyces lanuginosus* lipase to hydrophobic and hydrophilic surfaces. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 273–281, 2010.

PRAZERES, J.N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, p. 505 - 509, outubro. 2006.

RIBEIRO, M.M. **Avaliação da efetividade do reprocessamento de endoscópio gastrointestinal flexível**. 2011. 147 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem). Escola de Enfermagem da Universidade federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.

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

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. Atlanta, GA: **US Department of Health and Human Services**, p. 36 - 37, 2008.

SANTOS, M. S., **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2011.

SCHMIDT, D R C; YONEKURA, C S I; GIL, R F. Instrumento para avaliação de detergentes enzimáticos. **Rev. esc. Enferm, USP**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 282-289, June 2007.

SHINTRE, M. S.; GHADGE, R. S.; SAWANT S. B. Lipolase catalyzed synthesis of benzyl esters of fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 131–14, 2002.

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, 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.

SPINZI, G.; FASOLI, R; CENTENARO, R.; MINOLI, G.; SIED Lombardia Working Group. Reprocessing in digestive endoscopy units in Lombardy: results of a regional

survey. **Dig Liver Dis**, v. 40 n. 11. p 890-6, 2008.

SUAN, C.; SARDIMI, M. R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)- 1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, p. 111-119, 2004.

TENG, Y.; XU, Y. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 363, p. 297–299, 2007.

TORRES, R.; ORTIZ, C.; PESSELA, B. C. C.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 167-171, 2006.

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

# APÊNDICE A - PLANILHA DE AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DA CURVA ANALÍTICA

 Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCQS
---	---

## AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

### Dados da Curva Analítica

Análise:	Linearidade - Lipase		
Data de Confeção da Curva:	12/05/2017	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	VersaMAX	Responsável:	Maria Blanco

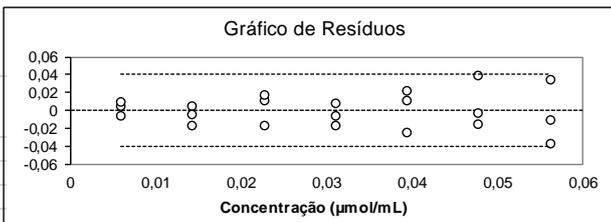
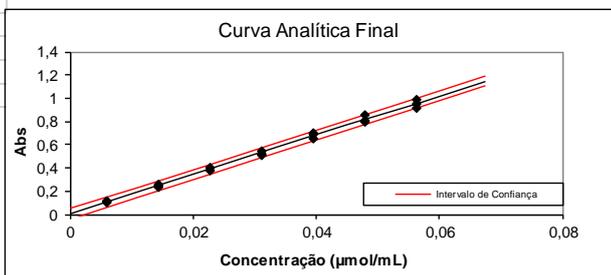
### Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. $\mu\text{mol/mL}$	Resposta Abs
1	01	0,006	0,099
	02	0,006	0,110
	03	0,006	0,114
2	04	0,014	0,231
	05	0,014	0,251
	06	0,014	0,243
3	07	0,023	0,372
	08	0,023	0,400
	09	0,023	0,406
4	10	0,031	0,514
	11	0,031	0,539
	12	0,031	0,524
5	13	0,039	0,648
	14	0,039	0,695
	15	0,039	0,684
6	16	0,048	0,800
	17	0,048	0,853
	18	0,048	0,811
7	19	0,056	0,920
	20	0,056	0,991
	21	0,056	0,946

### Avaliação de Valores Extremos

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

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



### Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

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

### Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,87
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):	1,70E+01	Coefficiente Linear (a):	3,61E-03
r	0,9979	R <sup>2</sup>	0,9958
N	21	Graus de Liberdade	19

### Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	3,85E-04
$t_L$ calculado	-1,30E+00
$t_{\text{tabelado}}$ ( $\alpha = 0,05$ )	2,09E+00
p	2,10E-01

### Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	2,63E-03	Limite de Quantificação	7,83E-03
--------------------	----------	-------------------------	----------

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

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,69E+00	1,69E+00	4,52E+03	4,60E-24
resíduos	19	7,11E-03	3,74E-04		
Ajuste	5	4,51E-04	9,01E-05	1,89E-01	9,62E-01
erro puro	14	6,66E-03	4,76E-04		
total	20	1,70E+00			

### 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

--

Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Verificado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_