



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 703, DE 16 DE MAIO DE 2022

(Publicada no DOU nº 93, de 18 de maio de 2022)

Dispõe sobre detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos.

A **Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, no uso das competências que lhe conferem os arts. 7º, inciso III, e 15, incisos III e IV da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e ao art. 187, VI, § 1º do Regimento Interno aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 585, de 10 de dezembro de 2021, resolve adotar a seguinte Resolução, conforme deliberado em reunião realizada em 12 de maio de 2022, e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação.

CAPÍTULO I
DISPOSIÇÕES INICIAIS

Seção I
Objetivo

Art. 1º Esta Resolução possui o objetivo de estabelecer definições, características gerais, requisitos técnicos e de rotulagem para o registro de produtos categorizados como detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos, de forma a minimizar o risco à saúde.

Seção II
Abrangência

Art. 2º Esta Resolução se aplica aos detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde e com indicação de uso para limpeza de dispositivos médicos.

Seção III
Definições

Art. 3º Para os fins desta Resolução, são adotadas as seguintes definições:

I - atividade enzimática em detergentes: capacidade que a enzima possui em catalisar uma reação, degradando substratos específicos, desde que o complexo enzimático contido no detergente esteja em condições ativas dentro da formulação;

Este texto não substitui o(s) publicado(s) em Diário Oficial da União.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

II - detergente enzimático para limpeza de dispositivos médicos: produto cuja formulação contém, além de um tensoativo, pelo menos uma enzima hidrolítica da subclasse das proteases EC 3.4, podendo ser acrescida de outra enzima da subclasse das amilases EC 3.2 e demais componentes complementares da formulação, inclusive de enzimas de outras subclasses, tendo como finalidade remover a sujidade clínica e evitar a formação de compostos insolúveis na superfície desses dispositivos;

III - dispositivo médico: produto para a saúde, tal como instrumento, aparelho, equipamento, material ou outro artigo, utilizado isoladamente ou em combinação, destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de diagnóstico, prevenção, controle, tratamento, atenuação de uma doença, compensação de uma lesão ou deficiência, ou controle de concepção e que não tem o objetivo de agir no corpo humano por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, mas que pode ser assistido nas suas funções por tais meios;

IV - enzima hidrolítica (EC 3): enzima capaz de catalisar uma reação de hidrólise;

V - enzima lipolítica (EC 3.1): enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações ésteres de lipídeos;

VI - enzima proteolítica (EC 3.4): enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas;

VII - estabelecimento de assistência à saúde: nome genérico dado a qualquer local ou ambiente físico destinado à prestação de assistência à saúde da população, tais como: hospitais, clínicas, consultórios, entre outros;

VIII - limpeza de dispositivos médicos: remoção de sujidade clínica de objetos e superfícies por meio de atividade manual ou mecânica;

IX - produto de aplicação ou manipulação profissional: aquele que, por sua forma de apresentação, toxicidade ou uso específico, deve ser aplicado ou manipulado exclusivamente por profissional devidamente treinado, capacitado ou por empresa especializada;

X - substrato: moléculas ou substâncias-alvo cuja enzima é capaz de catalisar sua reação; e

XI - sujidade clínica: substância composta de matéria inorgânica, orgânica ou biológica, tipicamente encontrada em dispositivos médicos após uso clínico.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

CAPÍTULO II
CARACTERÍSTICAS GERAIS

Art. 4º Os produtos abrangidos por esta Resolução são considerados de risco 2 e estão sujeitos a registro.

Art. 5º Todos os relatórios de ensaio exigidos por esta Resolução devem ser emitidos por laboratórios acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro ou habilitados na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde - Reblas.

Art. 6º Os detergentes enzimáticos para uso em estabelecimentos de assistência à saúde e com indicação para limpeza de dispositivos médicos ficam restritos à aplicação ou manipulação profissional.

Art. 7º Os detergentes enzimáticos para limpeza de dispositivos médicos devem apresentar composição condizente com sua finalidade, não podendo conter substâncias que comprometam a atividade das enzimas ou que danifiquem os materiais e equipamentos que entrem em contato com estes produtos.

Art. 8º Para os detergentes enzimáticos com indicação de uso para limpeza de dispositivos médicos que contenham apenas um tipo de enzima, esta deve ser da subclasse das proteases EC 3.4.

Art. 9º Os detergentes enzimáticos para limpeza de dispositivos médicos não podem conter enzimas que comprometam a saúde da população, conforme as normas vigentes.

Art. 10. Os detergentes enzimáticos para limpeza de dispositivos médicos, quando estiverem associados a substância(s) com atividade antimicrobiana, devem obedecer à Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 693, de 13 de maio de 2022, ou suas atualizações, e à Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 700, de 13 de maio de 2022, ou suas atualizações, bem como cumprir o disposto nesta Resolução.

Art. 11. Na formulação dos produtos de que trata esta Resolução não são permitidas substâncias que sejam comprovadamente carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas para o homem, segundo a Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer da Organização Mundial de Saúde - Iarc/OMS.

Art. 12. As embalagens para os produtos de que trata esta Resolução não devem permitir a migração de substâncias tóxicas delas para o produto, bem como migração do produto para o meio externo, e devem ter características que garantam a estabilidade durante o seu prazo de validade.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

CAPÍTULO III
REQUISITOS PARA O REGISTRO

Art. 13. Para obtenção do registro sanitário dos produtos abrangidos por esta Resolução, devem ser apresentados os seguintes documentos:

I - formulários emitidos pelo peticionamento eletrônico;

II - Literatura Técnica e/ou Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos - FIS PQ dos componentes da fórmula que não possuem número de inscrição no **Chemical Abstracts Service** - CAS;

III - documentação do fornecedor de todas as enzimas constantes da formulação, informando a nomenclatura adotada pela **Internacional Union ou Biochemistry and Molecular Biology** - IUBMB, incluindo o número completo do código e a descrição da origem biológica contendo o gênero e a espécie;

IV - relatório de ensaio de atividade enzimática;

V - relatório de ensaio de pH do produto puro e na diluição de uso;

VI - relatório de ensaio de estabilidade acelerada ou de longa duração para comprovação da atividade enzimática durante o prazo de validade proposto;

VII - peso molecular do(s) tensoativo(s) utilizado(s) na formulação;

VIII - modelo(s) de rótulo(s), colorido(s) e em escala;

IX - desenho da embalagem, croqui ou foto; e

X - dados gerais da empresa, tais como: razão social, nome do responsável legal, nome e número de registro do responsável técnico no conselho da categoria, endereço completo, número de telefone e fax.

§ 1º Em relação à atividade enzimática descrita no inciso IV do **caput** deste artigo, a atividade amilolítica deve ser comprovada de acordo com a presença de enzima da subclasse das amilases EC 3.2 na formulação.

§ 2º O ensaio de atividade enzimática escrito no inciso IV do **caput** deste artigo deve ser realizado com o produto puro, quando este for para pronto uso, ou na diluição de uso recomendada pelo fabricante, e deve obedecer ao disposto nos Anexos I e II desta Resolução.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

§ 3º No caso dos produtos tratados no inciso V do **caput** deste artigo, cujo pH não possa ser medido na forma pura, esses devem ser avaliados somente na diluição de uso.

§ 4º Os resultados encontrados ao final do ensaio de estabilidade tratado no inciso VI do **caput** deste artigo devem ser declarados na rotulagem do produto.

CAPÍTULO IV
ROTULAGEM

Art. 14. As palavras em destaque no rótulo devem ser impressas em negrito com, no mínimo, o dobro de altura do tamanho do restante do texto.

Art. 15. Os dizeres de rotulagem devem ser indelévels, legíveis, com limite mínimo de 1mm (um milímetro) de altura, sendo que a cor e o tipo das letras usadas não podem se confundir com o fundo.

Art. 16. O rótulo do produto não pode conter etiquetas e dados escritos a mão e os dizeres não podem ser apagados ou rasurados durante a vigência do prazo de validade.

Art. 17. É proibida a inscrição de lote, data de fabricação e validade na tampa do produto.

Art. 18. Não pode haver indicação relativa à toxicidade ou segurança do produto, tais como: “não tóxico”, “seguro”, “inócuo”, “não prejudicial” ou outras indicações similares.

Art. 19. Não devem constar termos superlativos, tais como: “o melhor”, “incomparável”, “o menos agressivo” ou similar.

Art. 20. Quando a superfície da embalagem não permitir a indicação da forma de uso, precauções e cuidados especiais, estes devem ser indicados em prospectos ou equivalente, que acompanhem obrigatoriamente o produto, devendo na rotulagem figurar a frase de advertência “ANTES DE USAR, LEIA AS INSTRUÇÕES DO PROSPECTO EXPLICATIVO” ou frase equivalente.

Art. 21. O painel principal (face imediatamente voltada para o consumidor, onde está localizado o nome comercial do produto), deve conter as seguintes informações:

I - marca e/ou nome do produto;

II - categoria do produto “DETERGENTE ENZIMÁTICO”;



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

III - destinação de uso “ASSISTÊNCIA À SAÚDE”;

IV - indicação quantitativa relativa ao conteúdo líquido da embalagem;

V - a frase “ANTES DE USAR, LEIA AS INSTRUÇÕES DO RÓTULO”;

VI - a frase “CONSERVE FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS E DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS”; e

VII - a frase “PRODUTO EXCLUSIVAMENTE DE USO PROFISSIONAL - PROIBIDA A VENDA DIRETA AO PÚBLICO”.

§ 1º As frases indicadas nos incisos V e VI do **caput** deste artigo devem estar em destaque e letras maiúsculas.

§ 2º A frase indicada no inciso VII do **caput** deste artigo deve estar em destaque e em letras maiúsculas, ocupando uma área igual à ocupada pelo nome comercial do produto ou tendo cada uma das letras altura de, no mínimo, 1/25 (um vinte e cinco avos) da maior altura do painel principal, com não menos que 3mm (três milímetros).

Art. 22. O painel principal ou secundário deve conter as seguintes indicações:

I - instruções sobre o uso do produto com as seguintes informações:

a) recomendações quanto à qualidade da água utilizada no preparo da solução de limpeza (pH, condutividade e dureza);

b) informações a respeito da diluição de uso do produto, que deve ser expressa em porcentagem, relação produto/diluyente ou seus equivalentes no Sistema Métrico Decimal;

c) temperatura e tempo de imersão;

d) a frase “A REUTILIZAÇÃO DO PRODUTO PODE PROVOCAR PERDA DA EFICIÊNCIA.”; e

e) a frase “UTILIZAR IMEDIATAMENTE APÓS O PREPARO. A REUTILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LIMPEZA PODE PROVOCAR PERDA DA EFICIÊNCIA.”.

II - informações sobre composição qualitativa e princípio ativo, obedecendo aos seguintes critérios:



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

a) na composição do produto, os princípios ativos (tensoativos e enzimas) e outros componentes de importância toxicológica devem ser indicados pelos seus nomes químicos aceitos internacionalmente e os demais componentes da formulação, por suas funções;

b) devem ser informados os teores dos tensoativos em porcentagem peso por peso;

c) a atividade enzimática mínima encontrada ao final do estudo de estabilidade deve ser expressa em Unidades de Atividade Enzimática, conforme definido nos Anexos I e II desta Resolução, e os valores devem ser representados por números inteiros, decimais ou exponenciais, sempre com arredondamento na segunda casa decimal depois da vírgula, e por meio da expressão designativa abaixo:

1. “Atividade Proteolítica mínima: __, __ UP.mL⁻¹.min⁻¹”; e

2. “Atividade Amilolítica mínima: __, __ UA.mL⁻¹.min⁻¹”.

III - faixa de pH do produto puro e na diluição de uso, quando este não for líquido;

IV - lote ou partida e data de fabricação;

V - prazo de validade, que deve ser descrito na rotulagem dos produtos por meio da seguinte expressão designativa, sua abreviação ou outra expressão equivalente:

a) “VÁLIDO ATÉ: (MÊS/ANO)”;

b) “VÁLIDO POR: ____ MESES, a partir da data de fabricação.”, incluindo “DATA DE FABRICAÇÃO (MÊS/ANO)”;

c) “USAR EM ____ MESES, a partir da data de fabricação.”, incluindo “DATA DE FABRICAÇÃO (MÊS/ANO)”.

VI - dados do fabricante, distribuidor e/ou importador com as seguintes informações:

a) razão social, endereço e Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica - CNPJ do fabricante, distribuidor e/ou importador;

b) a indicação “Indústria Brasileira” ou o nome do país de origem do produto, no caso de produto importado;



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

c) número do registro do produto;

d) número de telefone do Serviço de Atendimento ao Consumidor - SAC; e

e) telefone para emergências toxicológicas, Centro de Informação e Assistência Toxicológica - Ceatox ou serviço equivalente.

VII - indicações de advertência:

a) a frase: “ATENÇÃO! Provoca irritação ocular e cutânea. Usar luvas, avental, óculos e máscara de proteção durante a manipulação do produto.”;

b) o símbolo de substância irritante (Figura 1 desta Resolução), que deve ter altura equivalente a 15% (quinze por cento) da maior altura do painel principal e não inferior a 1cm (um centímetro) de altura;

c) a frase “Não misturar com outros produtos.”, exceto se tal procedimento estiver indicado pelo fabricante do produto no rótulo;

d) a frase “Mantenha o produto em sua embalagem original.”; e

e) a frase “Não reutilize as embalagens vazias.”.

VIII - as frases de precaução e primeiros socorros:

a) “Não ingerir. Evite inalação ou aspiração, contato com os olhos ou com a pele.”;

b) “Em caso de contato com os olhos ou a pele, lave imediatamente com água em abundância.”; e

c) “Em caso de ingestão, não provoque vômito e consulte imediatamente o Centro de Informação e Assistência Toxicológica - Ceatox ou o médico levando o rótulo do produto.”.

§ 1º A frase indicada na alínea d do inciso I do **caput** deste artigo deve estar em destaque, letras maiúsculas e é indicada para produtos de pronto uso, exceto para produtos na forma de aerossóis ou pulverizados.

§ 2º A frase indicada na alínea e do inciso I do **caput** deste artigo deve estar em destaque, letras maiúsculas e é indicada para produtos com diluição de uso.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

§ 3º O item 2 da alínea c do inciso II do **caput** deste artigo se aplica a produto com a presença de enzima da subclasse das amilases EC 3.2 na formulação.

§ 4º Na alínea e do inciso VI do **caput** deste artigo, o número do Disque Intoxicação 0800 722 6001, disponibilizado pela Anvisa, que coordena a Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica - Renaciat, pode ser informado.

§ 5º A frase indicada na alínea a do inciso VII do **caput** deste artigo pode ser omitida se for comprovado que o produto puro ou na diluição de uso, quando este não for líquido, enquadra-se na classificação dérmica e ocular primária como “não irritante” ou “levemente irritante”, de acordo com o teste de **Draize** em coelhos albinos ou através de ensaios **in vitro** devidamente validados e aceitos pela Autoridade Sanitária competente.

§ 6º O símbolo indicado na alínea b do inciso VII do **caput** deste artigo deve ser na cor preta em fundo branco e com moldura vermelha (no padrão CMYK: COM100Y100K0, referência: Pantone 485), mas pode ser omitido se for comprovado que o produto puro ou na diluição de uso, quando este não for líquido, enquadra-se na classificação dérmica e ocular primária como “não irritante” ou “levemente irritante”, de acordo com o teste de **Draize** em coelhos albinos ou através de ensaios **in vitro** devidamente validados e aceitos pela Autoridade Sanitária competente.

CAPÍTULO V
ENSAIOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Art. 23. Os ensaios de atividade enzimática devem obedecer ao disposto nos Anexos I e II desta Resolução.

Art. 24. A solicitação de inclusão e/ou exclusão, modificação ou adaptação aos métodos de ensaio de atividade enzimática estabelecidos nos Anexos I e II desta Resolução deve ser encaminhada à Anvisa para avaliação, na forma de relatório, contendo as seguintes informações:

I - justificativa técnica;

II - fundamento teórico da proposta;

III - bibliografia sobre o assunto; e

IV - protocolo e estudo final de validação, contemplado no mínimo os parâmetros de especificidade, seletividade, linearidade, intervalo, precisão, recuperação, robustez, limite de quantificação e exatidão.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

CAPÍTULO VI
DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 25. O descumprimento das determinações desta Resolução constitui infração de natureza sanitária sujeitando o infrator a processo e penalidades previstas na Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, ou instrumento legal que venha a substituí-la, sem prejuízo das responsabilidades penal e civil cabíveis.

Art. 26. Fica revogada a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 55, de 14 de novembro de 2012, publicada no Diário Oficial da União nº 224, de 21 de novembro de 2012, Seção 1, pág. 64.

Art. 27. Esta Resolução entra em vigor em 1º de junho de 2022.

MEIRUZE SOUSA FREITAS
Diretora-Presidente Substituta



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

FIGURA 1



ANEXO I

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA UTILIZANDO AZOCASEÍNA COMO SUBSTRATO EM
DETERGENTES ENZIMÁTICOS**

I - CONSIDERAÇÕES GERAIS:

- a) Todos os reagentes utilizados nos ensaios devem ser de grau analítico;
- b) Todos os ensaios devem ser realizados no mínimo em triplicata, utilizando um branco para cada amostra;
- c) São adotadas as seguintes condições padrões de ensaio:
 - 1. Temperatura de incubação: $(40 \pm 1)^{\circ}\text{C}$;
 - 2. Sistema tamponante: tris-HCl 0,05M pH 8,0;
 - 3. Tempo de reação: 15 minutos.

II - PRINCÍPIO:

- a) Este método se baseia na determinação da atividade proteolítica pela quantificação do grupamento azo liberado pela hidrólise do substrato cromogênico azocaseína.

III - EQUIPAMENTOS:

- a) Espectrofotômetro UV/VIS;
- b) Centrífuga para microtubos;
- c) Banho-termostático.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

IV - MATERIAL UTILIZADO:

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

V - REAGENTES:

- a) Tris (tris-hidroximetil-aminometano);
- b) Ácido clorídrico 37%;
- c) Ácido tricloroacético (TCA);
- d) Azocaseína.

VI - PREPARO DE SOLUÇÕES:

- a) Solução de ácido clorídrico 1 M

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

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

1. Dissolver 0,605g de tris em 90mL de água destilada. Adicionar HCl 1M até atingir o pH 8,0. Completar o volume para 100mL. Estocar a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ por no máximo uma semana.

- c) Substrato: Solução de azocaseína a 2% (m/v):

1. Dissolver 2g de azocaseína em 100mL de água destilada. Esta solução deve ser preparada no dia da análise.

- d) Solução de parada da reação: Solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v):



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

1. Dissolver 20g de ácido tricloroacético em 100mL de água destilada. Estocar a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ por no máximo uma semana.

VII - MÉTODO DE ENSAIO.

a) Preparo da amostra

1. A amostra deverá ser preparada na diluição de uso declarada pelo fabricante.

b) Ensaio da amostra:

1. Em um microtubo de 2mL, adicionar 200mL de tampão tris-HCl 0,05M e 100mL do substrato (azocaseína 2%);
2. Incubar em banho-termostático a $(40 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ e deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos);
3. Adicionar 100mL da amostra a temperatura ambiente, preparada conforme item VII a nos microtubos, em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições, e incubar no banho por 15 minutos na mesma temperatura;
4. Parar a reação adicionando 800mL de TCA 20% observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (15 minutos) seja o mesmo em todos os microtubos;
5. Em seguida, centrifugar os microtubos a 6000g (no mínimo) por 5 minutos, recolher o sobrenadante e ler em espectrofotômetro a 400nm;

c) Ensaio do branco da amostra:

1. Preparar um branco adicionando em um microtubo de 2mL, 200mL de tampão tris-HCl 0,05M, 100mL de azocaseína 2% e 800mL de TCA 20%;
2. Acondicionar em banho-termostático a $(40 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos);
3. Adicionar 100mL de amostra e deixar no banho por 15 minutos a mesma temperatura;
4. Em seguida centrifugar os microtubos a 6000g (no mínimo) por 5 minutos, recolher o sobrenadante e ler em espectrofotômetro a 400nm.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

VIII - RESULTADO.

a) Definição da Unidade de Atividade Proteolítica (UP.mL-1.min.-1):

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

b) Cálculo do resultado:

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

ONDE:	ABS _{AM}	absorbância da amostra.
	ABS _{BR}	absorbância do branco da amostra.

OBS.: caso a amostra não possa ser analisada na diluição de uso (em virtude da atividade proteolítica gerar uma densidade óptica maior do que o limite máximo de confiança do espectrofotômetro = 0,9), realizar diluição 5 vezes da amostra descrita no item VII a; se necessário, realizar diluições subsequentes (ex.: 10 vezes, 15 vezes, e assim sucessivamente).

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

ONDE:	ABS _{AM}	absorbância da amostra
	ABS _{BR}	absorbância do branco da amostra
	fd	fator de diluição

Para o cálculo da atividade, deve ser considerada somente a primeira diluição que apresentar resultado dentro da faixa de detecção do aparelho (a leitura da absorbância deve ficar entre 0,1 e 0,9).



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

ANEXO II

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA UTILIZANDO AMIDO SOLÚVEL COMO SUBSTRATO EM DETERGENTES ENZIMÁTICOS

I - CONSIDERAÇÕES GERAIS:

- a) Todos os reagentes utilizados nos ensaios devem ser de grau analítico;
- b) Todos os ensaios devem ser realizados no mínimo em triplicata, utilizando um branco para cada amostra;
- c) São adotadas as seguintes Condições Padrões de Ensaio:
 1. Temperatura de incubação: (40 ± 1)°C.
 2. Sistema tamponante: citrato-fosfato 0,05M pH 6,0.
 3. Tempo de reação: 30 minutos.

II - PRINCÍPIO:

- a) Este método baseia-se na determinação da atividade amilolítica pela quantificação dos açúcares redutores liberados pela reação de hidrólise do amido catalisada por amilases.

III - EQUIPAMENTOS:

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

IV - MATERIAL UTILIZADO:

- a) Béqueres;
- b) Balões volumétricos;
- c) Pipetas volumétricas de 15mL;



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

- d) Provetas;
- e) Micropipetas para volumes de 10 a 5000mL;
- f) Tubos de ensaio com capacidade mínima de 25mL com tampa;
- g) Cubetas para espectrofotômetro com 1cm de caminho óptico.

V - REAGENTES:

- a) Amido solúvel;
- b) Ácido cítrico;
- c) Fosfato de sódio dibásico;
- d) Glicose;
- e) Hidróxido de sódio;
- f) Tartarato de sódio e potássio;
- g) Metabissulfito de sódio;
- h) Fenol;
- i) Ácido 3,5-dinitrosalicílico;

VI - PREPARO DE SOLUÇÕES:

- a) Solução de ácido cítrico 0,05M: dissolver 1,05g de ácido cítrico em 100mL de água destilada.
- b) Solução de fosfato de sódio dibásico 0,05M: dissolver 1,38g de fosfato de sódio dibásico em 100mL de água destilada.
- c) Sistema tamponante (tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0): em um balão de 100mL, adicionar 36mL de ácido cítrico 0,05M e juntar com 64mL de fosfato de sódio dibásico 0,05M. Se necessário, corrigir o pH com uma destas soluções. Estocar a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ por no máximo uma semana.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

d) Substrato: Solução de amido solúvel 1% (m/v): dissolver 1g de amido em 100mL de água destilada, aquecer até a fervura, esfriar e completar o volume novamente para 100mL. Esta solução deve ser preparada no dia da análise.

e) Solução padrão de glicose 55,6 mmol.mL⁻¹ (1% m/v): dissolver 1g de glicose em 100mL de água destilada, considerando a pureza do reagente.

f) Reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (reagente DNS): em 236mL de água destilada adicionar 3,0g de hidróxido de sódio e dissolver até solubilização total. A partir desta solução, adicionar sequencialmente 51g de tartarato de sódio e potássio, 1,38g de metabissulfito de sódio, 0,63g de fenol e 1,77g de ácido 3,5-dinitrosalicílico.

OBS.: a adição de cada reagente deverá ser feita após a dissolução do reagente anterior.

VII - MÉTODO DE ENSAIO.

a) Curva analítica de glicose:

1. Transferir 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140mL da solução glicose a 55,6mmol.mL⁻¹ para tubos de ensaio com tampa;

2. Adicionar respectivamente 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480 e 460mL de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0, conforme tabela 1.

Tabela 1. Valores para construção da curva de calibração de glicose.

Tubo n°	Volume da solução de glicose 1% (mL)	Volume de tampão (mL)	Conc. final de glicose (mmol.mL ⁻¹)
0	0	600	0,000
1	20	580	0,06515
2	40	560	0,1303
3	60	540	0,1954
4	80	520	0,2609
5	100	500	0,3257
6	120	480	0,3909
7	140	460	0,4560

3. Adicionar 1,5mL de reagente DNS;

4. Em seguida ferver por 5 minutos em banho-maria;



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

5. Após os 5 minutos de fervura, resfriar os tubos transferindo-os para outro becker contendo água a temperatura ambiente;
6. Após resfriamento dos tubos de ensaio, adicionar 15mL de água destilada em cada tubo de ensaio;
7. Agitar os tubos de ensaio fechados;
8. Ler em espectrofotômetro a 550nm;
9. Construir uma curva analítica para glicose (concentração de glicose [mmol] vs. absorbância), utilizando o primeiro ponto como zero do equipamento, conforme tabela 1;
10. Construir a equação da reta, para cálculo posterior.

NOTA: a concentração de açúcares redutores será expressa em mmol. mL⁻¹ de glicose.

b) Preparo da amostra

1. A amostra deverá ser preparada na diluição de uso declarada pelo fabricante.

c) Ensaio da amostra:

1. Em um tubo de ensaio com tampa, adicionar 300mL de tampão citrato-fosfato 0,05M e 200mL de solução de amido solúvel 1%.
2. Incubar em banho-termostático a (40 ± 1)°C, deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos).
3. Realizar um branco para cada replicata, com adição de amostra, substituindo o volume do substrato por tampão. Este deve ser lido juntamente com a amostra;
4. Realizar um branco sem adição de amostra, substituindo o volume da amostra por tampão. Será utilizado para zerar o equipamento, no comprimento de onda do ensaio;
5. Adicionar em cada tubo de ensaio 100mL de amostra a temperatura ambiente, preparada conforme item VII b, em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições, e deixar no banho-termostático por 30 minutos;
6. Parar a reação adicionando 1,5mL de reagente DNS, observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (30 minutos) seja o mesmo em todos os tubos de ensaio.



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

7. Em seguida ferver por 5 minutos em banho-maria;
8. Após os 5 minutos de fervura, resfriar os tubos transferindo-os para outro becker contendo água a temperatura ambiente;
9. Após resfriamento dos tubos de ensaio, adicionar 15mL de água destilada em cada tubo de ensaio;
10. Agitar os tubos de ensaio fechados;
11. Ler em espectrofotômetro a 550nm;
12. Determinar a concentração de açúcares redutores utilizando a curva analítica de glicose.

VIII - RESULTADO.

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

1. Definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de açúcares redutores por mL por minuto, conforme condições descritas acima.

b) Cálculos:

$$x = \frac{y-b}{a} \Rightarrow C = \frac{(ABS_{AM} - ABS^*_{BR}) - b}{a}$$

ONDE:	C	concentração, em mol.ml ⁻¹
	(ABS _{AM})	valor da leitura na amostra, em nm
	(ABS* _{BR})	valor da leitura no branco, em nm
	b	coeficiente linear
	a	coeficiente angular

*Se a leitura do branco da amostra (sem substrato) for negativa, deve-se desconsiderar no cálculo.

Cálculo da atividade amilolítica:



Ministério da Saúde - MS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

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

ONDE:	<i>C</i>	concentração de açúcares redutores na amostra (Mmol), determinada através da curva analítica de glicose.
-------	----------	--

OBS.: caso a amostra não possa ser analisada na diluição de uso, por apresentar atividade maior do que a faixa analítica da curva presente no item VII a, realizar diluição 5 vezes da amostra descrita no item VII b; se necessário, realizar diluições subsequentes (ex.: 10 vezes, 15 vezes, e assim sucessivamente).

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

ONDE:	<i>C</i>	concentração de açúcares redutores na amostra (Mmol), determinada através da curva analítica de glicose.
	<i>fd</i>	fator de diluição da amostra, quando houver.

Para o cálculo da atividade, deve ser considerada somente a primeira diluição que apresentar resultado dentro da faixa de detecção da curva analítica.