

BIANCA CRISTINA CARVALHO REIS

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA KITS DE DIAGNÓSTICO *IN VITRO* PARA A DOSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS (NEFA) E ÁCIDOS BILIARES TOTAIS (TBA) POR BIOQUÍMICA LÍQUIDA COM APLICAÇÃO PARA SAÚDE HUMANA E VETERINÁRIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R375d
2022
Reis, Bianca Cristina Carvalho, 1998-
Desenvolvimento de formulações para kits de diagnóstico
in vitro para a dosagem de Ácidos Graxos Não Esterificados
(NEFA) e Ácidos Biliares Totais (TBA) por bioquímica líquida
com aplicação para saúde humana e veterinária / Bianca Cristina
Carvalho Reis. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (162 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 157-162.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.526>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ácidos graxos - Uso em diagnóstico. 2. Ácidos graxos
não esterificados. 3. Ácidos e sais biliares. 4. Fígado - Doenças -
Diagnóstico. 5. Hepatite - Diagnóstico. 6. Obesidade -
Diagnóstico. 7. Diabetes - Diagnóstico. I. Mendes, Tiago
Antônio de Oliveira, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 612.01577

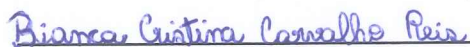
BIANCA CRISTINA CARVALHO REIS

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA KITS DE DIAGNÓSTICO *IN VITRO* PARA A DOSAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS (NEFA) E ÁCIDOS BILIARES TOTAIS (TBA) POR BIOQUÍMICA LÍQUIDA COM APLICAÇÃO PARA SAÚDE HUMANA E VETERINÁRIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de junho de 2022.

Assentimento:



Bianca Cristina Carvalho Reis
Autora



Tiago Antônio de Oliveira Mendes
Orientador

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmã, por todo apoio, carinho, amor incondicional e dedicação a fim de me proporcionar um ensino de qualidade durante todo meu período escolar.

A Deus por ter me concedido saúde e força e permitido trilhar meu caminho com sucesso e sabedoria.

Aos professores, em especial os professores João Paulo, Tiago e Raphael por todos os ensinamentos, paciência e disponibilidade para compartilhar o conhecimento, pelo apoio e confiança.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes nas mais difíceis decisões, oferecendo cumplicidade e apoio.

Aos grupos extracurriculares de que fiz parte, Tecnomol e PET Bioquímica, por me proporcionarem viver diversas situações que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos laboratórios de pesquisa que tive a oportunidade de estagiar e adquirir conhecimento e todos os pesquisadores nele envolvidos que tiveram a paciência de me ensinar.

A Universidade Federal de Viçosa por me proporcionar viver em um ambiente criativo e amigável, além de todo o exemplo de profissionais que tive a honra de conhecer e tudo que tive a oportunidade de aprender.

A empresa Biotécnica, pelo acolhimento e oportunidade de vivenciar novos ambientes e momentos que vão além de tudo conhecido e aprendido no ramo acadêmico.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

REIS, Bianca C. C., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Desenvolvimento de formulações para Kits de diagnóstico *in vitro* para a dosagem de Ácidos Graxos Não Esterificados (NEFA) e Ácidos Biliares Totais (TBA) por bioquímica líquida com aplicação para saúde humana e veterinária.** Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Os ácidos biliares totais (TBA) e os ácidos graxos não esterificados (NEFA) são metabólitos produtos do metabolismo do colesterol e triglicerídeos respectivamente. A alta concentração de TBA acomete o fígado e vesícula biliar, incitando doenças como colestases, hepatites, cirroses e esclerose do fígado. Já a alta concentração de NEFA possui correlação direta com o estado nutricional do organismo e é alterado em doenças como obesidade e diabetes tipo II. De modo geral, a quantificação desses analitos são de extrema importância para auxílio diagnóstico de diversas doenças hepatobiliares e metabólicas que acometem a saúde humana e animal. Devido a necessidade de diagnóstico precoce, rápido, fácil e prático, o objetivo desse trabalho buscou desenvolver duas formulações para kits de diagnóstico *in vitro* para quantificação de TBA e NEFA por bioquímica líquida. Além disso, do ponto de vista empresarial objetivou-se reduzir custos e nacionalizar tecnologia. A formulação desenvolvida para NEFA promove a quantificação do analito por meio de uma cascata de reações enzimáticas, o qual o seu produto pode ser dosado por colorimetria de forma específica frente aos principais interferentes endógenos. Enquanto a dosagem pela formulação de TBA ocorreu por leitura espectrofotométrica da formação de ThioNAD em ciclos de oxidação e redução enzimática. Para o desenvolvimento de ambas as formulações foram realizadas pesquisas bibliográficas e ensaios de otimização para melhoramento de performance para atingir os parâmetros determinados e exigidos no mercado de diagnóstico *in vitro* para cada analito. Sendo assim, houve mudanças na composição e concentrações para atingir melhor exatidão, robustez frente aos interferentes endógenos comuns, determinação de intervalo operacional e estabilidade. A formulação de TBA foi finalizada com sucesso enquanto a formulação de NEFA ainda necessita de modificações para melhorar o desempenho de estabilidade. Contudo, ambas demonstraram bom desempenho, de forma se tornar

potencialmente competitiva, compatível ao mercado e útil no auxílio diagnóstico *in vitro* de relevância clínica animal e humana.

Palavras-chave: Ácidos graxos não esterificados. NEFA. Ácidos biliares totais (TBA). Doenças metabólicas. Doenças hepatobiliares. Diagnóstico *in vitro*.

ABSTRACT

REIS, Bianca C. C., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Development of formulations for *in vitro* diagnostic kits for the measurement of Non-esterified Fatty Acids (NEFA) and Total Bile Acids (TBA) by liquid biochemistry with application in human and veterinary health.** Advisor: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Total bile acids (TBA) and non-esterified fatty acids (NEFA) are metabolites of cholesterol and triglyceride metabolism, respectively. The high concentration of TBA affects the liver and gallbladder, inciting diseases such as cholestasis, hepatitis, cirrhosis and liver sclerosis. The high concentration of NEFA has a direct correlation with the nutritional status of the body and is altered in diseases such as obesity and type II diabetes. In general, the quantification of these analytes is extremely important to aid in the diagnosis of several hepatobiliary and metabolic diseases that affect human and animal health. Due to the need for early, fast, easy and practical diagnosis, the objective of this work sought to develop two formulations for *in vitro* diagnostic kits for quantification of TBA and NEFA by liquid biochemistry. Furthermore, from the business point of view, the objective was also to reduce costs and nationalize technology. The formulation developed for NEFA promotes the quantification of the analyte through a cascade of enzymatic reactions, in which its product can be dosed by colorimetry in a specific way against the main endogenous interferents. While the dosage by the TBA formulation occurs by spectrophotometric reading of the formation of ThioNAD in cycles of enzymatic oxidation and reduction. For the development of both formulations, bibliographic research and optimization tests were carried out to improve performance to achieve the parameters determined and required in the *in vitro* diagnostic market for each analyte, so there were changes in the composition and concentrations to achieve better accuracy, robustness against common endogenous interferents, determination of operational range and stability. The TBA formulation was successfully completed while the NEFA still needs modifications to improve stability performance. However, both showed good performance, in order to become potentially competitive, compatible to the market and useful in aiding *in vitro* diagnostics of animal and human clinical relevance.

Keywords: Non-esterified fatty acids. NEFA. Total bile acids. TBA. Metabolic diseases. Hepatobiliary diseases. *In vitro* diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Síntese e metabolismo de ácidos biliares em humanos.....	21
Figura 2 – Princípio do método enzimático cíclico	26
Figura 3 – Processo de mobilização de lipídeos	28
Figura 4 – Esquema de alterações determinadas por concentrações alteradas de NEFA.....	29
Figura 5 – Reação enzimática para mensuração de NEFA	33
Figura 6 – Resumo da metodologia utilizada para TBA	40
Figura 7 – Resumo da metodologia utilizada para NEFA.....	40
Figura 8 – Esquema do funcionamento de um kit diagnóstico	41
Figura 9 – Esquema da determinação da primeira formulação de TBA	42
Figura 10 – Esquema de avaliação de desempenho da formulação inicial.....	43
Figura 11 – Esquema de avaliação da concentração de ThioNAD e NADH	44
Figura 12 – Esquema da avaliação da concentração da enzima 3HSD.....	45
Figura 13 – Esquema da avaliação dos Tampões para a solução 1 e 2 que compõem o kit de diagnóstico in vitro de TBA	46
Figura 14 – Esquema do estudo dos comprimentos de onda do ensaio de TBA.....	47
Figura 15 – Esquema do estudo do dobro da concentração de cada componente da formulação.....	47
Figura 16 – Esquema da exatidão do ensaio de TBA	48
Figura 17 – Esquema do estudo dos interferentes no ensaio de TBA	49
Figura 18 – Ensaio de sensibilidade analítica	53
Figura 19 – Ensaio de determinação do intervalo operacional do produto.....	54
Figura 20 – Estudo da Estabilidade do produto.....	56
Figura 21 – Estudo dos agentes quelantes na formulação de TBA.....	57
Figura 22 – Estudo dos agentes redutores	58
Figura 23 – Estudo dos compostos S e G na formulação do produto	58
Figura 24 – Estudo da presença de sal, solvente orgânico e detergente na formulação de TBA	59
Figura 25 – Estudo do pH da solução 1 de TBA	59
Figura 26 – Estudo do pH da solução 2 de TBA	60
Figura 27 – Determinação da formulação final de TBA.....	60
Figura 28 – Esquema do funcionamento de um kit diagnóstico de NEFA.....	61
Figura 29 – Determinação da formulação e padronização da reação de NEFA	62
Figura 30 – Levantamento bibliográfico para formulação inicial de NEFA	63
Figura 31 – Avaliação da formulação de NEFA em tampão, solvente orgânico e água	64

Figura 32 – Teste da concentração da enzima ACOD na formulação de NEFA.....	65
Figura 33 – Teste da concentração da enzima ACS na formulação de NEFA.....	66
Figura 34 – Teste de cofatores enzimáticos na formulação de NEFA.....	66
Figura 35 – Teste do composto N na formulação de NEFA	67
Figura 36 – Adição de compostos para diminuir interferência de ácido ascórbico e triglicérides na formulação de NEFA	68
Figura 37 – Estudo da estabilidade acelerada da formulação de NEFA	70
Figura 38 – Avaliação do composto F e B na formulação de NEFA.....	71
Figura 39 – Avaliação da concentração do composto F na formulação de NEFA....	71
Figura 40 – Avaliação de surfactantes na formulação de NEFA	72
Figura 41 – Aspecto visual Solução 1/Solução 2 Formulação Base X Concorrente G	75
Figura 42 – Aspecto visual Solução 1/Solução 2 Formulação Base X Concorrente B	124
Figura 43 – Aspecto visual da Solução 2 pós estufa.....	147
Figura 44 – Aspecto visual do Solução 2 pré e pós estufa do composto B.....	149
Figura 45 – Aspecto visual do Solução 2 pré e pós estufa do composto F	149
Gráfico 1 – Perfil reacional de TBA	73
Gráfico 2 – Perfil reacional da Formulação 1 a 16 X concorrente G	86
Gráfico 3 – Perfil reacional das formulações X/2, X e 2X contra concorrente G	88
Gráfico 4 – Perfil reacional do dobro da concentração dos componentes da solução 1 e 2 do TBA	96
Gráfico 5 – Dispersão dos erros relacionados a quantificação de TBA.....	98
Gráfico 6 – Correlação da quantificação TBA	99
Gráfico 7 – Correlação entre as determinações teóricas e obtidas da formulação de TBA	105
Gráfico 8 – Dispersão de erro das determinações	105
Gráfico 9 – Avaliação da estabilidade 37°C da Solução 1.....	108
Gráfico 10 – Avaliação da estabilidade 37°C da Solução 2.....	109
Gráfico 11 – Avaliação da estabilidade 37° C da formulação com adição de quelantes	111
Gráfico 12 – Avaliação da estabilidade 37°C da formulação com adição de agente redutores	113
Gráfico 13 – Avaliação da estabilidade 37°C da formulação com adição de composto G e S	114
Gráfico 14 – Avaliação da estabilidade 37°C da formulação com adição de sal, solvente e detergente	116
Gráfico 15 – Avaliação da estabilidade do Solução 1 em pH 3,5 e 4,5.....	117

Gráfico 16 – Avaliação da estabilidade do Solução 2 em pH 8,5 e 9,5.....	118
Gráfico 17 – Avaliação da estabilidade da formulação final de TBA a 37° C	120
Gráfico 18 – Perfil reacional de NEFA.....	123
Gráfico 19 – Perfil reacional de NEFA e tampões	126
Gráfico 20 – Desempenho da formulação com diferentes Solvente Orgânico e água	129
Gráfico 21 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACOD	131
Gráfico 22 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACS	133
Gráfico 23 – Desempenho da formulação com diferentes cofatores.....	135
Gráfico 24 – Desempenho da formulação com ou sem o composto N	137
Gráfico 25 – Dispersão dos erros relacionados a quantificação de NEFA	144
Gráfico 26 – Correlação da quantificação NEFA.....	145
Gráfico 27 – Dispersão de erro das determinações	146
Gráfico 28 – Correlação entre as determinações	147
Gráfico 29 – Reação após armazenamento a 37°.....	148
Gráfico 30 – Reação da formulação com composto B e F após armazenamento a 37° C.....	150
Gráfico 31 – Reação da formulação com composto ½ F e 2F após armazenamento a 37° e 1/2F após 7 dias de estufa.....	151
Gráfico 32 – Reação da formulação com surfactante A,B,C e D após armazenamento a 37° C	153
Gráfico 33 – Reação da formulação final após armazenamento a 37° C	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturas dos ácidos biliares mais comuns nos organismos	22
Tabela 2 – Vantagens e desvantagens dos métodos mais utilizados na mensuração de TBA	25
Tabela 3 – Concentrações fisiológicas e patológicas de NEFA no soro humano e bovino conforme diferentes condições do organismo	29
Tabela 4 – Estruturas dos ácidos graxos não esterificados mais comuns nos organismos animal e humano	29
Tabela 5 – Avaliação de ácido ascórbico	50
Tabela 6 – Avaliação de hemoglobina	50
Tabela 7 - Avaliação de triglicérides.....	50
Tabela 8 - Avaliação de bilirrubina	51
Tabela 9 – Proporção de preparo de diluições de linearidade	54
Tabela 10 – Primeira formulação proposta para o kit de quantificação deTBA, com base na literatura.....	72
Tabela 11 – Parâmetros de reação para realização dos testes	73
Tabela 12 – Desempenho inicial da formulação base frente ao concorrente G	76
Tabela 13 – Desempenho Formulação 1 e 2 contra concorrente G.....	78
Tabela 14 – Desempenho Formulação 3 e 4 contra concorrente G.....	79
Tabela 15 – Desempenho Formulação 5 e 6 contra concorrente G.....	80
Tabela 16 – Desempenho Formulação 7 e 8 contra concorrente G.....	81
Tabela 17 – Desempenho Formulação 9 e 10 contra concorrente G.....	82
Tabela 18 – Desempenho Formulação 11 e 12 contra concorrente G.....	83
Tabela 19 – Desempenho Formulação 13 e 14 contra concorrente G.....	84
Tabela 20 – Desempenho Formulação 15 e 16 contra concorrente G.....	85
Tabela 21 – Desempenho concentrações de 3HSD contra concorrente G	87
Tabela 22 – Desempenho dos tampões testados para a Solução 1	89
Tabela 23 – Desempenho dos tampões testados para a Solução 2	90
Tabela 24 – Desempenho formulações monocromática e bicromática	92
Tabela 25 – Dobro da concentração de cada componente da Solução1 de TBA	93
Tabela 26 – Dobro da concentração de cada componente da Solução 2 de TBA	93
Tabela 27 – Desempenho do dobro da concentração de cada componente da Solução 1 de TBA	94
Tabela 28 – Desempenho do dobro da concentração de cada componente da Solução 2 de TBA	95
Tabela 29 – Formulação modificada de TBA	97
Tabela 30 – Parâmetros modificados para reação de TBA.....	97

Tabela 31 – Média das determinações de TBA no ensaio de exatidão em soro.....	98
Tabela 32 – Concentrações de TBA obtidas pela equação gerada	100
Tabela 33 – Determinação da interferência de ácido ascórbico.....	101
Tabela 34 – Determinação da interferência de hemoglobina	101
Tabela 35 – Determinação da interferência de triglicérides	102
Tabela 36 – Determinação da interferência de bilirrubina	103
Tabela 37 – Determinação do LoQ da formulação modificada de TBA.....	104
Tabela 38 – Comparação de desempenho da formulação TBA desenvolvida com as principais marcas concorrentes.....	106
Tabela 39 – Avaliação da estabilidade da formulação de TBA modificada	107
Tabela 40 – Avaliação da estabilidade da formulação modificada	108
Tabela 41 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante A	110
Tabela 42 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante B	110
Tabela 43 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante C	110
Tabela 44 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante D	111
Tabela 45 – Avaliação da estabilidade da formulação com agente redutor E	112
Tabela 46 – Avaliação da estabilidade da formulação com agente redutor F	112
Tabela 47 – Avaliação da estabilidade da formulação com agente redutor G.....	112
Tabela 48 – Avaliação da estabilidade da formulação com composto G	114
Tabela 49 – Avaliação da estabilidade da formulação com composto S.....	114
Tabela 50 – Avaliação da estabilidade da formulação com adição de sal	115
Tabela 51 – Avaliação da estabilidade da formulação com adição de detergente ..	115
Tabela 52 – Avaliação da estabilidade da formulação com adição de solvente orgânico	116
Tabela 53 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 1 em pH 3,5.....	117
Tabela 54 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 1 em pH 4,5.....	117
Tabela 55 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 2 em pH 8,5.....	118
Tabela 56 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 2 em pH 9,5.....	118
Tabela 57 – Composição formulação final de TBA	119
Tabela 58 – Avaliação da estabilidade da formulação final de TBA a 37° C.....	120
Tabela 59 – Avaliação da formulação final de TBA.....	121
Tabela 60 – Primeira formulação proposta para o kit de quantificação de NEFA, com base na literatura.....	122
Tabela 61 – Parâmetros de reação para realização dos testes de NEFA.....	123
Tabela 62 – Desempenho inicial da formulação base frente ao concorrente B.....	125
Tabela 63 – Desempenho da formulação com diferentes tampões.	127
Tabela 64 – Desempenho da formulação com diferentes Solvente Orgânico e água	128

Tabela 65 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACOD	130
Tabela 66 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACS..	132
Tabela 67– Desempenho da formulação com diferentes cofatores enzimáticos.....	134
Tabela 68 – Desempenho da formulação com ou sem o composto N	136
Tabela 69 – Determinação da interferência de ácido ascórbico.....	137
Tabela 70 – Determinação da interferência de triglicérides	138
Tabela 71 – Determinação da interferência de hemoglobina	138
Tabela 72 – Determinação da interferência de bilirrubina	139
Tabela 73 – Determinação da interferência de ácido ascórbico ½ AO.....	139
Tabela 74 – Determinação da interferência de ácido ascórbico AO.....	140
Tabela 75 – Determinação da interferência de ácido ascórbico 2AO.....	140
Tabela 77 – Determinação da interferência de triglicérides com a formulação com dobro detergente 1	141
Tabela 78 – Determinação da interferência de triglicérides com a formulação com detergente 2	141
Tabela 79 – Determinação da interferência de triglicérides com a formulação com dobro de detergente 2	141
Tabela 80 – Determinação da dosagem de NEFA com adição de Ascorbato Oxidase (AO).....	142
Tabela 81 – Determinação da dosagem de NEFA com adição de detergente.....	142
Tabela 82 – Formulação modificada para NEFA.....	143
Tabela 83 – Avaliação da formulação modificada de NEFA.....	144
Tabela 84 – Concentrações de NEFA obtidas pela equação gerada.....	145
Tabela 85 – Determinação do LoQ da formulação modificada de NEFA	145
Tabela 86 – Estabilidade Formulação modificada NEFA	148
Tabela 87 – Estabilidade Formulação com composto B	150
Tabela 88 – Estabilidade Formulação com composto F.....	150
Tabela 89 – Estabilidade Formulação com ½ F	151
Tabela 90 – Estabilidade Formulação com 2 F	151
Tabela 91 – Estabilidade Formulação com 1/2 F por 7 dias a 37º C.....	152
Tabela 92 – Estabilidade Formulação com surfactante A	153
Tabela 93 – Estabilidade Formulação com surfactante B	153
Tabela 94 – Estabilidade Formulação com surfactante C	153
Tabela 95 – Estabilidade Formulação com surfactante D	154
Tabela 96 – Formulação final para NEFA	154
Tabela 97 – Estabilidade Formulação Final de NEFA.....	155

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

TBA	Ácidos Biliares Totais
NEFA	Ácidos Graxos não esterificados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BA	Ácidos Biliares
CA	Ácido Cólico
CDCA	Ácido quenodesoxicólico
POP	Procedimento Operacional Padrão
AA	Amostra Alta
AB	Amostra Baixa
LoB	Limite do Branco
LoQ	Limite de Quantificação
LoD	Limite de Detecção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. ÁCIDOS BILIARES TOTAIS (TBA)	20
2.2. IMPORTÂNCIA DO TBA E DOENÇAS CORRELACIONADAS	22
2.3. METODOLOGIA DE MENSURAÇÃO DE TBA.....	24
2.4. ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS (NEFA)	26
2.5. IMPORTÂNCIA DO NEFA E DOENÇAS CORRELACIONADAS.....	28
2.6. METODOLOGIAS DE MENSURAÇÃO DE NEFA.....	31
2.7. DIAGNÓSTICO <i>IN VITRO</i> E REGULAMENTAÇÕES ANVISA E MAPA	33
3. JUSTIFICATIVA	36
4. OBJETIVOS	38
4.1. OBJETIVO GERAL	38
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1. FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE TBA.....	41
5.1.1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE TBA.....	41
5.1.2. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO INICIAL.....	42
5.2 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE TBA.....	43
5.2.1 ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS	44
5.2.1.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE THIONAD e NADH	44
5.2.1.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA 3HSD	45
5.2.1.3 DETERMINAÇÃO TAMPÃO DA SOLUÇÃO 1 E SOLUÇÃO 2	45
5.2.1.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO EM ENSAIO MONOCROMÁTICO E BICROMÁTICO	46
5.2.1.5 ENSAIO DO DOBRO DA CONCENTRAÇÃO DE CADA COMPONENTE DA FORMULAÇÃO	47
5.3 VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DO DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE TBA.....	48
5.3.1 PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA	48
5.3.2 AVALIAÇÃO DE INTERFERENTES NA FORMULAÇÃO DE TBA	49
5.3.2.1 TESTE DE INTERFERENCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO	49
5.3.2.2 TESTE DE INTERFERENCIA DA HEMOGLOBINA.....	50
5.3.2.3 TESTE DE INTERFERENCIA DE TRIGLICÉRIDES	50
5.3.2.4 TESTE DE INTERFERENCIA DE BILIRRUBINA	51
5.3.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA DE TBA.....	51
5.3.4 DETERMINAÇÃO DO INTERVALO OPERACIONAL DA FORMULAÇÃO DE TBA.....	53
5.3.5 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA	55
5.3.5.1 ESTABILIDADE ACELERADA.....	55

5.3.5.2	ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO ..	56
5.3.5.2.1	AGENTES QUELANTES	57
5.3.5.2.2	AGENTES REDUTORES.....	57
5.3.5.2.3	AVALIAÇÃO DO COMPOSTOS S e G.....	58
5.3.5.2.4	SAL, SOLVENTE ORGÂNICO E DETERGENTE.....	59
5.3.5.2.5	ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 1	59
5.3.5.2.6	ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 2	60
5.4	DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA.....	60
5.4.1	ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL.....	61
5.4.2	AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL	61
5.5	FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE NEFA.....	61
5.5.1	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE NEFA	61
5.5.1	AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA	62
5.6	OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA	63
5.6.1	DETERMINAÇÃO DO TAMPÃO OU SOLVENTE ORGÂNICO DA FORMULAÇÃO.....	64
5.6.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS DA REAÇÃO	65
5.6.2.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACOD	65
5.6.2.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACS	65
5.6.2.3	DETERMINAÇÃO DO COFATOR ENZIMÁTICO.....	66
5.6.3	AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO COMPOSTO N NO REAGENTE DE NEFA	66
5.7	VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE NEFA	67
5.7.1	PRÉVIA DA ESPECIFICIDADE ANALÍTICA NEFA.....	67
5.7.1.1	TESTE DE INTERFERÊNCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO	67
5.7.1.2	TESTE DE INTERFERÊNCIA DE TRIGLICÉRIDES.....	67
5.7.1.3	TESTE DE INTERFERÊNCIA DE HEMOGLOBINA.....	67
5.7.1.4	TESTE DE INTERFERÊNCIA DE BILIRRUBINA	67
5.7.2	ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR PERFORMANCE.....	68
5.7.3	PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA	68
5.7.4	PRÉVIA DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA	69
5.7.5	PRÉVIA DA DETERMINAÇÃO DO INTERVALO OPERACIONAL DA FORMULAÇÃO DE NEFA	69
5.7.6	ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO DE NEFA.....	69
5.7.6.1	ESTABILIDADE ACELERADA.....	69
5.8	TESTES PARA MELHORAR A ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO	70
5.8.1	ADIÇÃO DO COMPOSTO F e B NA FORMULAÇÃO DE NEFA PARA PREVINIR PRECIPITAÇÃO.....	70
5.8.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO F NA FORMULAÇÃO	71
5.8.3	DETERMINAÇÃO DE SURFACTANTES	71
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
6.1	FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE TBA.....	72

6.1.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE TBA.....	72
6.1.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO INICIAL.....	74
6.2 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE TBA.....	77
6.2.1 ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS.....	77
6.2.1.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE THIONAD e NADH.....	77
6.2.1.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA 3HSD.....	86
6.2.1.3 DETERMINAÇÃO DO TAMPÃO SOLUÇÃO 1 E SOLUÇÃO 2.....	88
6.2.1.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO EM ENSAIO MONOCROMÁTICO E BICROMÁTICO.....	91
6.2.1.5 ENSAIO DO DOBRO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO.....	93
6.3 VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE TBA.....	96
6.3.1 PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA.....	97
6.3.2 AVALIAÇÃO DE INTERFERENTES NA FORMULAÇÃO DE TBA.....	100
6.3.2.1 TESTE DE INTERFERENCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....	100
6.3.2.2 TESTE DE INTERFERENCIA DE HEMOGLOBINA.....	101
6.3.2.3 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE TRIGLICÉRIDES.....	102
6.3.2.4 TESTE DE INTERFERENCIA DE BILIRRUBINA.....	102
6.3.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANALITICA DE TBA.....	103
6.3.4 DETERMINAÇÃO DO INTERVALO OPERACIONAL DA FORMULAÇÃO DE TBA.....	104
6.3.5 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA.....	106
6.3.5.1 ESTABILIDADE ACELERADA.....	107
6.3.5.2 ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO.....	109
6.3.5.2.1 AGENTES QUELANTES.....	109
6.3.5.2.2 AGENTES REDUTORES.....	112
6.3.5.2.3 AVALIAÇÃO DO COMPOSTO S e G.....	113
6.3.5.2.4 SAL, SOLVENTE ORGÂNICO E DETERGENTE.....	115
6.3.5.2.5 ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 1.....	116
6.3.5.2.6 ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 2.....	118
6.4 DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA.....	119
6.4.1 ESTABILIDADE ACELERADA DA FORMULAÇÃO FINAL.....	119
6.4.2 AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL.....	120
6.5 FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE NEFA.....	122
6.5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE NEFA.....	122
6.5.1 AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA.....	123
6.6 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA.....	126
6.6.1 DETERMINAÇÃO DO TAMPÃO OU SOLVENTE ORGÂNICO DA FORMULAÇÃO.....	126
6.6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS DA REAÇÃO.....	129

6.6.2.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACOD	129
6.6.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACS	131
6.6.2.2 DETERMINAÇÃO DO COFATOR ENZIMÁTICO	133
6.6.3 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO COMPOSTO N NO REAGENTE DE NEFA	135
6.7 VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE NEFA	137
6.7.1 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA.....	137
6.7.1.1 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO	137
6.7.1.2 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE TRIGLICÉRIDES.....	138
6.7.1.3 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE HEMOGLOBINA.....	138
6.7.1.4 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE BILIRRUBINA	139
6.7.2 ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR PERFORMANCE DE INTERFERÊNCIA	139
6.7.3 PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA	143
6.7.4 PRÉVIA DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA	145
6.7.5 PRÉVIA DA LINEARIDADE ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA	145
6.7.6 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO DE NEFA.....	147
6.7.6.1 ESTABILIDADE ACELERADA.....	147
6.8 TESTES PARA MELHORAR A ESTABILIDADE.....	148
6.8.1 ADIÇÃO DO COMPOSTO F e B NA FORMULAÇÃO DE NEFA PARA PREVINIR PRECIPITAÇÃO.....	148
6.8.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO F NA FORMULAÇÃO	150
6.8.3 DETERMINAÇÃO DE SURFACTANTES	152
6.8.3 DETERMINAÇÃO ESTABILIDADE FORMULAÇÃO FINAL.....	154
7. CONCLUSÃO.....	156
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

1. INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica exerce papel fundamental no diagnóstico laboratorial uma vez que são responsáveis por desenvolver diversos produtos relacionados à saúde e bem-estar populacional e animal. No Brasil, os produtos relacionados a saúde e consumo humano devem ser submetidos junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para avaliação do cumprimento das obrigações legais e para consumo animal devem ser submetidos junto ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O diagnóstico *in vitro* é um segmento muito importante da indústria farmacêutica uma vez que visa auxiliar o diagnóstico e prognóstico das diversas doenças que acometem humanos e animais.

Visando a importância do diagnóstico de doenças hepatobiliares e metabólicas como cetoses, colestases, cirroses, obesidade e diabetes, e juntamente com a necessidade de nacionalizar tecnologia de detecção e quantificação dos principais analitos, de alteração no caso das doenças descritas: Ácidos Biliares Totais (TBA) e Ácidos graxos não esterificados (NEFA), esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de duas novas formulações para composição de dois kits de diagnóstico *in vitro* para ensaios de avaliação dos analitos que atendam os parâmetros regulatórios para serem posteriormente comercializados para a clínica veterinária e humana, de modo a atuar no diagnóstico e prognóstico das diversas doenças de interesse, atuando na melhora da qualidade de vida dos pacientes acometidos pelas determinadas doenças.

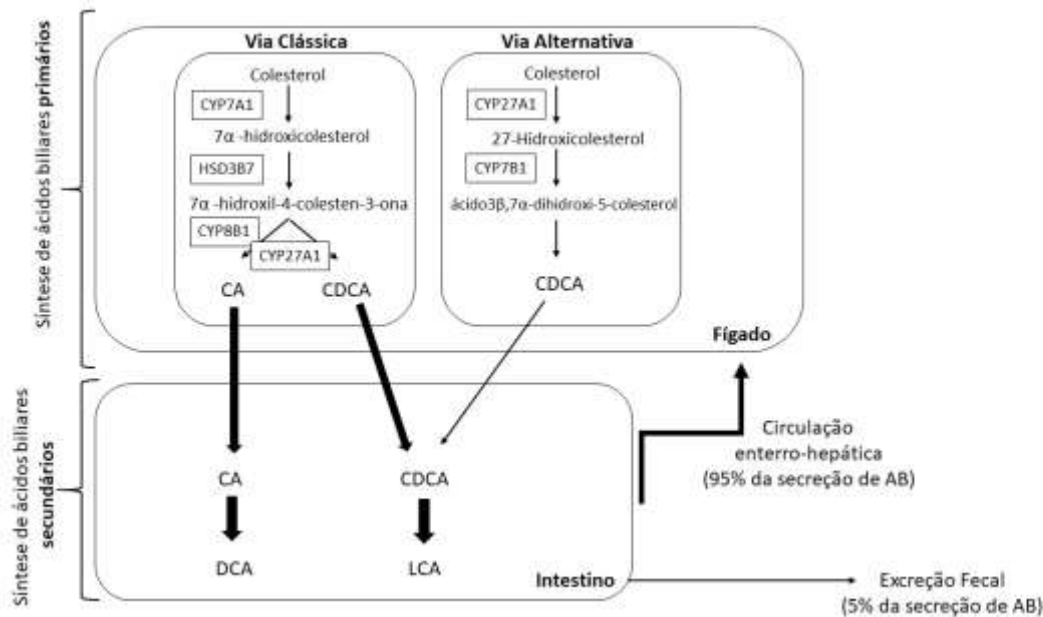
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ÁCIDOS BILIARES TOTAIS (TBA)

Ácidos Biliares (BA) são um grupo de metabólitos produtos do metabolismo do colesterol (ZHANG et al., 2004). A síntese de ácidos biliares ocorre majoritariamente no fígado (FRANCESCHINA, 2015). O processo ocorre a partir de oxidação catalítica de colesterol no fígado cujos produtos são direcionados ao intestino onde são metabolizados pela microbiota (LIU et al., 2018).

De modo geral, existem duas vias pela qual a síntese pode acontecer: a via clássica e a via alternativa (Figura 1). A via clássica é iniciada pelo citocromo CYP7A1 no retículo endoplasmático dos hepatócitos. Nesse compartimento acontece a catálise do colesterol em 7- α -hidroxicolesterol produzindo 7- α -hidroxi-4-colesten-3-ona (C4) sob a catálise por 3 β -hidroxi- Δ 5-C27-hidroxisteroide dehidrogenase (HSD3B7) nos microsomas. Após uma série de reações, catalisada por CYP8B1 o ácido cólico (CA) é gerado. Sem o metabolismo de CYP8B1, C4 pode ser transformado em ácido quenodesoxicólico (CDCA) pela enzima CYP7A1. Na via alternativa, a produção de CDCA ocorre pela catálise de CYP27A1 e CYP7B1. A via clássica corresponde 90% da síntese de Ácidos Biliares enquanto que a via alternativa corresponde a 10%, em um organismo sob condições normais. CA e CDCA após a síntese são ligados principalmente a taurina e glicina para formação de ácidos biliares que são direcionados para o duodeno pelo ducto biliar. Dentro do intestino, três reações ocorrem pela microbiota: desconjugação que hidrolisa os grupos taurina e glicina em ácidos biliares, seguida por epimerização e desidroxilação que atua nos ácidos biliares primários livres. Como resultado os ácidos biliares primários são convertidos em ácidos biliares secundários, sendo principalmente o ácido desoxicólico (DCA) e ácido litocólico (LCA). Os ácidos biliares primários e secundários sofrem reações como sulfatação, esterificação e glicosilação. Cerca de 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos através de transportadores específicos no final do cólon e transportados para o fígado e 5% excretados na urina. Os ácidos biliares livres no fígado se associam novamente em taurina e glicina e então fluem para o trato intestinal pelo ducto biliar, processo conhecido como circulação entero-hepática de ácidos biliares e garante a utilização eficiente dos BAs (Figura 1) (LIU et al., 2018).

Figura 1 – Síntese e metabolismo de ácidos biliares em humanos

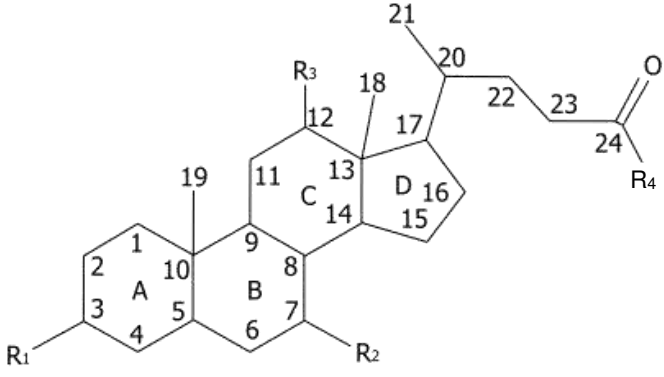


Fonte:(LIU et al., 2018) adaptado. Processo de oxidação catalítica do colesterol no fígado cujos produtos são os ácidos biliares primários que posteriormente são direcionados para o intestino onde são metabolizados e dão origem aos metabólitos secundários. A imagem também retrata a circulação entero-hepática demonstrando a reutilização e excreção dos ácidos biliares.

A síntese de ácidos biliares é a principal via de metabolismo do colesterol na maior parte dos organismos de diferentes espécies (SHARMA, 2012). Após a conjugação com os aminoácidos taurina e glicina, os ácidos biliares podem ser armazenados na vesícula biliar e liberado no lúmen do intestino quando alimento é ingerido. De modo geral 800 mg de colesterol são produzidos no organismo por dia e metade é usado para síntese de ácidos biliares e no total cerca de 30 g de ácidos biliares são secretados no intestino por dia (SHARMA, 2012). A regulação da síntese de ácidos biliares ocorre por uma regulação negativa inibindo atividade do CYP7A1 ou CYP8B1 e CYP27A1, enzimas do citocromo P450 responsáveis pela metabolismo de BAs (MONTE et al., 2009).

Em termos de estrutura química, os ácidos biliares são compostos com 24 carbonos em que derivam de um sistema de hidrocarboneto tetracíclico saturado perhidrociclopentanofenantreno, conhecido como núcleo esteroide, comum em outros compostos como os hormônios. Além disso, os compostos estão majoritariamente conjugados com glicina (75%) e taurina (25%) (MONTE et al., 2009). As estruturas dos ácidos biliares comuns podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Estruturas dos ácidos biliares mais comuns nos organismos

Esqueleto Esteróide				
Nome	R1	R2	R3	R4
Ácido Colânico	H	H	H	OH
Ácido Cólico	OH	OH	OH	OH
Ácido quenodesoxicólico	OH (α)	OH (α)	H	OH
Ácido desoxicólico	OH	OH	OH	OH
Ácido litocólico	OH	H	H	OH
Glicocolato	OH	OH	OH	NHCH ₂ COO-
Taurocolato	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ -

Fonte: (MONTE et al., 2009) adaptado. É representado a estrutura geral de um ácido biliar e os grupamentos componentes das cadeias laterais R1, R2, R3 e R4.

Muitas das propriedades funcionais dos ácidos biliares estão relacionados com sua natureza anfipática estrutural, na qual existe uma face hidrofílica (face α , face inferior côncava) e uma face hidrofóbica (face β , face superior convexa). O caráter hidrofílico é devido a presença da cadeia lateral carboxílica e os grupos hidroxilas, enquanto que os grupos metil conferem o caráter hidrofóbico, o que possibilita formação de micelas em soluções (MONTE et al., 2009).

2.2. IMPORTÂNCIA DO TBA E DOENÇAS CORRELACIONADAS

Em pessoas saudias, a variação da concentração de ácidos biliares é comum de modo que aumenta de 20 mmol/L até 50 mmol/L no canal biliar e pode atingir 300 mmol/L na vesícula biliar. No sangue periférico, varia de 20 μ mol/L para 50 μ mol/L e

no sangue arterial de 3 a 5 $\mu\text{mol/L}$ durante o jejum, enquanto que após a alimentação a concentração aumenta.

Os ácidos biliares desempenham diversas funções no organismo, como por exemplo serem principal forma de excreção de colesterol nos mamíferos, uma vez que não é possível transformá-lo em dióxido de carbono e água. Além disso, pela natureza de sua estrutura, são compostos de função digestiva, atuando no preparo dos triglicerídeos da dieta para a hidrólise pela lipase pancreática por ação emulsificante ao formar micelas (FRANCESCHINA, 2015). Dessa forma, é notável que a principal função desse grupo de compostos é a capacidade digestiva das moléculas quanto a gordura da dieta e as vitaminas lipossolúveis.

Altas concentrações intracelulares de TBA geralmente são encontrados em pacientes com doenças hepatobiliares como a colestase. As concentrações anormais de TBA estão relacionados com estresse oxidativo e apoptose tanto no fígado adulto como fetal (SHARMA, 2012). Muitas são as doenças cuja modificações no metabolismo de ácidos biliares totais pode ajudar no diagnóstico, exemplos são cirrose, colestase, hepatite, esclerose do fígado e síndrome de Wilson. Pode-se afirmar que a dosagem sérica de TBA pode detectar doenças hepáticas mais cedo que os testes hepáticos padrões como as Bilirrubinas, uma vez que TBA corresponde a função hepática e não dano hepático (SHARMA, 2012).

A dosagem de TBA pode ser útil em doenças hepáticas crônicas, como hepatite ou cirrose, que prejudicam indiretamente a secreção biliar, mas também ocorre em outras patologias que não afetam diretamente a função dos hepatócitos como fibrose cística e diabetes (MONTE et al., 2009).

Alguns estudos demonstram a utilização da dosagem de TBA como biomarcador mais sensível e específico para diagnóstico de colestase intra-hepática na gravidez (CHEN; SMITH; TARR, 2015).

Em animais como cães e gatos, assim como em humanos, também é comum um aumento da concentração de TBA devido a fatores como hepatopatias, incluindo hepatites, necroses e redução da massa funcional hepática. Além disso, pode haver diminuição das concentrações séricas de TBA relacionadas com obstruções intestinais (FRANCESCHINA, 2015). Já em aves, como não há formação de bilirrubina devido a falta de uma enzima chamada bilirrubina redutase, a dosagem de TBA torna-se ainda mais importante para a avaliação hepática (FRANCESCHINA, 2015).

De modo geral, não se deve diagnosticar qualquer doença hepatobiliar apenas pela dosagem de TBA. Deve-se avaliar todo quadro clínico do paciente, além de outros testes específicos para determinar a causa específica da alteração. Além disso, as concentrações séricas dos ácidos biliares variam conforme estado de alimentação do animal, o que deve ser levado em conta na hora de mensurar o analito e interpretar os resultados (FRANCESCHINA, 2015).

2.3. METODOLOGIA DE MENSURAÇÃO DE TBA

Existem diversas metodologias para quantificação de ácidos biliares classificados como métodos cromatográficos ou não cromatográficos. Os métodos cromatográficos são essencialmente utilizados para pesquisas e podem ser utilizadas técnicas de Cromatografia de camada fina, Ionização eletrospray, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia gasosa (GC-MS). Tais métodos são altamente sensíveis e específicos e permitem a determinação de moléculas específicas de ácidos biliares. Já os métodos não cromatográficos são mais aplicados para fins clínicos, já que são rápidos e mais simples e incluem métodos enzimáticos, ensaios imunoenzimático (ELISA) e ressonância magnética nuclear (NMR) (LIU et al., 2018).

Os métodos enzimáticos são novos e altamente utilizados para determinação dos diversos analitos em laboratórios de análises clínicas pela facilidade e especificidade que apresentam (SHARMA, 2012). As vantagens e desvantagens das diferentes tecnologias de mensuração de TBA estão apresentados na Tabela 2.

Os métodos enzimáticos, pelas vantagens que apresentam são os de maior interesse na rotina laboratorial, e podem quantificar TBA indiretamente por detecção espectrofotométrica por UV ou fluorescência de produtos na reação de oxidação de Ácidos Biliares (Figura 2) (LIU et al., 2018)

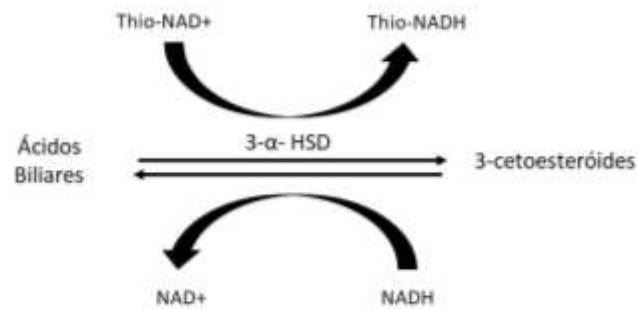
Tabela 2 – Vantagens e desvantagens dos métodos mais utilizados na mensuração de TBA

Método	Vantagens	Desvantagens
HPLC	Alta sensibilidade e especificidade	Exige tratamento de amostra
GC-MS	Alta capacidade de separação de moléculas	Necessita derivatização de amostras
ELISA	Aplicável para BA específicos	Susceptível a reação cruzada com outros metabólitos
NMR	Aplicável para BA específicos	Necessita de derivatização de amostras
Enzimáticos	Aplicável a rotinas laboratoriais, operação simples, custo baixo	Pode sofrer interferência de compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda do teste.

Fonte: (LIU et al., 2018) adaptado. Diversas metodologias para detecção dos ácidos biliares com respectivas vantagens e desvantagens.

Dois reações são combinadas neste método de ciclagem de enzimas cinéticas. Na primeira reação, os ácidos biliares são oxidados pela 3- α Hidroxiesteróide Desidrogenase (3- α -HSD) com a subsequente redução de Tio-NAD⁺ a Tio-NADH. Na reação reversa, os ácidos biliares oxidados são reduzidos pela mesma enzima com a subsequente oxidação de NADH a NAD⁺. A taxa de formação de Thio-NADH é determinada medindo a mudança de absorbância específica a 405 nm. O ciclo enzimático significa que várias moléculas de Thio-NADH são geradas a partir de cada molécula de ácido biliar, dando origem a uma mudança de absorbância muito maior, aumentando a sensibilidade do ensaio (ZHANG et al., 2004). Esse método é conhecido como método de quinta geração para determinação de TBA.

Figura 2 – Princípio do método enzimático cíclico



Fonte: (ZHANG et al., 2004) adaptada. A reação enzimática de TBA por ciclagem de enzima utiliza a enzima 3HSD que realiza a reação nas duas direções com a subsequente redução de ThioNAD⁺ a ThioNADH e oxidação de NADH a NAD⁺. A leitura é realizada em 405 nm e determina a taxa de formação do ThioNADH.

2.4. ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS (NEFA)

Os ácidos graxos não esterificados (NEFA) conhecidos também como ácidos graxos livres (FFA) são produtos de hidrólise dos triacilglicerídeos, desempenhando papel fundamental no metabolismo de lipídeos dos mamíferos, atuando como precursores de metabólitos importantes como os fosfolipídios e prostaglandinas (PERIS et al., 1997) (FRAYN, 2005).

Os ácidos graxos não esterificados (NEFA) correspondem aos ácidos graxos que não possuem ligações a nenhuma fração lipídica dos fluídos biológicos como o colesterol (VAN HOECK et al., 2014). De modo geral, os ácidos graxos são representados por ácidos carboxílicos de diferentes comprimentos de cadeia e diferentes níveis de saturação (BADDELA; SHARMA; VANSELOW, 2020). Baseado na estrutura química os ácidos graxos podem ser classificados como saturados, quando possuem apenas ligações simples entre os carbonos da cadeia principal como o ácido palmítico ou insaturados quando apresentam ligações duplas entre os carbonos da cadeia principal. Os insaturados existem com diferentes graus de instauração, podendo ser monoinsaturados como o ácido oléico ou poliinsaturados como o ácido eicopentanóico (VAN HOECK et al., 2014)(BADDELA; SHARMA; VANSELOW, 2020).

No organismo, os ácidos graxos possuem papel importante como constituintes celulares, estando presente como componentes das membranas, atuando na

sinalização celular ou como fonte energética (BADDELA; SHARMA; VANSELOW, 2020).

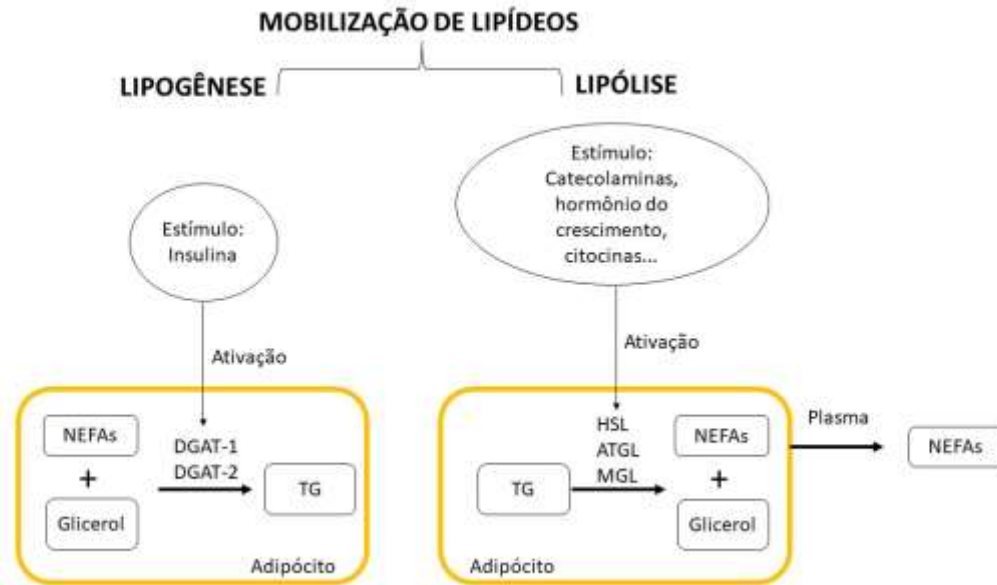
Existem duas fontes principais que alteram a concentração de NEFA no sangue: mobilização dos lipídeos e dieta (VAN HOECK et al., 2014). A mobilização de lipídeos é uma adaptação dos organismos de mamíferos para sobreviver com menor disponibilidade de nutrientes e energia e é conhecido pelos processos de lipogênese e lipólise que ocorrem no tecido adiposo (CONTRERAS; SORDILLO, 2011).

Nos adipócitos o processo de lipogênese é a biossíntese de moléculas de triglicerídeos a partir de ácidos graxos não esterificados (NEFA) e glicerol. Inicialmente ocorre a formação do diacilglicerol que posteriormente é transformado em triglicerídeo (TG) pela adição de mais um ácido graxo e atuação de duas enzimas dentro do adipócito, acil-coA diacilglicerolaciltransferase 1 e 2 (DGAT-1 e DGAT-2) (figura 1). São três principais vias de fornecimento e do diacilglicerol: via glicerol-fostato, monoacilglicerol e gliceroneogênese. O processo contrário é descrito pela lipólise, onde as lipases do tecido adiposo: lipase hormônio sensível (HSL), lipase de monoacilglicerol (MGL) e lipase de triglicerídeos (ATGL) iniciam o catabolismo dos triglicerídeos em NEFA e glicerol. O NEFA são direcionados para fora da célula por proteínas que são transportadas no sangue através da albumina (Figura 3)(CONTRERAS; SORDILLO, 2011).

Durante períodos de estresse ou jejum, ocorre a desesterificação de ácidos graxos armazenados no tecido adiposo pela ação de lipases que resultam em uma maior concentração de NEFA na circulação para atender demanda energética do organismo. O mecanismo da lipólise é reprimida normalmente pela ação da insulina em condições de alimentação normal e energética, predominando a lipogênese. Já a lipólise é iniciada por estímulos de catecolaminas, hormônio de crescimento e citocinas (Figura 3) (BADDELA; SHARMA; VANSELOW, 2020).

De modo geral, a lipólise é ativada quando há necessidade energética, frequentemente durante exercício prolongado, jejum ou obesidade. Nesse período ocorre alta concentração de NEFA fora do adipócito que é direcionado para fígado e músculos para serem oxidados e utilizados como combustível, de forma a preservar a glicose para utilização dos neurônios (VAN HOECK et al., 2014).

Figura 3 – Processo de mobilização de lipídeos



Fonte: (CONTRERAS; SORDILLO, 2011) adaptada. A mobilização de lipídeos é caracterizada pelos processos de lipogênese e lipólise no organismo. No adipócito a lipogênese funciona de modo a formar as moléculas de triglicerídeos e o processo contrário é a hidrólise dessas moléculas em NEFA e glicerol.

2.5. IMPORTÂNCIA DO NEFA E DOENÇAS CORRELACIONADAS

A determinação de ácidos graxos não esterificados (NEFA) nos diversos fluidos biológicos (soro, plasma, urina e outros) nas diversas espécies é importante para auxiliar diagnóstico das diversas condições clínicas (CHRISTMASS et al., 1998). A concentração de NEFA no soro/plasma geralmente está na faixa de 0,10 mmol/L até 1 mmol/L conforme tabela 1, uma vez que a presença do analito faz parte de uma adaptabilidade metabólica constante dos organismos. Diariamente sua concentração cai com cada refeição, quando a insulina suprime a lipólise e aumentam durante a noite quando o organismo permanece em jejum. Contudo, a variação da concentração desse analito pode ocorrer por outros motivos (FRAYN, 2005).

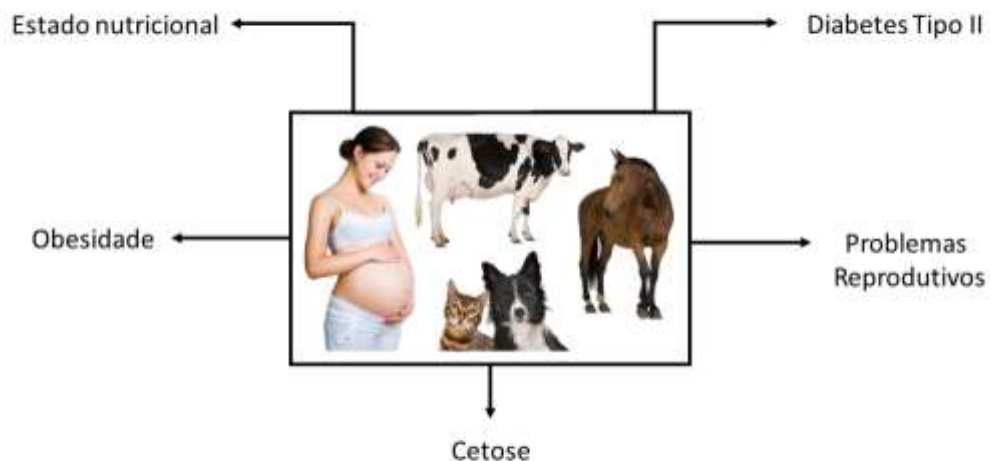
De modo geral, o ácido oleico (AO), ácido palmítico (PA) e ácido esteárico (AS) são os três tipos de NEFA mais comuns na circulação sanguínea do organismo, porém o perfil de composição é diferente de acordo com as espécies como pode ser observado pela Tabela 3 e suas estruturas químicas principais representadas a Tabela 4.

Tabela 3 – Concentrações fisiológicas e patológicas de NEFA no soro humano e bovino conforme diferentes condições do organismo

Concentração / Soro	Soro Bovino	Soro Humano
Concentração de NEFA em condições fisiológicas	200 μ M	200 – 600 μ M
Concentração de NEFA em condições patológicas	400 – 1200 μ M	400 – 2000 μ M
Perfil NEFA	21% ácido oleico, 17% de ácido palmítico e 27% ácido esteárico	38% ácido oleico, 24% ácido palmítico, 21% ácido linoleico e 10% ácido esteárico

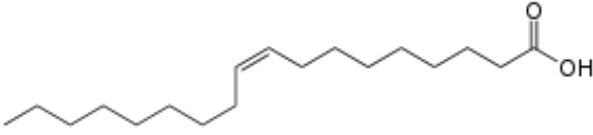
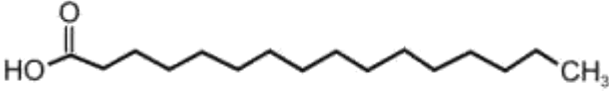
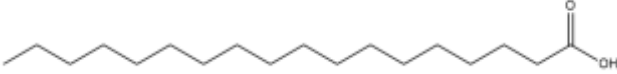
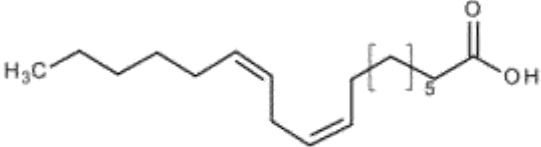
Fonte: (VAN HOECK et al., 2014) adaptado. Representação da concentração de NEFA em condições fisiológicas e patológicas em soro humano e bovino, assim como o perfil em cada organismo humano e bovino.

Figura 4 – Esquema de alterações determinadas por concentrações alteradas de NEFA



Fonte: (VAN HOECK et al., 2014) adaptada. Representação esquemática das situações que podem resultar em alteração na concentração sérica de NEFA nos organismos humanos e/ou animal.

Tabela 4 – Estruturas dos ácidos graxos não esterificados mais comuns nos organismos animal e humano

Estruturas dos Ácidos Graxos não esterificados (NEFA) comuns no organismo	
Ácido Oleico	
Ácido Palmítico	
Ácido Estearico	
Ácido Linoleico	

Fonte: Disponível em https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Linoleic-acid,MDA_CHEM-843483; <https://www.sinergiacientifica.com.br/produto/acido-estearico-p-a-esterina-pura/>; <https://www.engquimicasantosp.com.br/2013/04/oleo-de-lorenzo.html>. Acesso em: 15 ago. 2022.

A dosagem de NEFA pode ser útil no diagnóstico de doenças como obesidade, diabetes tipo II, estado nutricional e doenças de fígado como cetose. Além disso, a alta concentração de NEFA pode gerar problemas reprodutivos em animais e humanos, como por exemplo: endometriose e retenção placentária (Figura 4) ((VAN HOECK et al., 2014) (ABDELLI et al., 2017).

A alta concentração de NEFA conforme necessidade do organismo pode se tornar tóxica para o corpo, uma vez que pode incitar outras doenças. A excessiva mobilização de gordura leva ao aumento da concentração de NEFA no sangue que pode ser parcialmente utilizado pelo tecido de destino como combustível e o restante principal é metabolizada via hepatócitos por β -oxidação em acetil-coenzima A (Acetil-coA) que pode ser utilizada para síntese de colesterol ou metabolizados em corpos cetônicos. De modo geral, pequenas concentrações de corpos cetônicos podem ser

utilizadas como combustível por tecidos como coração, fígado e cérebro, porém a alta concentração resulta em alta circulação de corpos cetônicos no organismo, configurando a cetose (ABDELLI et al., 2017).

O NEFA representa uma fonte energética para o organismo, contudo quando ocorre uma disfunção no metabolismo de transporte de lipídeos e oxidação de ácidos graxos ocorre acúmulo de gordura ou esteatose (MCART et al., 2013). A ocorrência de esteatose resulta em um acúmulo excessivo de triglicérides e NEFA nos hepatócitos e em outras células que podem ocasionar compressão e redução de tamanho das organelas de células. Em humanos, um exemplo seria a aterosclerose. Uma segunda consequência desse acúmulo seria a indução de apoptose e morte celular (CONTRERAS; SORDILLO, 2011).

2.6. METODOLOGIAS DE MENSURAÇÃO DE NEFA

Devido à importância da determinação dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) para o diagnóstico das diversas doenças previamente citadas, existem diversas metodologias de mensuração do analito. Muitas técnicas foram desenvolvidas desde o método Dole de 1956 (DOLE, 1956).

Geralmente os métodos de mensuração e quantificação de lipídeos envolvem utilização de extração por solventes orgânicos. Seguindo com a eliminação de compostos interferentes como fosfolipídios e ácidos graxos voláteis e por fim a determinação dos ácidos carboxílicos por titulação (DOLE; MEINERTZ, 1960). Para facilitar as rotinas laboratoriais, foram determinadas diversas técnicas enzimáticas para mensuração de NEFA baseados na enzima Acyl-coA Sintetase que não precisam de extração prévia de lipídeos. (KRUKOVSKY; KNAYSI, 1942) (CHRISTMASS et al., 1998).

A existência de diversas metodologias para a mensuração dos NEFA se dão pela ocorrência de muito interferentes em cada uma delas, não permitindo uma quantificação exata do analito. (CHILLIARD; BAUCHART; BARNOUIN, 1984). Fato é que, para a determinação de NEFA, o método deve de modo geral ser sensível, rápido, reproduzível e aplicável a qualquer e todas espécies animais.

Os métodos cromatográficos para determinação de lipídeos dependem da extração sucessivas por solvente orgânico como clorofórmio e metanol como descrito por Folch, Less and Sloane-Stanley em 1957 (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY,

1957). Posteriormente os compostos são separados e identificados por métodos cromatográficos. HPLC é um método cromatográfico que pode ser utilizado, mas por requerer uma rotina laboratorial não sendo possível sua utilização em larga escala na rotina de um laboratório de análises clínicas. Uma das vantagens é que esse método não sofre interferência de hemoglobina ou triglicérides (KAZMIERCZAK et al., 2002).

Os métodos baseados em titulação de lipídeos utilizam como princípio a acidez dos ácidos graxos em soluções de heptano titulado com uma base, porém também são dependentes de extração prévia de lipídeos por solventes orgânicos. Esses métodos são difíceis de serem executados em ensaios menores com micro quantidades (ELPHICK, 1968).

Um método semi-automático foi proposto por Baird, Black e Faulkner em que as soluções contendo NEFA devem ser misturadas com um reagente colorimétrico baseado em vermelho fenol e barbital de sódio dissolvido em etanol e heptano (BAIRD; BLACK; FAULKNER, 1967). Esse método é espectrofotométrico e o resultado é medido em 560 nm (CHILLIARD; BAUCHART; BARNOUIN, 1984).

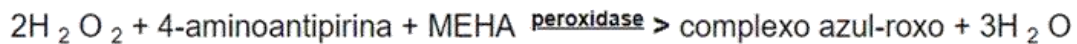
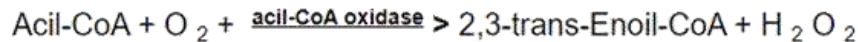
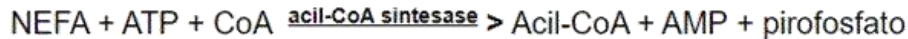
Em 1965 Antonis propôs um método de detecção dos NEFA através de reação da solução de lipídeos com reagentes de cobre para formação de sabão e subsequente formação de complexos colorimétricos que podem ser mensurados em 440 nm (ANTONIS, 1965).

Os métodos espectrofotométricos são extremamente úteis, permitindo a mensuração do analito de forma semi-automática, A interferência nesses métodos deve ser considerada, uma vez que existem outros componentes séricos que podem absorver luz no comprimento de onda escolhido para realização do teste, como por exemplo a hemoglobina. A turbidez da amostra causada em sua maioria pelos triglicérides séricos, também pode ser um outro interferente (ELPHICK, 1968).

Os métodos enzimáticos, mesmo que espectrofotométricos, são baseados em reações específicas de enzimas e não envolvem diversas etapas como os outros métodos (STERN; SHAPIRO, 1953). O mais comum é o método ACS/ACOD que utilizam duas enzimas: Acil-coA Sintetase e Acil-coA Oxidase. De modo geral o NEFA presente na amostra é ativado pela Acil-CoA sintetase e depois oxidados por Acil-CoA Oxidase com a produção simultânea de peróxido de hidrogênio que é reduzido em água pela enzima peroxidase que transfere os elétrons e oxigênio para uma substância que quando oxidada altera sua cor se transformando no cromógeno medido a 550 nm (Figura 5) (CHILLIARD; BAUCHART; BARNOUIN, 1984). Tal

método descrito é o mais utilizado nos laboratórios e permite uma mensuração exata e correta do analito (MATSUBARA et al., 1983).

Figura 5 – Reação enzimática para mensuração de NEFA



Fonte:(MIKSA; BUCKLEY; POPPENGA, 2004) adaptada. A reação de determinação de NEFA é realizada através de uma cascata de reação enzimática que no fim resulta em uma substância que quando oxidada é capaz de se transformar em cromógeno medido a 550 nm.

2.7. DIAGNÓSTICO *IN VITRO* E REGULAMENTAÇÕES ANVISA E MAPA

O diagnóstico *in vitro* são procedimentos e testes comuns na medicina laboratorial que apresentam provas clínicas que auxiliam no diagnóstico médico (ROHR et al., 2016). Os testes de diagnóstico *in vitro* englobam qualquer procedimento que possa ser realizado em uma amostra ou fluido do organismo humano ou animal, como sangue, urina ou tecido. De modo geral, o termo “*In vitro*” remete a realização fora do corpo, ou seja, testes realizados em laboratório, com o auxílio de vidrarias, de modo que as ferramentas de diagnóstico *in vitro*, apresentam vantagens por ser um diagnóstico acessível, não invasivo, seguro e rápido em relação aos testes *in vivo* (ZHOU et al., 2015).

Além disso, o diagnóstico *in vitro* auxilia os pacientes e/ou médicos no monitoramento e prognóstico das diversas condições da saúde humana ou animal reduzindo os gastos com as doenças graves, por permitir a detecção precoce e o tratamento assertivo e eficaz. Ao redor do mundo, o diagnóstico *in vitro* está cada vez mais popular, usando mais diversas metodologias, que no geral envolvem técnicas bioquímicas e de biologia molecular. Essas metodologias permitem o desenvolvimento e comercialização biotecnológica de mais de 40.000 produtos que visam fornecer diferentes informações aos médicos e pacientes sobre as mais variadas condições de saúde humana e animal (ROHR et al., 2016).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) a partir de 1999, pela lei nº 9.782, ficou incumbida de regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública, o que inclui o cadastro e o registro de produtos para diagnóstico *in vitro*. (GEVIT; ANVISA, 2012). Para a correta regulamentação., a ANVISA faz uso de instrumentos como as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDCs) que correspondem a atos normativos referentes as competências da agência. (CRUZEIRO, 2015).

De acordo com a ANVISA produtos para diagnóstico *in vitro* são soluções ou reagente usados para realização de exames nos laboratórios clínicos. Prevista pela legislação (RDC nº 36/2015, item XXVII do art. 3º), são todos os reagentes, calibradores, padrões, controles para análise de amostras do corpo humano para prever informações com o objetivo de auxiliar no diagnóstico e no monitoramento de doenças (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA., 2015).

Os produtos de diagnóstico *in vitro*, são classificados para fins de registro, conforme art. 4º da RDC nº 36/2015, de acordo com o risco que carregam para o paciente e à saúde pública, sendo eles:

- I - Classe I: produtos de baixo risco ao indivíduo e baixo risco à saúde pública.
- II - Classe II: produtos de médio risco ao indivíduo e/ou baixo risco à saúde pública.
- III - Classe III: produtos de alto risco ao indivíduo e/ou médio risco à saúde pública.
- IV - Classe IV: produtos de alto risco ao indivíduo e alto risco à saúde pública.

O que modifica no cadastro e registro dos produtos de acordo com sua classe são os documentos e informações necessários para a avaliação da ANVISA quanto o seu desempenho e comercialização (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA., 2015)

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável por regularizar produtos para utilização animal como os kits de diagnóstico *in vitro*. Todo estabelecimento que fabrica, fabrica, distribui, importa, exporta e comercializa os produtos devem ser obrigatoriamente registrados no MAPA. O estabelecimento e o produto deverão passar por critérios de avaliação obedecendo as diretrizes, normas e exigências do MAPA, seguindo também as boas práticas de fabricação do mesmo (MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

De modo geral, existem algumas informações que devem ser enviadas para o registro ou cadastro de um produto, tanto para uso humano quanto para uso animal como o nome comercial, a composição, a metodologia utilizada, qual amostra,

princípio do método e conservação. Além dos testes que devem ser enviados a fim de comprovar estabilidade, condições do produto e desempenho do mesmo que serão descritos detalhadamente na metodologia do trabalho (GEVIT; ANVISA, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

As diversas doenças hepatobiliares e metabólicas são reconhecidas como problema de saúde pública e acometem a saúde humana e animal, possuindo impacto negativo na condição de vida dos pacientes. Sendo assim, há uma necessidade de diagnóstico confiável, barato e prático dos analitos que se alteram na aquisição da doença ou para a aquisição delas, tornando possível o diagnóstico ou pronóstico dos quadros alterados. Dentro desse contexto, os analitos Ácidos Biliares Totais (TBA) e Ácidos graxos não esterificados (NEFA) demonstram sua importância, principalmente em doenças como cetoses, colestases, hepatites, obesidade, diabetes e síndrome metabólica.

No que tange as doenças hepatobiliares, por ano são reportadas em média 2 milhões de mortes por doenças hepáticas, como cirrose e hepatite viral (ASRANI,2019). Além disso, a cirrose e o câncer de fígado são a 11^a e a 16^a doença que mais mata, respectivamente, somando cerca de 3,5% de todas as mortes do mundo (MARCELLIN; KUTALA, 2018). Tais dados reforçam a importância de analitos específicos como o TBA para a detecção precoce das doenças hepáticas.

Dessa maneira, ao aliar os conhecimentos bioquímicos, buscou-se desenvolver novas formulações para a quantificação por bioquímica líquida dos analitos citados: TBA e NEFA.

A bioquímica líquida é o método mais aplicável nos laboratórios de análises clínicas por sua facilidade de trabalho em larga escala e acessibilidade, correspondendo a metodologia de detecção mais utilizada no diagnóstico *in vitro*. Somado a isso, é estimado que o mercado global de diagnóstico *in vitro* alcance uma receita de aproximadamente US\$ 85,23 bilhões em 2027, sendo observado um crescimento de 5% ao ano impulsionado pelo desenvolvimento de produtos coringas para a detecção de doenças variadas, como é o caso dos analitos NEFA e TBA (PRECEDENCE RESEARCH, 2020).

Sendo assim, notoriamente o presente trabalho apresenta um grande impacto econômico e social uma vez que beneficiará diretamente a sociedade por meio da disponibilização de um método confiável, prático e acessível de detecção dos analitos, tornando o diagnóstico das doenças de cunho hepatobiliar ou metabólica mais assertiva e acessível. O desenvolvimento das formulações de diagnóstico *in vitro* para quantificação de TBA e NEFA são inovadoras no Brasil e o objetivo do trabalho é a

nacionalização de tecnologia que diminuição de custos com importação e aumento da disponibilidade do teste em laboratórios de análises clínicas e veterinária apresentando boa qualidade para cuidados com a saúde da população.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver duas novas formulações para os kits de diagnóstico de quantificação de Ácidos Graxos não esterificados (NEFA) e Ácidos Biliares Totais (TBA) pelas metodologias ACS/ACOD e quinta geração respectivamente, visando nacionalizar a tecnologia, diminuir custos e reduzir efeitos de potenciais interferentes.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma formulação birreagente para quantificação de Ácidos Biliares Totais (TBA);
- Otimizar a formulação base birreagente para TBA;
- Avaliar o desempenho em ensaio de quantificação TBA monocromático e bicromático;
- Avaliar os parâmetros analíticos exatidão analítica, sensibilidade e intervalo operacional do produto para a formulação TBA;
- Avaliar o perfil de interferência da formulação de TBA frente a triglicérides, ácido ascórbico, bilirrubina e hemoglobina;
- Estudar a estabilidade da formulação de TBA com enfoque na estabilidade acelerada;
- Desenvolver uma formulação Birreagente para quantificação de Ácidos Graxos não Esterificados (NEFA);
- Otimizar a formulação base birreagente para NEFA;
- Avaliar o perfil de interferência da formulação de TBA frente a triglicérides, ácido ascórbico, bilirrubina e hemoglobina;
- Avaliar a prévia dos parâmetros analíticos exatidão, sensibilidade e intervalo operacional da formulação de NEFA;
- Estudar a estabilidade da formulação de NEFA com enfoque na estabilidade acelerada;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

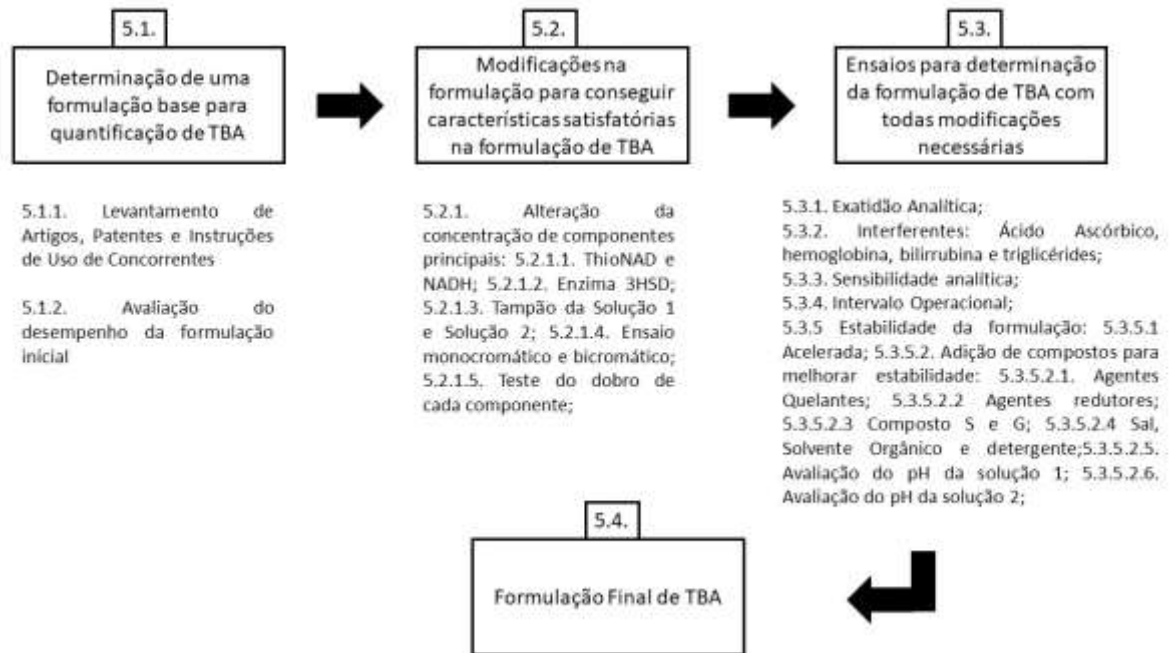
Para o desenvolvimento desse projeto utilizou-se a infraestrutura disponibilizada pela Biotécnica Indústria e Comércio LTDA. Foi utilizado o analisador automático Smart 200+ (empresa Biotécncia), BS-240 (Mindray), AU 400 (Olympus) e Cobas Mira Plus (Roche).

Todos os protocolos descritos nesse trabalho foram estabelecidos e instituídos pela Biotécnica Indústria e Comércio LTDA conforme descrito na RDC nº36 e/ou outras normas da legislação para atender critério exigidos pela ANVISA e MAPA que seguiram um procedimento operacional padrão (POP) instituído pela empresa (ANVISA,2015). Além disso, as informações consideradas essenciais para o desenvolvimento da formulação foram codificadas e/ou apresentadas de forma abrangente para garantir a proteção da propriedade intelectual da empresa.

As amostras de soro humano utilizadas foram todas do banco de amostras vindos de laboratórios de análises clínicas parceiros da cidade de Alfenas, sendo as amostras registradas e com os respectivos laudos arquivados. As amostras de soro de animais também foram fornecidas por laboratórios parceiros juntamente com seus respectivos laudos.

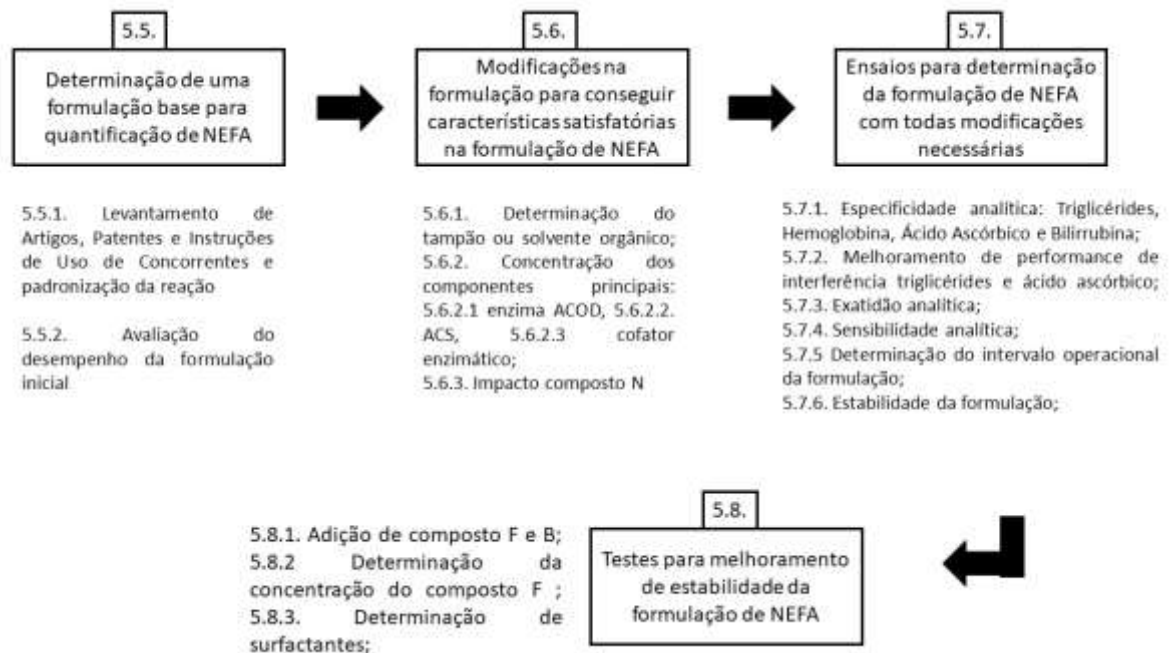
Para o TBA as etapas para o desenvolvimento e teste da formulação do kit de diagnóstico in vitro segue o estabelecido pelo fluxograma de atividades descrito na Figura 6 enquanto que para o NEFA o resumo da metodologia foi descrito na Figura 7.

Figura 6 – Resumo da metodologia utilizada para TBA



Inicialmente é proposto uma formulação base que utiliza as informações do levantamento bibliográfico e posteriormente são realizadas modificações necessárias na formulação para que atinja um desempenho suficiente comparado com o método de referência de dosagem do analito e outras características como estabilidade.

Figura 7 – Resumo da metodologia utilizada para NEFA

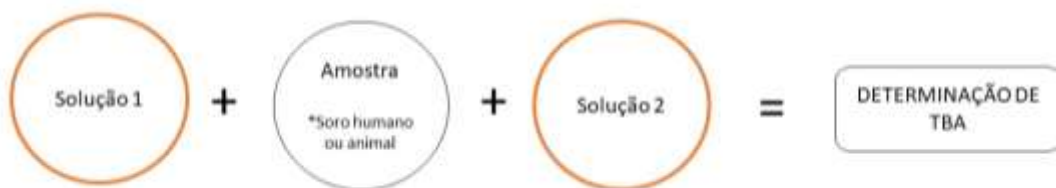


O princípio de criação da formulação segue o descrito para o TBA porém como é um analito diferente as modificações necessárias se tornam diferentes também.

5.1. FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE TBA

Para propor uma formulação para um kit de quantificação de TBA deve-se entender o funcionamento da reação, de modo que o kit é composto por duas soluções que quando em contato com a amostra do paciente seja animal ou humano possibilita a reação do analito supracitado e então quantificação do mesmo nos laboratórios de análises clínicas (Figura 8).

Figura 8 – Esquema do funcionamento de um kit diagnóstico

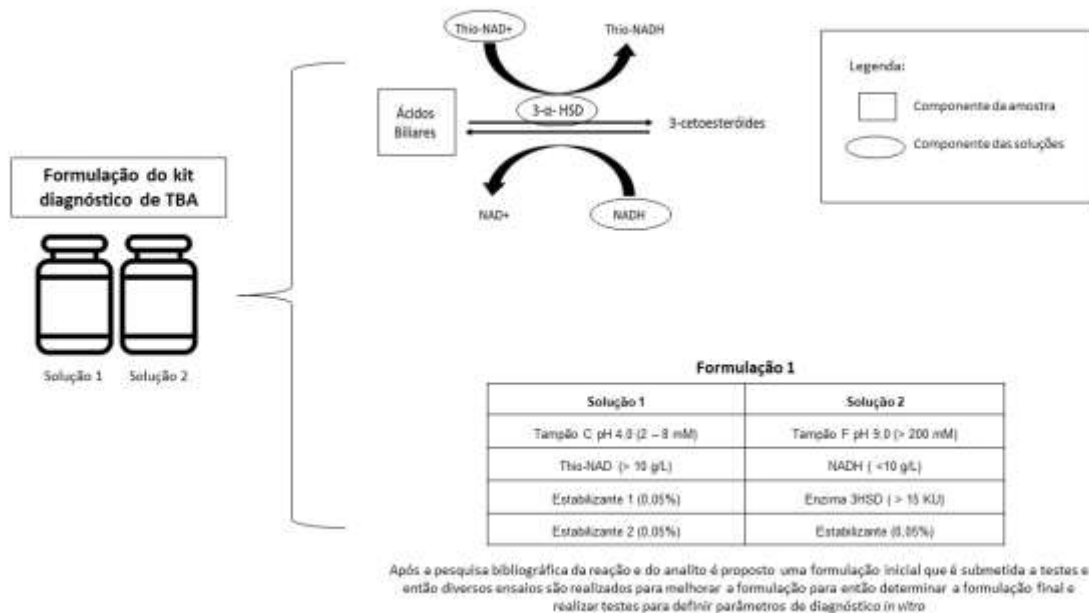


Um kit diagnóstico é composto por duas soluções que quando em contato com a amostra humana e/ou animal permite a reação química que então determina o analito.

5.1.1. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE TBA

Foi realizado um levantamento bibliográfico que incluiu artigos científicos, patentes e instruções de uso de produtos de empresas concorrentes para maior entendimento sobre o teste e então determinação dos componentes e suas respectivas concentrações, a fim de propor uma formulação base para o kit de quantificação de ácidos biliares totais (TBA). As condições iniciais para realização do ensaio (pH, temperatura, tempo de reação, comprimento de onda e proporção entre os reagentes) e melhor proveito da reação também foram determinadas com base na pesquisa na literatura (Figura 9).

Figura 9 – Esquema da determinação da primeira formulação de TBA



A primeira formulação é determinada após uma análise da literatura do analito e então é avaliada o desempenho inicial da mesma que é submetida então a diversas alterações quanto a composição e concentração para atingir determinadas características.

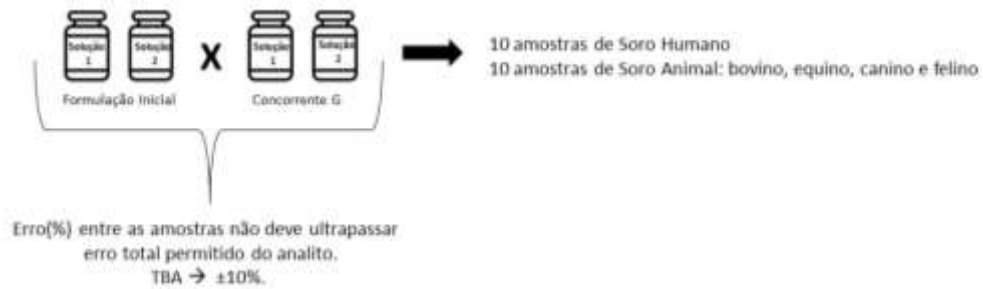
5.1.2. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO INICIAL

Inicialmente foram avaliadas as colorações das soluções 1 e 2 da formulação base em comparação com as soluções 1 e 2 do concorrente G que corresponde ao concorrente Gcell que comercializa kits diagnósticos de TBA de mesma metodologia.

Para analisar o desempenho da formulação base proposta, foram dosadas dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal (que variaram em espécies entre caninos, felinos e bovinos) que tiveram seus resultados comparados com os valores dosados pelo concorrente G, levando em conta o erro total permitido para o analito como critério de aceitabilidade do ensaio analítico. Além disso, foi avaliado o desempenho da formulação frente dois controles de dois níveis diferentes, de modo que em analisador automático AU400 os controles externos Randox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Randox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022) foram dosados para validação da corrida analítica e posteriormente avaliado os valores de soro humano e soro animal (Figura 10). Para a calibração da formulação desenvolvida foi atribuída a rastreabilidade e valor do calibrador do concorrente G que é proveniente de ensaio espectrofotométrico UV, tal atribuição corresponde ao ensaio de rastreabilidade do

produto. A rastreabilidade consiste na capacidade de relacionar o resultado de uma medição à uma referência, por meio de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, tendo como finalidade reduzir a variabilidade entre métodos (FERNANDES; WOLLINGER; GARRIDO, 2019; INMETRO/IPQ, 2009).

Figura 10 – Esquema de avaliação de desempenho da formulação inicial



A formulação inicial que corresponde a formulação base foi submetida a dosagem de amostras de soro humano e animal e comparada com as dosagens do concorrente G de mesma metodologia.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE TBA

Para cada ensaio de otimização da formulação foram produzidos pequenos pilotos para testar as diferentes concentrações e diferentes compostos.

Para cada um dos pilotos descritos, no sistema automático de análise de equipamento automático foram dosados pelo menos um controle, valorado em triplicata. Além disso, para entender o impacto de cada alteração, 20 amostras de soro, sendo 10 de origem humana e 10 de origem animal (distribuídas em caninos, felinos e bovinos) foram dosadas com cada piloto e comparados com os valores obtidos por um kit comercial de TBA de mesma metodologia, denominado concorrente G. Sendo os controles utilizados dentro da validade estabelecida para o produto: Radox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Radox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022). Foi analisado também o perfil reacional de cada formulação em comparação com o concorrente G quando aplicado.

Para que o teste comparativo seja válido, os controles devem estar dentro da faixa de referência estabelecida para o analito. Além disso, os erros entre os valores obtidos pelo concorrente G e cada piloto foi analisado com base no erro total permitido para o analito, para o TBA, de acordo com RCPA é de ± 4 $\mu\text{mol/L}$ para concentrações até 40 $\mu\text{mol/L}$ e 10% para concentrações maiores que 40 $\mu\text{mol/L}$. O kit comercial

utilizado encontrava-se dentro do prazo de validade determinado na embalagem e foi usado de acordo com as instruções de uso do fabricante.

As leituras de absorvância foram analisadas através do fator de calibração, seguindo a equação (i):

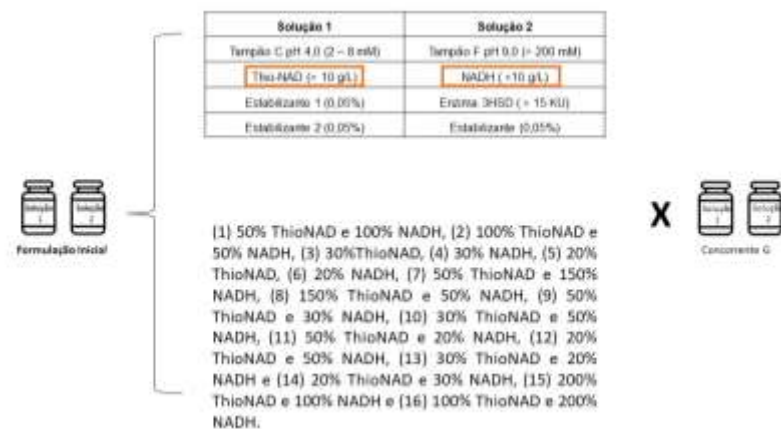
$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \text{Fator de calibração} * \text{Absorvância} \text{ (i)}$$

5.2.1 ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS

5.2.1.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE THIONAD e NADH

Os compostos ThioNAD e NADH desempenham papel fundamental na reação de determinação de TBA, dessa forma foram testadas formulações com diferentes concentrações dos compostos: (1) 50% ThioNAD e 100% NADH, (2) 100% ThioNAD e 50% NADH, (3) 30%ThioNAD, (4) 30% NADH, (5) 20% ThioNAD, (6) 20% NADH, (7) 50% ThioNAD e 150% NADH, (8) 150% ThioNAD e 50% NADH, (9) 50% ThioNAD e 30% NADH, (10) 30% ThioNAD e 50% NADH, (11) 50% ThioNAD e 20% NADH, (12) 20% ThioNAD e 50% NADH, (13) 30% ThioNAD e 20% NADH e (14) 20% ThioNAD e 30% NADH, (15) 200% ThioNAD e 100% NADH e (16) 100% ThioNAD e 200% NADH. O esquema de como foi realizado o teste é descrito na Figura 11.

Figura 11 – Esquema de avaliação da concentração de ThioNAD e NADH

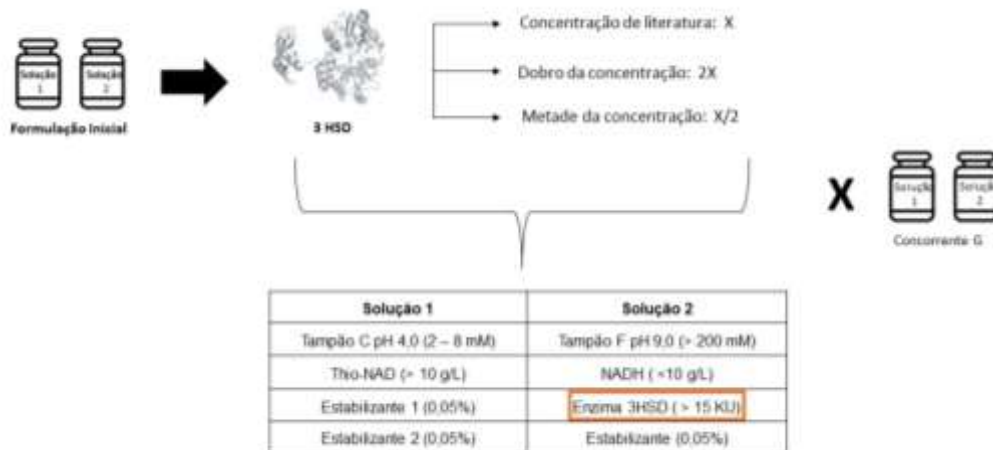


Dezesseis formulações foram resultantes das combinações de concentrações de ThioNAD e NADH que foram testadas contra o concorrente G para determinar a concentração final necessária para a determinação real do analito.

5.2.1.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA 3HSD

Para o ensaio enzimático de determinação de TBA, a enzima 3HSD deve ser utilizada. Na tentativa de encontrar a concentração correta de enzima para a formulação foram testadas formulações com as determinadas concentrações: 1) X/2; correspondendo à metade da concentração da enzima usada, por dados encontrados na literatura; (2) X, correspondendo à concentração da enzima encontrada em dados da literatura; e (3) 2X, correspondendo ao dobro da concentração encontrada na literatura (Figura 12).

Figura 12 – Esquema da avaliação da concentração da enzima 3HSD



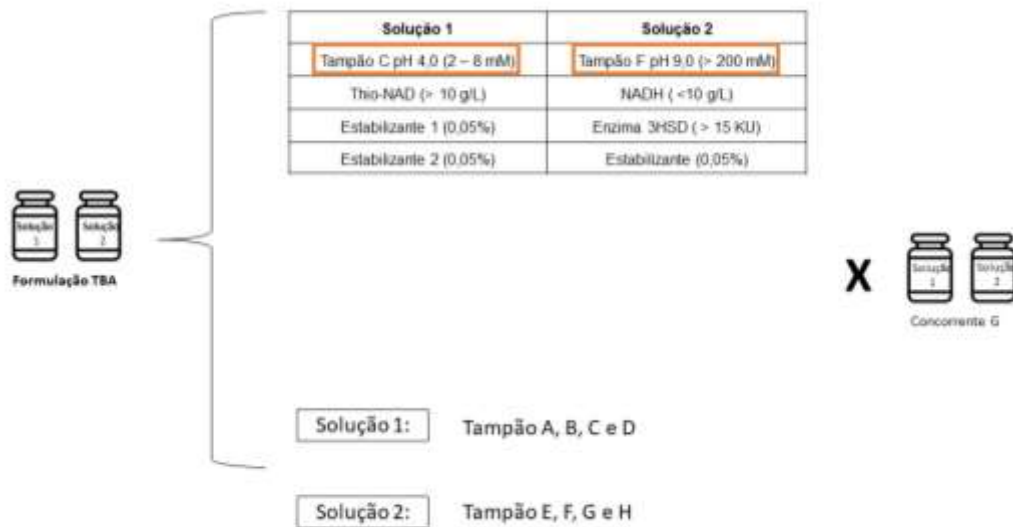
Avaliação da concentração da enzima 3HSD no ensaio de TBA contra as dosagens do concorrente G.

5.2.1.3 DETERMINAÇÃO TAMPÃO DA SOLUÇÃO 1 E SOLUÇÃO 2

Para que os compostos biológicos consigam exercer as funções necessárias dentro de uma reação bioquímica é necessário que o meio seja propício. Muitas vezes, em formulações é utilizado os tampões para que o pH de melhor atuação da enzima seja mantido e sua estrutura e função preservada (SILVA; SIMONI, 2000).

Para isso, conforme determinado em literatura, foram testados quatro tampões de pH 4,0 para a solução 1, sendo: (1) Tampão A, (2) Tampão B, (3) Tampão C e (4) Tampão D e quatro tampões de pH9,0 para a solução 2, sendo (5) Tampão E, (6) Tampão F, (7) Tampão G e (8) Tampão H (Figura 13).

Figura 13 – Esquema da avaliação dos Tampões para a solução 1 e 2 que compõem o kit de diagnóstico in vitro de TBA



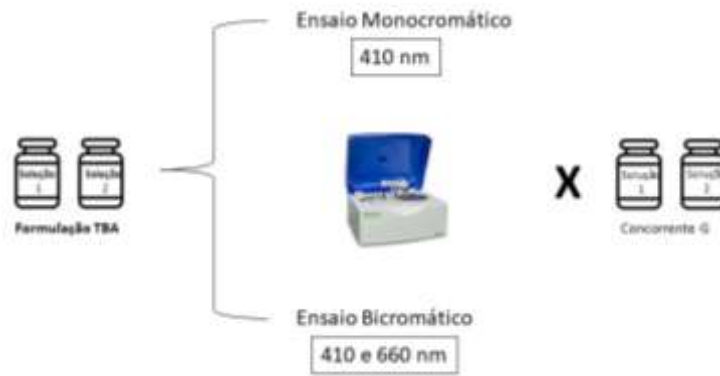
Quatro tampões para a solução 1 e quatro tampões para a solução 2 da formulação de TBA sendo testados contra a dosagem do concorrente G.

5.2.1.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO EM ENSAIO MONOCROMÁTICO E BICROMÁTICO

O ensaio de determinação de TBA é mensurado em 410 nm, porém alguns concorrentes descrevem um comprimento secundário em 660 nm. Um comprimento secundário pode ser utilizado para diversos fins em análises laboratoriais, como melhorar o perfil de não interferência no soro ou as replicatas de dosagem.

Sendo assim, foi testado duas programações sendo uma monocromática, apenas com o comprimento de 410 nm e uma programação bicromática utilizando o filtro primário em 410 nm e o filtro secundário em 660 nm, para definir qual seria a programação utilizada pelo kit em desenvolvimento (Figura 14).

Figura 14 – Esquema do estudo dos comprimidos de onda do ensaio de TBA



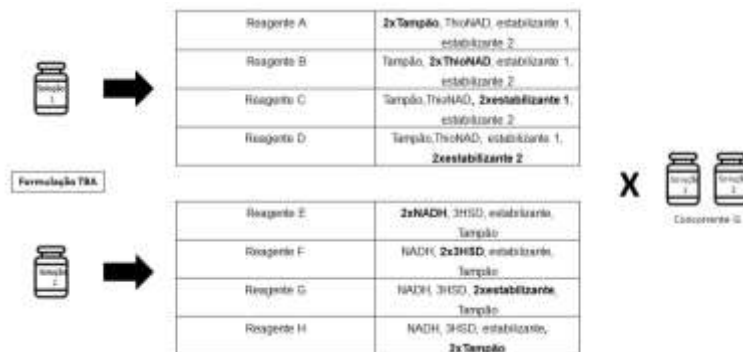
Duas programações, uma contendo o filtro primário e a outra contendo o filtro primário e secundário sendo testado contra as dosagens do concorrente G.

5.2.1.5 ENSAIO DO DOBRO DA CONCENTRAÇÃO DE CADA COMPONENTE DA FORMULAÇÃO

Na tentativa de entender o que deveria ser alterado na formulação para garantir uma performance de exatidão ideal e a dosagem correta do analito, foi estudado o dobro da concentração de cada componente da formulação para entender o que melhorava a performance da reação.

Dessa forma, para a solução 1 que possui 4 componentes rendeu 4 diferentes formulações, enquanto que para a solução 2 que possui também por 4 componentes rendeu 4 diferentes formulações (Figura 15). Totalizando 8 diferentes formulações para teste.

Figura 15 – Esquema do estudo do dobro da concentração de cada componente da formulação



Quatro formulações para a Solução 1 e quatro formulações para a solução 2 contendo o dobro da concentração de cada componente contra as dosagens do concorrente G.

5.3 VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DO DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE TBA

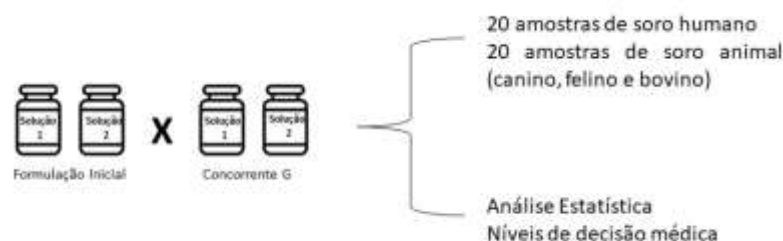
5.3.1 PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA

Foi realizado a prévia da correlação entre os resultados encontrados para as amostras usando o reagente proposto com um produto referência disponível no mercado e devidamente regulamentado pela ANVISA, denominado concorrente G. O teste foi realizado no equipamento automático AU400 e foram avaliadas a determinação de 40 amostras em duplicata, sendo 20 amostras de soro humano e 20 amostra de soro animal (divididos entre caninos, felinos e bovinos) incluindo pelo menos um controle para validar o teste como descrito pela Figura 16.

Após a obtenção desses resultados, foram analisados em planilha, o gráfico de correlação, considerando o lote em teste no eixo Y e o reagente referência no eixo X, a fim de determinar, o coeficiente angular (inclinação), o intercepto, o coeficiente de correlação e por meio da equação de regressão, determinar a porcentagem de erro metrológico (%DIF) em três níveis de decisão para o analito.

De modo geral avaliou-se o teste, analisando os resultados obtidos pelos controles, os quais devem estar no intervalo estabelecido, o coeficiente angular que deve estar entre 0,9 e 1,1 e o coeficiente de correlação (R) que deve ser maior que 0,990 além do erro total entre a determinação das amostras não deve ser maior que o erro total do analito.

Figura 16 – Esquema da exatidão do ensaio de TBA



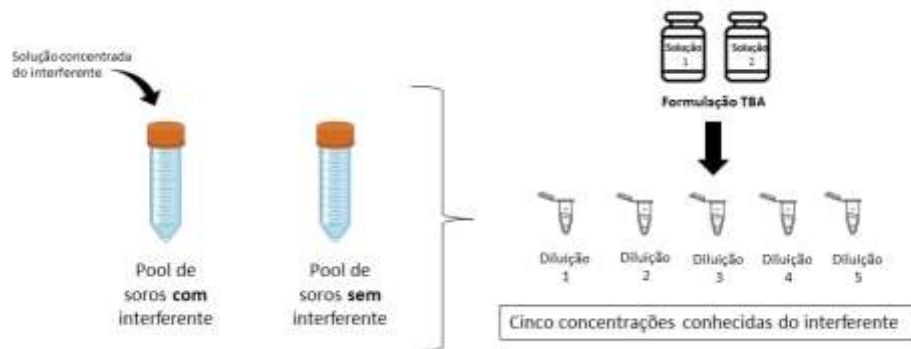
Formulação inicial proposta e concorrente G na dosagem de mais amostras para realizar uma prévia da exatidão analítica

5.3.2 AVALIAÇÃO DE INTERFERENTES NA FORMULAÇÃO DE TBA

Este estudo busca avaliar a especificidade do método com relação a dosagem de TBA frente a potenciais interferentes endógenos: triglicérides, hemoglobina, bilirrubina, e ácido ascórbico. As análises foram feitas no analisador automático AU400, no qual para foram utilizados Randox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Randox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022) como controles de validação da corrida analítica. O valor de TBA foi dosado em triplicata em cada uma das diluições descritas a seguir. A porcentagem de interferência de cada concentração do contaminante avaliada foi dada pela Equação II, onde C_d é a média das concentrações obtidas para cada diluição com o interferente e C_0 é a média obtida para a diluição sem o interferente. O limite máximo de variação causado pelo interferente deve ser de no máximo $\pm 10\%$ (JI,MENG, 2011). O processo é descrito pela Figura 17.

$$\% \text{ Interferência} = 100 \times \frac{(C_d - C_0)}{C_0} \quad (\text{ii})$$

Figura 17 – Esquema do estudo dos interferentes no ensaio de TBA



Cinco concentrações conhecidas de interferentes são preparadas e o valor de TBA dosado e comparado ao valor dosado sem a presença do interferente.

5.3.2.1 TESTE DE INTERFERENCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Preparou-se uma solução concentrada de ácido ascórbico para dopar um pool de soros, que não se apresentava visivelmente ictérico, hemolisados e lipêmicos. Por meio da mistura dos soros denominados com e sem interferente foram obtidas as concentrações expressas na Tabela 5:

Tabela 5 – Avaliação de ácido ascórbico

Diluição	1	2	3	4	5
Ácido Ascórbico (mg/dL)	0	25	50	75	100

Diluições de ácido ascórbico para posterior dosagem de TBA.

5.3.2.2 TESTE DE INTERFERENCIA DA HEMOGLOBINA

Em primeiro lugar, foi necessário o preparo de um hemolisado contendo 100 g/L de hemoglobina. Foram preparados dois pools de soro, que não se apresentavam visivelmente ictericos, hemolisados e lipêmicos, denominados com e sem interferente, para obter as seguintes concentrações de hemoglobina conforme a Tabela 6:

Tabela 6 – Avaliação de hemoglobina

Diluição	1	2	3	4	5
Hemoglobina (mg/dL)	0	50	100	300	500

Diluições de hemoglobina para posterior dosagem de TBA.

5.3.2.3 TESTE DE INTERFERENCIA DE TRIGLICÉRIDES

Para a realização desse estudo foi utilizada uma solução comercial, chamada lipovenos, que apresentava turbidez é equivalente à presença de triglicérides em soro. Foram preparados dois pools de soro, que não se apresentavam visivelmente ictericos, hemolisados e lipêmicos, denominados com e sem interferente, para obter as seguintes concentrações de triglicérides conforme a Tabela 7:

Tabela 7 - Avaliação de triglicérides

Diluição	1	2	3	4	5
Triglicérides (mg/dL)	0	250	500	1000	2000

Diluições de triglicérides para posterior dosagem de TBA.

5.3.2.4 TESTE DE INTERFERENCIA DE BILIRRUBINA

Preparou-se uma solução concentrada de bilirrubina para dopar um pool de soro, que não se apresentava visivelmente icterico, hemolisado e lipêmico. Por meio da mistura dos soros denominados com e sem interferente foram obtidas as concentrações expressas na Tabela 8:

Tabela 8 - Avaliação de bilirrubina

Diluição	1	2	3	4	5
Bilirrubina (mg/dL)	0	5,0	7,5	10,0	15,0

Diluições de bilirrubina para posterior dosagem de TBA.

5.3.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA DE TBA

A determinação da sensibilidade analítica do produto é representada pela determinação do Limite do Branco (LoB), Limite de Detecção (LoD) e Limite de Quantificação (LoQ). A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (Figura 18) (BRITO et al., 2003).

Dessa forma, o LoB avalia a probabilidade de determinação da concentração máxima do analito que pode ser observada em uma amostra sem o respectivo analito. Para o cálculo foi utilizada uma distribuição não paramétrica, pela dosagem de 4 amostras de branco em 5 repetições por dia durante 3 dias, resultando em um total de 60 determinações, além disso, foi atribuído um controle para validar o ensaio. As 60 determinações foram organizadas em ordem crescente e o resultado, resultado da posição $[0,95 \cdot NB + 0,5] = \text{Posição } 57 + 0,5$ com $\alpha = 5\%$ determina o LoB, onde α é o nível de significância e NB é número total de determinações.

A determinação da concentração mínima de analito em uma amostra que pode ser determinada com certa probabilidade, mas não necessariamente quantificada com exatidão é chamada LoD. Para sua determinação, foram realizadas dosagens de 4 amostras de soro humano com baixas concentrações do analito em 5 repetições por dia, durante 3 dias, sendo também usado um controle para validar o resultado. O LoD é calculado pela fórmula (iii):

$$LoD = LoB + c_p SD_L \quad (iii)$$

Em que,

$$SD_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^J (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)}}$$

SD_L = Desvio Padrão total dos resultados.

SD_i = Desvio Padrão para os resultados de cada amostra.

n_i = número de resultados para cada amostra.

J = número de amostras.

e

$$c_p = \frac{1,645}{1 - \left(\frac{1}{4(L-J)}\right)}$$

C_p = Multiplicador para obter 95% da distribuição normal.

L = número total de resultados de amostras.

J = número de amostras.

Já o LoQ é determinado pela menor concentração de analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com exatidão e precisão. Para fins de cálculo foram dosadas 4 amostras de concentrações conhecidas: 0,2 ; 0,5; 1,0 e 1,5 umol/L de TBA, próximas ao LoD do analito em 3 repetições por dia, incluindo um controle, durante 3 dias. Para cada uma das amostras foram calculados o erro total, através da fórmula (iv) abaixo representada

$$TE = \sqrt{s^2 + Bias^2} \quad (iv)$$

Onde:

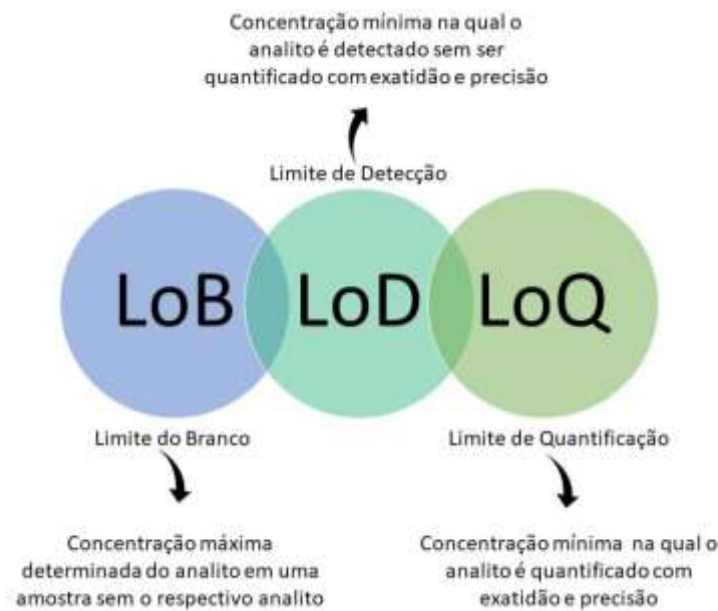
$Bias$ = Média obtida - R

s = Desvio padrão das dosagens da amostra

R = Valor esperado para a amostra

A menor concentração cujo erro total é menor que o erro total do analito, é a determinação do LoQ.

Figura 18 – Ensaio de sensibilidade analítica



Limite do Branco, de detecção e quantificação que compõem o ensaio de sensibilidade analítica.

5.3.4 DETERMINAÇÃO DO INTERVALO OPERACIONAL DA FORMULAÇÃO DE TBA

O ensaio para determinação do intervalo operacional do produto é conhecido como teste de linearidade e refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito (BRITO et al., 2003). Para determinar esse intervalo, foram preparadas soluções denominadas Amostra Baixa (AB) e Amostra Alta (AA). As análises foram feitas no analisador BS-240, sendo o ensaio validado pela determinação dos controles Randox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Randox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022).

A solução AB foi preparada em uma concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ de TBA, valor desejado para o limite inferior do intervalo operacional e escolhido com base no valor de LoQ já estabelecido. A solução AA foi preparada em uma concentração próxima ao limite superior desejado de 250 $\mu\text{mol/L}$, tomando como referência os valores de intervalo operacional de testes já comercializado deste mesmo método. A partir dessas amostras, preparou, em balança semi-analítica, as diluições expostas na Tabela 9 e realizou as suas dosagens em triplicata. Com base na proporcionalidade

das diluições, determinou as concentrações teóricas para cada ponto a partir da concentração inicial das soluções AB e AA (Figura 19).

Tabela 9 – Proporção de preparo de diluições de linearidade

Diluição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AB (%)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
AA (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Diluições com amostra baixa e alta de TBA para realização da linearidade

Figura 19 – Ensaio de determinação do intervalo operacional do produto



Diluições preparadas a partir de AA e AB de TBA para posterior dosagem pela formulação de TBA.

O Desvio da Linearidade (DL%), que representa a diferença entre a concentração teórica e a obtida pela média das determinações para cada diluição, foi calculado utilizando a Equação v:

$$DL\% = \frac{\text{Concentração obtida} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} * 100 \quad (v)$$

Os resultados foram analisados em planilha do Excel, obtendo o gráfico de correlação, considerando os resultados obtidos no eixo Y e os valores teóricos no eixo X. Avaliou-se também os resultados do desvio da linearidade em função da concentração teórica do analito, obtendo o gráfico de dispersão, considerando os DL% no eixo Y e os valores teóricos do analito no eixo X.

Como parâmetro de aprovação da linearidade foi definido que o desvio de linearidade seja menor que 35% do menor erro total da TBA. Além disso, a análise estatística deve resultar em um p-valor menor que 0,05, o que representa 5% de nível de significância. Por fim, a equação de regressão linear obtida deve apresentar um

valor de coeficiente angular entre 0,9 e 1,1, um intercepto menor que o Limite de Quantificação definido pela sensibilidade e um coeficiente de correlação (R) maior que 0,99 ($R^2 > 0,9801$).

5.3.5 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA

Ao se realizar ensaio completo para registro de um produto na ANVISA e notificação junto ao MAPA é necessário apresentar estudos de estabilidade do produto. São eles: estabilidade em tempo real, estabilidade em uso, estabilidade em *bulk*, estabilidade de transporte. De modo que seja estabelecido o tempo de prateleira do produto, no entanto, esses testes devem ser realizados durante todo o período de validade pretendido. Dessa forma, para que o produto possa ser comercializado com agilidade é realizado o teste de estabilidade acelerada, que visa prever a estabilidade real através de submissão do reagente ao estresse de temperatura, teste descrito abaixo.

5.3.5.1 ESTABILIDADE ACELERADA

O estudo da estabilidade acelerada é realizado a fim de verificar a capacidade reacional do produto após sua exposição à uma temperatura elevada por um período pré-determinado a fim de estimar sua validade. O estudo se baseia no princípio de que as reações químicas obedecem à equação de Arrhenius, a qual prevê que, em um processo homogêneo, um incremento de 10°C na temperatura resulta em dobrar a sua velocidade de degradação química. Neste estudo, o produto é submetido a uma elevação de temperatura por um período de tempo pré-determinado e avaliado quanto à capacidade de manter o seu desempenho. Por meio do estudo estima-se a validade do produto a qual será comprovada pelo Estudo de Estabilidade em Tempo Real. O prazo de validade estimado será obtido pela equação (vi) abaixo.

$$\text{Prazo de validade (meses)} = \frac{\text{Dias estudados} * 2^{\left(\frac{T1-T2}{10}\right)}}{30} \quad (vi)$$

Onde: T2 é a temperatura de estudo (37 °C);

T1 é a temperatura de armazenamento recomendada (5 °C)

As análises foram realizadas antes de submeter o reagente ao estresse e a cada dia por pelo menos 7 dias em estufa ou até perda reacional. Em cada período realizou a determinação de pelo menos um controle, sendo analisado o perfil de calibração de cada dia (Figura 20).

Como critério de aceitabilidade os controles deveriam estar dentro do intervalo de variação estabelecido. Além disso, ao observar o produto em tubos transparentes os reagentes deveriam apresentar as seguintes características visuais:

- Solução 1: Líquido amarelo claro e transparente.
- Solução 2: Líquido incolor e transparente.

Os testes foram realizados no analisador BS-240 e foram usados os controles Randox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Randox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022).

Figura 20 – Estudo da Estabilidade do produto



A formulação antes e depois de armazenamento em estufa 37^o C é submetida a testes de desempenho para garantir características.

5.3.5.2 ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

Para cada um dos pilotos descritos na tentativa de melhorar o desempenho da formulação frente a temperatura de 37^oC, no sistema automático de análise AU400 foram dosados pelo menos um controle, valorados em triplicata. Para entender o impacto de cada alteração na concentração ou adição de compostos, duas amostras de soro com valores conhecidos, sendo um humano e um animal, foram dosadas com cada piloto. Sendo os controles utilizados dentro da validade estabelecida para o produto: Randox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Randox 3 (Lote: 982UE,

Validade:11/2022). Foi analisado também o perfil reacional de cada formulação em comparação com o concorrente G.

Para que o teste comparativo seja válido, os controles devem estar dentro da faixa de referência estabelecida para o analito.

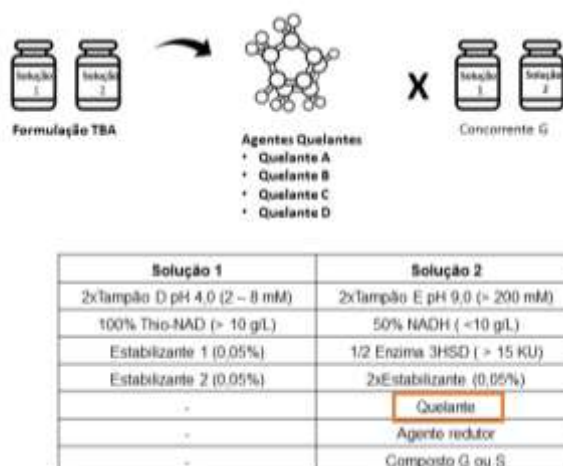
Para estudo da estabilidade, cada formulação foi armazenada em estufa 37° C e avaliada no intervalo diário por pelo menos 7 dias ou até apresentar perda reacional, sendo avaliado o fator de calibração, controles em dois níveis e amostras de soro animal e humano. Além disso, foi avaliado o aspecto visual dos reagentes como descrito no item 5.3.5.1.

5.3.5.2.1 AGENTES QUELANTES

Para tentar evitar a degradação dos compostos da formulação por temperatura foram testados agentes quelantes conforme demonstração em literatura.

Para isso foram testadas as formulações: (1) sem quelante, (2) quelante A, (3) quelante B, (4) quelante C e (5) quelante D (Figura 21).

Figura 21 – Estudo dos agentes quelantes na formulação de TBA

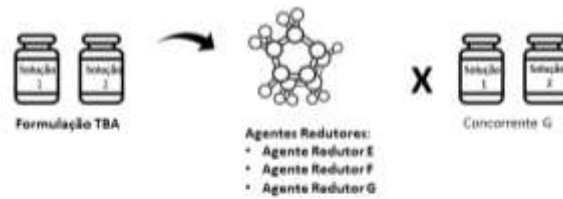


Teste de quelantes na formulação de TBA contra dosagens de concorrente G.

5.3.5.2.2 AGENTES REDUTORES

Foram testados 3 agentes redutores na formulação com o objetivo de melhorar sua estabilidade, resultando nas seguintes formulações: (1) agente redutor E, (2) agente redutor F e (3) agente redutor G (Figura 22).

Figura 22 – Estudo dos agentes redutores



Solução 1	Solução 2
2xTampão D pH 4,0 (2 – 8 mM)	2xTampão E pH 9,0 (= 200 mM)
100% Thio-NAD (> 10 g/L)	50% NADH (<10 g/L)
Estabilizante 1 (0,05%)	1/2 Enzima 3HSD (> 15 KU)
Estabilizante 2 (0,05%)	2xEstabilizante (0,05%)
-	Quelante
-	Agente redutor
-	Composto G ou S

Teste de agentes redutores na formulação de TBA contra dosagens do concorrente G.

5.3.5.2.3 AVALIAÇÃO DO COMPOSTOS S e G

Foram testados dois compostos com interesse em melhorar o meio reacional da enzima, resultando nas as seguintes formulações: (1) composto S e (2) composto G (Figura 23).

Figura 23 – Estudo dos compostos S e G na formulação do produto



Solução 1	Solução 2
2xTampão D pH 4,0 (2 – 8 mM)	2xTampão E pH 9,0 (= 200 mM)
100% Thio-NAD (> 10 g/L)	50% NADH (<10 g/L)
Estabilizante 1 (0,05%)	1/2 Enzima 3HSD (> 15 KU)
Estabilizante 2 (0,05%)	2xEstabilizante (0,05%)
-	Quelante
-	Agente redutor
-	Composto G ou S

Adição de composto G e composto S na formulação de TBA contra dosagens do concorrente G.

5.3.5.2.4 SAL, SOLVENTE ORGÂNICO E DETERGENTE

Em literatura científica, para estabilização da reação de determinação de TBA são nomeados diferentes sais, solvente orgânicos e detergentes. Sendo assim foram testados adição de um sal, um detergente e um solvente orgânico, resultando nas seguintes formulações: (1) sal, (2) detergente, (3) solvente orgânico (Figura 24).

Figura 24 – Estudo da presença de sal, solvente orgânico e detergente na formulação de TBA

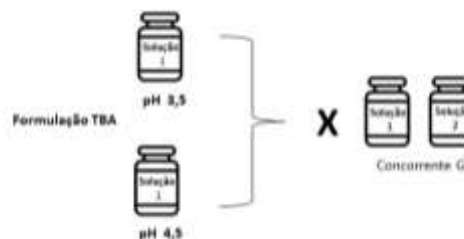


Teste da presença de solvente orgânico, detergente e sal na formulação de TBA contra dosagens do concorrente G.

5.3.5.2.5 ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 1

É estabelecido um pH de 4,0 para a solução 1 da formulação birreagente de quantificação de TBA. No entanto para avaliar a estabilidade e melhor desempenho para a formulação foram preparados diferentes Soluções 1 com diferentes pHs, sendo: (1) pH 3,5 e (2) pH 4,5. Cada solução foi avaliada com uma Solução 2 que permaneceu em geladeira para evitar outros fatores de variação (Figura 25).

Figura 25 – Estudo do pH da solução 1 de TBA

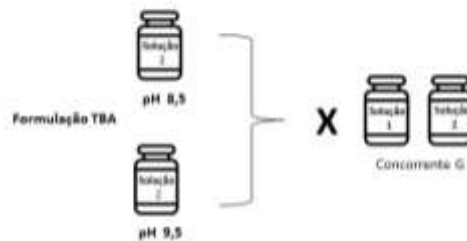


Diferentes pHs da solução 1 da formulação de TBA contra Concorrente G.

5.3.5.2.6 ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 2

É estabelecido um pH de 9,0 para a Solução 2 da formulação birreagente de quantificação de TBA. No entanto para avaliar a estabilidade e melhor desempenho para a formulação foram preparados diferentes Soluções 2 com diferentes pHs, sendo: (1) pH 8,5 e (2) pH 9,5. Cada Solução 2 foi avaliada com uma Solução 2 que permaneceu em geladeira para evitar outros fatores de variação (Figura 26).

Figura 26 – Estudo do pH da solução 2 de TBA



Diferentes pHs da solução 1 da formulação de TBA contra Concorrente G.

5.4 DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA

A formulação final de TBA foi determinada considerando todas as modificações anteriores conforme demonstrado pela Figura 27.

Figura 27 – Determinação da formulação final de TBA



Formulação Final de TBA após todas as modificações realizadas na primeira formulação proposta.

5.4.1 ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL

A análise da estabilidade acelerada foi determinada para a formulação final, de modo a analisar o perfil reacional e dosagem de amostras por pelo menos sete dias de armazenamento a 37° C. Dessa forma, foram determinados pelo menos um controle para validar a corrida analítica e duas amostras de soro.

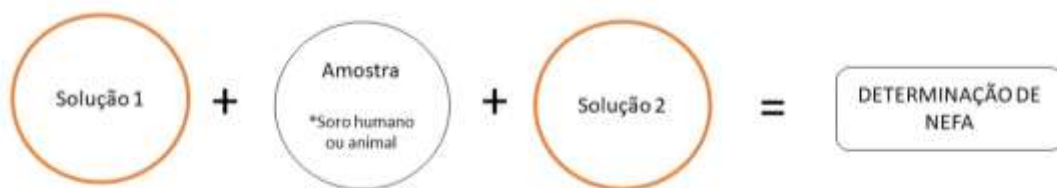
5.4.2 AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL

Para avaliação da formulação final de TBA, foi realizado novamente uma análise da exatidão da formulação final, com a dosagem de 40 amostras, sendo 20 de soros humanos e 20 de soros animais, determinando pelo menos um controle para validar a corrida analítica. Além disso, é importante salientar que nessas 40 amostras foram determinadas todo o intervalo operacional do reagente de modo a validar a sensibilidade e linearidade analítica, de forma a avaliar que as mudanças necessárias para a estabilidade não alteraram os parâmetros já obtidos com a formulação de TBA.

5.5 FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE NEFA

O funcionamento de um kit diagnóstico é descrito pela Figura 28.

Figura 28 – Esquema do funcionamento de um kit diagnóstico de NEFA



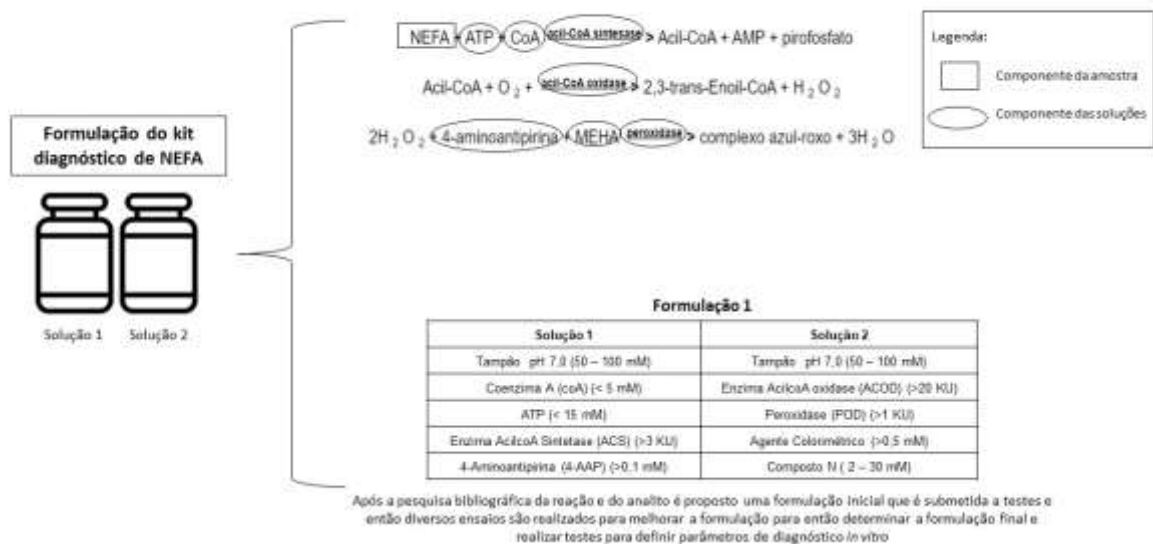
Um kit diagnóstico é composto por duas soluções que quando em contato com a amostra humana e/ou animal permite a reação química que então determina o analito.

5.5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE NEFA

Foi realizado um levantamento bibliográfico que incluiu artigos científicos, patentes e instruções de uso de produtos de empresas concorrentes para maior

entendimento sobre o teste e então determinação dos componentes e suas respectivas concentrações, a fim de propor uma formulação base para o kit de quantificação de ácidos graxos não esterificados (NEFA) (Figura 30). As condições iniciais para realização do ensaio (pH, temperatura, tempo de reação, comprimento de onda e proporção entre os reagentes) e melhor proveito da reação também foram determinadas com base na pesquisa na literatura (Figura 29).

Figura 29 – Determinação da formulação e padronização da reação de NEFA



Determinação da formulação inicial do kit de NEFA com base na revisão de literatura e determinação da reação do analito.

5.5.1 AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA

A análise da formulação base de NEFA foi realizada de mesma forma descrita para o TBA. Para analisar o desempenho da formulação base proposta, foram dosadas dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal (que variaram em espécies entre caninos, felinos e bovinos) que tiveram seus resultados comparados com os valores dosados pelo concorrente B que corresponde a marca Beijing, levando em conta o erro total permitido para o analito como critério de aceitabilidade do ensaio analítico. Além disso, foi avaliado o desempenho da formulação frente dois controles de dois níveis diferentes, de modo que em analisador

automático AU400 os controles externos Radox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Radox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022).

Figura 30 – Levantamento bibliográfico para formulação inicial de NEFA



Revisão bibliográfica composta por artigos, patentes e instruções de uso.

5.6 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA

Para cada ensaio de otimização da formulação foram produzidos pequenos pilotos para testar as diferentes concentrações e diferentes compostos. Para a calibração da formulação desenvolvida foi atribuída a rastreabilidade e valor do calibrador do concorrente B que é proveniente de ensaio espectrofotométrico UV, tal atribuição corresponde ao ensaio de rastreabilidade do produto.

A rastreabilidade consiste na capacidade de relacionar o resultado de uma medição à uma referência, por meio de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, tendo como finalidade reduzir a variabilidade entre métodos (FERNANDES; WOLLINGER; GARRIDO, 2019; INMETRO/IPQ, 2009).

Para cada um dos pilotos descritos, no sistema automático de análise de equipamento automático foram dosados pelo menos um controle, valorados em triplicata, e para entender o impacto de cada alteração, 20 amostras de soro, sendo 10 humano e 10 animal (distribuídas em caninos, felinos e bovinos) foram dosadas com cada piloto e comparados com os valores obtidos por um kit comercial de NEFA de mesma metodologia, denominado concorrente B. Sendo os controles utilizados

dentro da validade estabelecida para o produto: Radox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Radox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022) e Controle Normal 1 (L: 20-0817 V: 02/2022) e Controle normal 2 (L: 20-0817 V: 02/2022). Foi analisado também o perfil reacional de cada formulação em comparação com o concorrente B.

Para que o teste comparativo seja válido, os controles devem estar dentro da faixa de referência estabelecida para o analito. Além disso, os erros entre os valores obtidos pelo concorrente B e cada piloto foi analisado com base no erro total permitido para o analito, para o NEFA é de $\pm 40\%$ determinado por Karpe. (KARPE; DICKMANN; FRAYN, 2011). O kit comercial utilizado encontrava-se dentro do prazo de validade determinado na embalagem e foi usado de acordo com as instruções de uso do fabricante.

As leituras de absorbância foram analisadas através do fator de calibração, seguindo a equação (vii) aqui apresentada.

$$\text{Concentração } \left(\frac{mg}{dL} \right) = \text{Fator de calibração} * \text{Absorbância (vii)}$$

5.6.1 DETERMINAÇÃO DO TAMPÃO OU SOLVENTE ORGÂNICO DA FORMULAÇÃO

Na literatura é possível encontrar formulações bi reagentes para determinação dos NEFA com a metodologia ACOD/ACS que são formuladas com solvente ou tampão orgânico. Dessa forma, foram testados três tampões diferentes e três solventes orgânicos para definir qual seria utilizado para a formulação dos NEFA, sendo: (1) tampão 1, (2) tampão 2, (3) tampão 3, (4) solvente 1, (5) solvente 2, (6) solvente 3 e (7) solução aquosa (Figura 31).

Figura 31 – Avaliação da formulação de NEFA em tampão, solvente orgânico e água



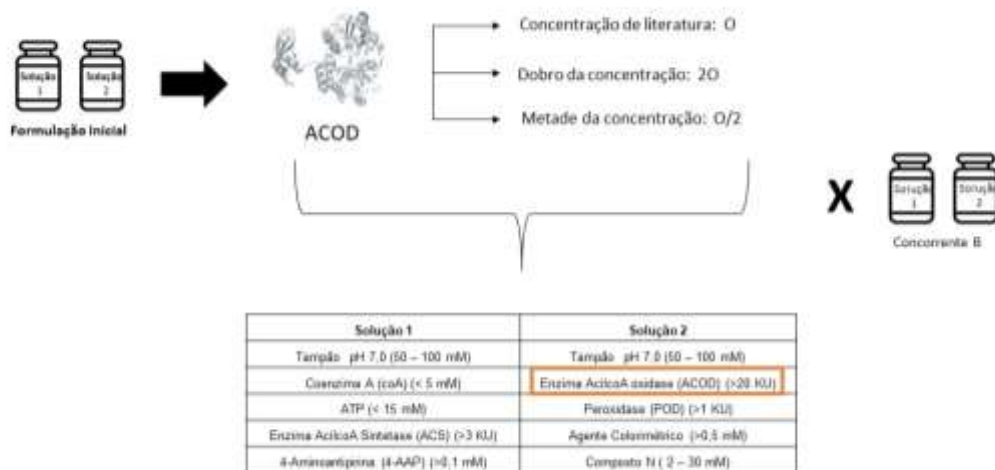
Teste da formulação de NEFA com três tampões, três solventes e solução aquosa contra concorrente B.

5.6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS DA REAÇÃO

5.6.2.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACOD

Para o ensaio enzimático de determinação dos NEFA utiliza-se a enzima AcilcoA Oxidase (ACOD). Na tentativa de encontrar a concentração da enzima correta para a formulação foram testadas formulações com as determinadas concentrações: (1) O/2 correspondendo a metade da concentração encontrada em literatura, (2) O correspondendo ao valor encontrado na literatura para a enzima e (3) 2^o correspondendo ao dobro da concentração encontrada em literatura (Figura 32).

Figura 32 – Teste da concentração da enzima ACOD na formulação de NEFA

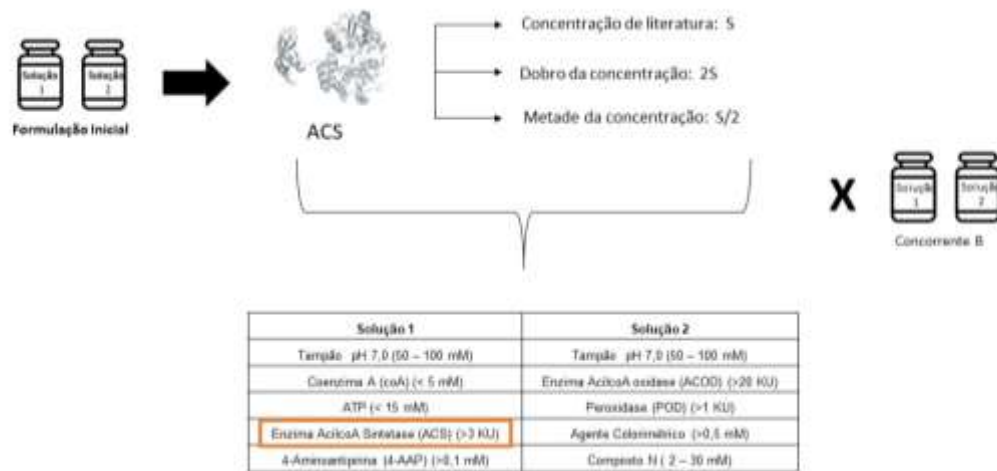


Avaliação da concentração da enzima ACOD na formulação de NEFA contra dosagens do concorrente B.

5.6.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACS

Para o ensaio enzimático de determinação dos NEFA utiliza-se a enzima AcilcoA Sintetase (ACS). Na tentativa de encontrar a concentração da enzima correta para a formulação foram testadas formulações com as determinadas concentrações: (1) S/2 correspondendo a metade da concentração encontrada em literatura, (2) S correspondendo a concentração encontrada na literatura e (3) 2S correspondendo ao dobro da concentração encontrada na literatura (Figura 33).

Figura 33 – Teste da concentração da enzima ACS na formulação de NEFA



Avaliação da concentração da enzima ACS na formulação de NEFA contra dosagens do concorrente B.

5.6.2.3 DETERMINAÇÃO DO COFATOR ENZIMÁTICO

Na tentativa de melhorar a reação foram testados quatro diferentes cofatores enzimáticos, sendo: (1) M, (2) N e (3) O e (4) P (Figura 34).

Figura 34 – Teste de cofatores enzimáticos na formulação de NEFA

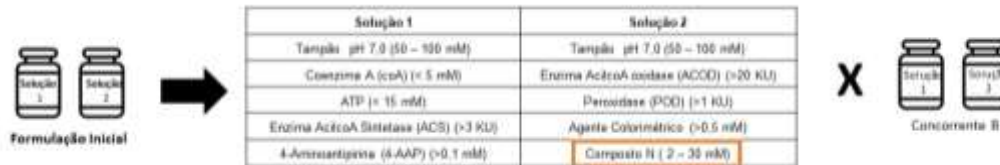


Teste de quatro cofatores na formulação de NEFA contra concorrente B.

5.6.3 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO COMPOSTO N NO REAGENTE DE NEFA

O Composto N foi encontrado em literatura para que o ensaio de determinação dos NEFA fosse realizado de forma efetiva. Dessa forma o composto foi adicionado à formulação e testado (Figura 35).

Figura 35 – Teste do composto N na formulação de NEFA



Avaliação da presença ou ausência do composto N na formulação de NEFA contra o concorrente B.

5.7 VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE NEFA

5.7.1 PRÉVIA DA ESPECIFICIDADE ANALÍTICA NEFA

5.7.1.1 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO

O ensaio de especificidade analítica de interferentes foi executado de acordo com o protocolo descrito para o teste de TBA.

5.7.1.2 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE TRIGLICÉRIDES

O ensaio de especificidade analítica de interferentes foi executado de acordo com o protocolo descrito para o teste de TBA.

5.7.1.3 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE HEMOGLOBINA

O ensaio de especificidade analítica de interferentes foi executado de acordo com o protocolo descrito para o teste de TBA.

5.7.1.4 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE BILIRRUBINA

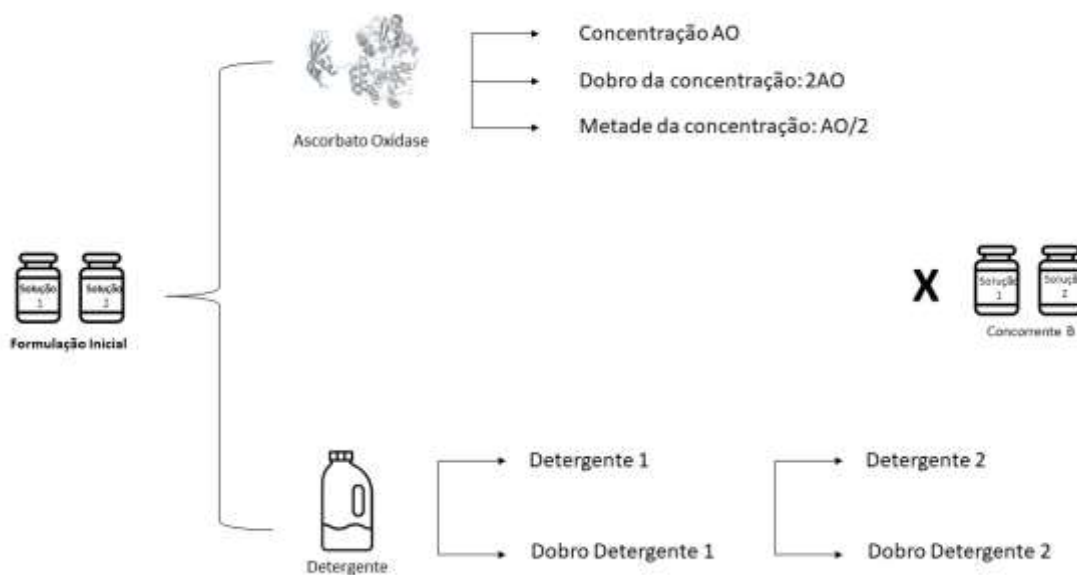
O ensaio de especificidade analítica de interferentes foi executado de acordo com o protocolo descrito para o teste de TBA.

5.7.2 ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR PERFORMANCE

Para diminuir a interferência de ácido ascórbico foi adicionada a enzima ascorbato oxidase em diferentes concentrações, sendo: (1) 1/2 AO correspondendo a metade da concentração encontrada em literatura, (2) AO correspondendo a concentração encontrada em literatura e (3) 2 AO que corresponde ao dobro da concentração encontrada em literatura (Figura 36).

Enquanto que para melhorar a interferência de triglicérides foram testados dois diferentes detergentes em duas diferentes concentrações, sendo: (4) detergente 1 e (5) Dobro detergente 1, (6) detergente 2 e (7) Dobro detergente 2 (Figura 36).

Figura 36 – Adição de compostos para diminuir interferência de ácido ascórbico e triglicérides na formulação de NEFA



Adição de ascorbato oxidase e detergente para diminuir interferência por ácido ascórbico e triglicérides.

5.7.3 PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA

Foi estabelecido a prévia da exatidão para a formulação, de modo que o desempenho de 20 amostras de soro humano e 20 amostras animais (entre caninos, felinos e bovinos) foram analisados e um controle previamente dosado, sendo todos os parâmetros de aceitabilidade da exatidão analisados como protocolo descrito e

realizado para TBA. Além disso, também houve a verificação do desempenho frente aos níveis de decisão médica.

5.7.4 PRÉVIA DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA

O ensaio de sensibilidade analítica da formulação foi realizado de mesma forma que o protocolo descrito anteriormente para o reagente de TBA, de modo a determinar o LoB, LoD e LoQ.

5.7.5 PRÉVIA DA DETERMINAÇÃO DO INTERVALO OPERACIONAL DA FORMULAÇÃO DE NEFA

O ensaio de Linearidade da formulação foi realizado de mesma forma que o protocolo descrito anteriormente para o reagente de TBA, de modo a determinar o intervalo operacional do kit.

5.7.6 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO DE NEFA

5.7.6.1 ESTABILIDADE ACELERADA

Para estimar a estabilidade em tempo real do reagente, a estabilidade acelerada do NEFA foi determinada conforme metodologia descrita para o TBA no item 5.3.5.1.

Para cada um dos pilotos descritos na tentativa de melhorar o desempenho da formulação frente a temperatura de 37^o C, no sistema automático de análise Cobas Mira Plus foram dosados pelo menos um controle, valorados em triplicata, e para entender o impacto de cada alteração na concentração ou adição de compostos, duas amostras de soro, sendo um humano e um soro animal foram dosadas com cada piloto e comparados com os valores obtidos por um kit comercial de NEFA de mesma metodologia, denominado concorrente B. Os controles utilizados dentro da validade estabelecida para o produto foram Randox 2 (Lote: 1393UN, Validade:03/2023) e Randox 3 (Lote: 982UE, Validade:11/2022), Controle Normal 1 (L: 20-0817 V: 02/2022) e Controle normal 2 (L: 20-0817 V: 02/2022).

Para que o teste comparativo seja válido, os controles devem estar dentro da faixa de referência estabelecida para o analito.

Para o estudo da estabilidade, cada formulação foi armazenada em estufa 37° C e avaliada no intervalo diário por pelo menos 7 dias ou até apresentar perda reacional, sendo avaliado o fator de calibração, controles em dois níveis e amostras de soro animal e humano (Figura 37). Além disso, ao observar o produto em tubos transparentes os reagentes deveriam apresentar as seguintes características visuais:

- SOLUÇÃO 1: Líquido incolor e transparente.
- SOLUÇÃO 2: Líquido laranja e transparente.

Figura 37 – Estudo da estabilidade acelerada da formulação de NEFA



A formulação de NEFA antes e depois de armazenamento a 37° C é submetida a testes de desempenho.

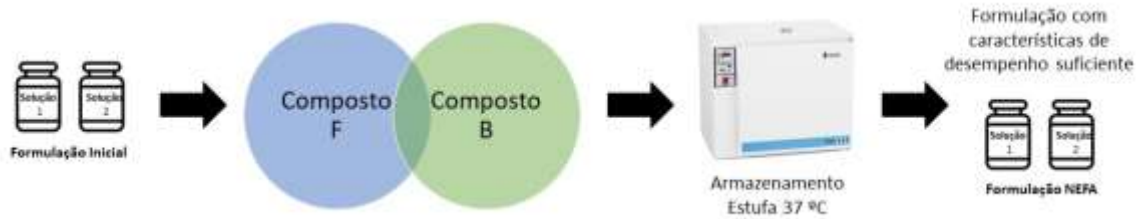
5.8 TESTES PARA MELHORAR A ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

5.8.1 ADIÇÃO DO COMPOSTO F e B NA FORMULAÇÃO DE NEFA PARA PREVINIR PRECIPITAÇÃO

Foi avaliada a presença do composto F e do composto B na formulação para tentar prevenir a precipitação (Figura 38).

Cada formulação foi avaliada em relação perfil de reação, valores em controles e soros. Também foi avaliado o aspecto visual de cada reagente de modo a observar presença de precipitação.

Figura 38 – Avaliação do composto F e B na formulação de NEFA

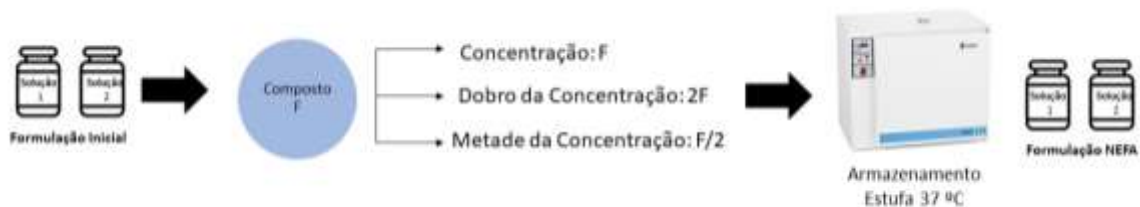


Avaliação da ausência ou presença do composto F e B na formulação de NEFA

5.8.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO F NA FORMULAÇÃO

Como o composto F se mostrou eficiente na prevenção da precipitação, foi avaliado diferentes concentrações para definir a concentração ideal para a formulação ideal e NEFA, sendo: (1) $1/2 F$ que corresponde a metade da concentração encontrada na literatura para o composto, (2) F que corresponde a concentração encontrada em literatura e (3) $2F$ que corresponde ao dobro da concentração encontrada na literatura para o composto (Figura 39).

Figura 39 – Avaliação da concentração do composto F na formulação de NEFA



Avaliação de diversas concentrações do composto F na formulação de NEFA

5.8.3 DETERMINAÇÃO DE SURFACTANTES

Foram testados seis surfactantes para melhorar a estabilidade da formulação, sendo: (1) surfactante A, (2) surfactante B, (3) surfactante C, (4) surfactante D, (5) surfactante E e (6) surfactante F (Figura 40).

Todos foram testados em três diferentes concentrações de modo a avaliar o comportamento do reagente frente ao composto adicionado, sendo a concentração original, metade e o dobro da mesma.

Figura 40 – Avaliação de surfactantes na formulação de NEFA



Avaliação de cinco surfactantes na formulação de NEFA

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE TBA

6.1.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE TBA

A formulação base para o kit colorimétrico *in vitro* para quantificação de Ácidos Biliares Totais (TBA) foi baseada nos achados do seguinte levantamento bibliográfico: (DIAS, 2012), (HANSON; FREIER, 1983), (MATSUBARA et al., 1983), (MIKSA; BUCKLEY; POPPENG, 2004), (SARAFIDIS; BAKRIS, 2007), (SHIMIZU et al., 1980), (LIU et al., 2018), (QURESHI; SMITH; MURPHY, 1984), e (DIAZYME LABORATORIES, 2010). Todas as informações aqui apresentadas são propriedade intelectual da Biotécnica Indústria LTDA, por isso, foram codificadas ou apresentadas de maneira abrangente para proteção do segredo industrial da formulação.

De modo geral, através da interpretação dos dados da literatura a formulação birreagente de TBA foi elaborada como descrito na Tabela 10, visando execução correta do ensaio de determinação do analito.

Tabela 10 – Primeira formulação proposta para o kit de quantificação de TBA, com base na literatura.

Solução 1	Solução 2
Tampão C pH 4,0 (2 – 8 mM)	Tampão F pH 9,0 (> 200 mM)
Thio-NAD (> 10 g/L)	NADH (<10 g/L)
Estabilizante 1 (0,05%)	Enzima 3HSD (> 15 KU)
Estabilizante 2 (0,05%)	Estabilizante (0,05%)

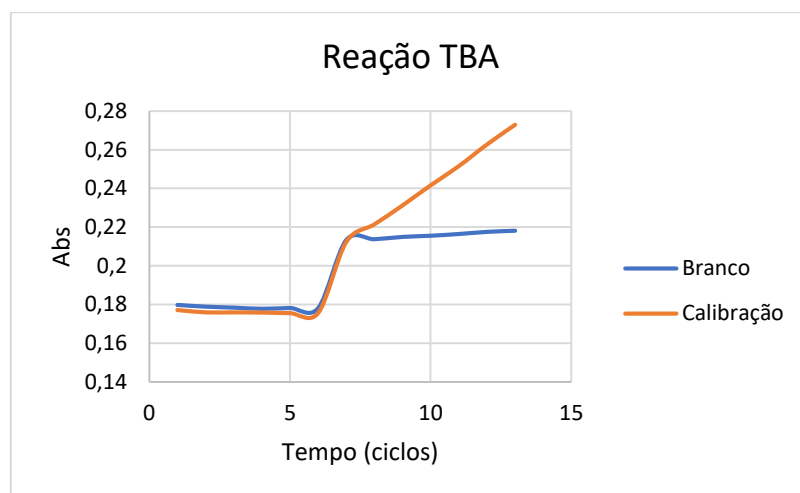
Componentes da Solução 1 e 2 da formulação de TBA

O protocolo de ensaio foi estabelecido também com base na literatura, principalmente com as instruções de uso dos concorrentes e estão apresentados na Tabela 11. As amostras e reagentes utilizados na proporção de 3 μL de amostra para 300 μL de reagente, sendo 225 μL de Solução 1 e 75 μL de Solução 2, ou seja, três partes de Solução 1 para uma parte de Solução 2. A reação ocorreu sob incubação a 37°C por 8 minutos. Sendo realizado as leituras de absorvância nos tempos T1 e T2, de 6 e 8 minutos, respectivamente em uma reação crescente (Gráfico 1). A leitura é feita a 410 nm.

Tabela 11 – Parâmetros de reação para realização dos testes

Comprimento de onda	410 nm
Temperatura de reação	37°C
Tipo de reação	Ponto final
Volume de amostra	3 μL
Volume de Solução 1	275 μL
Volume de Solução 2	75 μL
Incubação de Solução 1 + amostra	300 segundos
Incubação de Solução 1 + amostra + Solução 2	180 segundos

Gráfico 1 – Perfil reacional de TBA



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação.

O principal objetivo de um laboratório de análises clínicas é prover informações úteis para basear decisões médicas e otimizar a saúde dos pacientes. Tais informações devem ser interpretáveis em qualquer laboratório e os resultados devem ser os mesmos mensurados por todas as variedades de procedimentos de

mensuração e todos os laboratórios. A habilidade de mensurar resultados equivalentes aos dos demais lugares, depende do teste de rastreabilidade metrológica aos padrões comuns conhecidos e disponíveis (CLSI,2006). Dessa forma, a rastreabilidade metrológica é definida como um teste que permite compatibilidade dos valores obtidos nos testes de laboratórios entre laboratórios, regiões e países. O conceito do teste é definido pelo International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM) a propriedade do resultado de uma medição ou o valor de um padrão pelo qual pode ser relacionado a referências declaradas, geralmente padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia ininterrupta de comparações, todas tendo incertezas declaradas (CLSI,2006) (ISSO,2004). A calibração do kit de TBA é rastreável ao ensaio espectrofotométrico UV proveniente do calibrador do concorrente.

6.1.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO INICIAL

A formulação inicial foi preparada em balança analítica e seguindo as instruções encontradas na literatura. Foi realizado uma análise do aspecto visual do reagente preparado na formulação inicial contra a formulação do concorrente G. Foi possível observar que o aspecto visual da formulação inicial e do concorrente se encontram iguais, de modo que a solução 1 se apresenta amarelo claro e transparente e a solução 2 incolor e transparente (Figura 41).

Para avaliação do desempenho inicial da formulação, em equipamento automático AU400, as concentrações obtidas para algumas amostras de soro humano e animal em comparação com o concorrente G na Tabela 12, o teste avaliou o desempenho da formulação desenvolvida com um concorrente de comercialização, cujo valor dosado é tido como correto. Tal teste é chamado de exatidão. O teste de exatidão analítica mostra a capacidade do método desenvolvido de apresentar resultados próximos do valor verdadeiro (OLIVEIRA; MENDES, 2010). Segundo a IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), a exatidão visa demonstrar a concordância entre o valor medido e o seu valor real. O Sistema Nacional de Referência para Laboratórios Clínicos americano (NRSCL) preconiza que é possível avaliar a acurácia do método ao comparar o desempenho utilizando um reagente de mesma metodologia e qualidade garantida (OLIVEIRA; MENDES, 2010). Dessa forma, obedecendo todos os parâmetros supracitados foi determinado que para

quantificação de TBA seria utilizado o concorrente G, de um fornecedor que já se encontrava dentro das regulamentações tratando-se de um kit de mesma metodologia. Foram testados um controle de nível baixo e um controle de nível alto para validar a corrida analítica., uma vez que a atribuição de controles em pelo menos dois níveis (baixo e alto) assegura um processo e um teste mais eficaz (OLIVEIRA, MENDES, 2012).

Uma análise quantitativa apresenta dois tipos de erros, o aleatório e o sistemático, sendo o erro total a combinação desses dois tipos de erro. Dessa forma para que um sistema analítico possa ser considerado válido é preciso quantificar o erro e julgar se essa grandeza é suficiente para afetar a interpretação dos resultados de forma a comprometer o diagnóstico e prognóstico de pacientes (BASQUES,2010). Dessa forma, os valores dos soros de matriz humano e animal plotados na tabela são analisados levando em conta o erro total do analito, para o TBA esse erro foi encontrado na base de dados da RCPA Quality Assurance Program Pty Limited da patologia clínica juntamente com a associação australiana de clínica bioquímica (CHEMICAL et al., 2010). O erro para o Ácidos Biliares Totais é determinado em ± 4 em amostras de concentração até $40 \mu\text{mol/L}$ ou 10% em concentrações maiores que $40 \mu\text{mol/L}$.

Figura 41 – Aspecto visual Solução 1/Solução 2 Formulação Base X Concorrente G



O aspecto visual das soluções 1 e 2 da formulação proposta e do concorrente G são iguais.

Tabela 12 – Desempenho inicial da formulação base frente ao concorrente G

	Concorrente G (umol/L)	Formulação Inicial TBA (umol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	2824,86	-
Radox 2 (17,2 - 25,8)	22,45	18,00	-
Radox 3 (38,3 - 57,5)	45,00	38,00	-
SH1	3,13	5,90	88,50
SH2	1,60	1,98	23,75
SH3	1,85	2,50	35,14
SH4	1,30	4,80	269,23
SH5	8,22	11,02	34,06
SH6	9,03	14,23	57,59
SH7	0,69	4,00	479,71
SH8	1,70	5,37	215,88
SH9	2,46	2,84	15,45
SH10	1,03	3,69	258,25
SA11 (bovino)	2,65	4,52	70,57
SA12 (bovino)	1,23	1,98	60,98
SA13 (bovino)	6,10	4,90	-19,67
SA14 (felino)	0,82	2,30	180,49
SA15 (felino)	1,66	0,58	-65,06
SA16 (felino)	1,05	6,30	500,00
SA17 (canino)	3,45	4,58	32,75
SA18 (canino)	0,60	2,60	333,33
SA19 (canino)	1,84	3,78	105,43
SA20 (canino)	1,56	2,69	72,44

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação base de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Radox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

De modo geral, o desempenho da formulação inicial, frente ao concorrente G, demonstrou que os controles dos dois níveis não ficaram muito longe do intervalo do fabricante. Porém, nos soros, tanto nos soros humano quanto animal, os erros ficaram muito acima do pretendido para dosagem de TBA, demonstrando necessidade de ajustes na formulação.

6.2 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE TBA

6.2.1 ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS

6.2.1.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE THIONAD e NADH

Os cofatores enzimáticos da reação de oxidação e redução da enzima 3-alfa-hidroxisteroidehidrogenase para determinação de TBA (Figura 2) desempenham papéis essenciais para o desenvolvimento da reação. Dessa maneira sua variação impacta diretamente na dosagem correta ou não do analito. Por esse motivo, dezesseis formulações que variam as concentrações de ThioNAD e NADH foram testadas contra o concorrente G, sejam elas: (1) 50% ThioNAD e 100% NADH, (2) 100% ThioNAD e 50% NADH, (3) 30%ThioNAD, (4) 30% NADH, (5) 20% ThioNAD, (6) 20% NADH, (7) 50% ThioNAD e 150% NADH, (8) 150% ThioNAD e 50% NADH, (9) 50% ThioNAD e 30% NADH, (10) 30% ThioNAD e 50% NADH, (11) 50% ThioNAD e 20% NADH, (12) 20% ThioNAD e 50% NADH, (13) 30% ThioNAD e 20% NADH e (14) 20% ThioNAD e 30% NADH, (15) 200% ThioNAD e 100% NADH e (16) 100% ThioNAD e 200% NADH. Os resultados das concentrações dos soros humanos e animais de cada formulação encontram-se nas Tabelas 13,14,15,16,17,18,19 e 20. As formulações estão dispostas em duplas nas tabelas e o erro correspondente de cada uma se encontra ao lado direito de dosagem de cada uma.

Tabela 13 – Desempenho Formulação 1 e 2 contra concorrente G.

	Concorrente G ($\mu\text{mol/L}$)	Formulação 1 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)	Formulação 2 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	19230,8	-	2242,15	-
Radox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	16,30	-	17,60	-
Radox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	36,58	-	38,60	-
SH1	4,12	2,25	-45,39	3,78	-8,25
SH2	0,66	2,45	271,21	1,23	86,36
SH3	0,72	0,61	-15,28	1,20	66,67
SH4	0,66	2,56	287,88	1,56	136,36
SH5	23,08	11,02	-52,25	28,90	25,22
SH6	22,58	13,28	-41,19	27,54	21,97
SH7	22,83	0,72	-96,85	28,79	26,11
SH8	3,13	0,51	-83,71	6,87	119,49
SH9	3,13	0,51	-83,71	5,78	84,66
SH10	1,62	0,82	-49,38	3,56	119,75
SA11 (bovino)	2,31	1,95	-15,58	3,98	72,29
SA12 (bovino)	1,85	2,25	21,62	4,56	146,49
SA13 (bovino)	1,74	3,56	104,60	3,42	96,55
SA14 (felino)	1,39	4,56	228,06	2,29	64,75
SA15 (felino)	0,69	1,58	128,99	1,36	97,10
SA16 (felino)	8,22	12,35	50,24	9,82	19,46
SA17 (canino)	9,03	18,52	105,09	10,65	17,94
SA18 (canino)	5,62	4,61	-17,97	7,20	28,11
SA19 (canino)	10,12	7,65	-24,41	12,15	20,06
SA20 (canino)	6,32	4,78	-24,37	7,52	18,99

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 1 e 2 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Radox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

Tabela 14 – Desempenho Formulação 3 e 4 contra concorrente G.

	Concorrente G ($\mu\text{mol/L}$)	Formulação 3 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)	Formulação 4 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	2583,98	-	2564,1	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	15,20	-	16,85	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	35,56	-	38,00	-
SH1	4,12	4,22	2,43	8,19	98,79
SH2	0,66	3,16	378,79	5,93	798,48
SH3	0,72	1,05	45,83	1,98	175,00
SH4	0,66	1,66	151,52	4,8	627,27
SH5	23,08	2,26	-90,21	5,37	-76,73
SH6	22,58	1,51	-93,31	4,8	-78,74
SH7	22,83	-0,45	-101,97	4,8	-78,98
SH8	3,13	0	-100,00	4,8	53,35
SH9	3,13	9,4	200,32	11,02	252,08
SH10	1,62	9,64	495,06	13,28	719,75
SA11 (bovino)	2,31	4,22	82,68	8,19	254,55
SA12 (bovino)	1,85	3,16	70,81	5,93	220,54
SA13 (bovino)	1,74	33,33	1815,52	1,98	13,79
SA14 (felino)	1,39	16,67	1099,28	4,8	245,32
SA15 (felino)	0,69	29,17	4127,54	5,37	678,26
SA16 (felino)	8,22	5,62	-31,63	8,54	3,89
SA17 (canino)	9,03	6,53	-27,69	7,56	-16,28
SA18 (canino)	5,62	8,98	59,79	2,53	-54,98
SA19 (canino)	10,12	14,54	43,68	12,65	25,00
SA20 (canino)	6,32	14,00	121,52	4,78	-24,37

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 3 e 4 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Randox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

Tabela 15 – Desempenho Formulação 5 e 6 contra concorrente G.

	Concorrente G ($\mu\text{mol/L}$)	Formulação 5 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)	Formulação 6 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	1725,63	-	1548,52	-
Radox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	17,85	-	18,20	-
Radox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	39,52	-	38,98	-
SH1	4,12	7,58	83,98	4,8	16,50
SH2	0,66	0,89	34,85	5,37	713,64
SH3	0,72	1,24	72,22	4,8	566,67
SH4	0,66	0,69	4,55	4,8	627,27
SH5	23,08	28,52	23,57	4,8	-79,20
SH6	22,58	26,35	16,70	11,02	-51,20
SH7	22,83	25,55	11,91	13,28	-41,83
SH8	3,13	8,19	161,66	4,8	53,35
SH9	3,13	5,93	89,46	4,58	46,33
SH10	1,62	1,98	22,22	2,87	77,16
SA11 (bovino)	2,31	4,22	82,68	3,54	53,25
SA12 (bovino)	1,85	3,16	70,81	2,45	32,43
SA13 (bovino)	1,74	1,05	-39,66	2,38	36,78
SA14 (felino)	1,39	1,66	19,42	2,69	93,53
SA15 (felino)	0,69	2,26	227,54	2,20	218,84
SA16 (felino)	8,22	4,22	-48,66	8,51	3,53
SA17 (canino)	9,03	3,16	-65,01	9,87	9,30
SA18 (canino)	5,62	1,05	-81,32	6,38	13,52
SA19 (canino)	10,12	5,23	-48,32	12,74	25,89
SA20 (canino)	6,32	7,45	17,88	5,65	-10,60

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 5 e 6 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Radox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

Tabela 16 – Desempenho Formulação 7 e 8 contra concorrente G.

	Concorrente G ($\mu\text{mol/L}$)	Formulação 7 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)	Formulação 8 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	984,72	-	547,36	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	18,52	-	20,18	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	39,62	-	41,75	-
SH1	4,12	6,32	53,40	4,84	17,48
SH2	0,66	1,42	115,15	0,74	12,12
SH3	0,72	1,58	119,44	0,65	-9,72
SH4	0,66	1,40	112,12	0,53	-19,70
SH5	23,08	26,50	14,82	24,14	4,59
SH6	22,58	24,58	8,86	22,00	-2,57
SH7	22,83	23,87	4,56	23,41	2,54
SH8	3,13	2,40	-23,32	3,54	13,10
SH9	3,13	2,54	-18,85	3,69	17,89
SH10	1,62	2,41	48,77	1,52	-6,17
SA11 (bovino)	2,31	6,52	182,25	2,41	4,33
SA12 (bovino)	1,85	4,21	127,57	1,92	3,78
SA13 (bovino)	1,74	2,36	35,63	1,63	-6,32
SA14 (felino)	1,39	2,78	100,00	1,30	-6,47
SA15 (felino)	0,69	1,41	104,35	0,77	11,59
SA16 (felino)	8,22	9,56	16,30	9,00	9,49
SA17 (canino)	9,03	9,40	4,10	9,50	5,20
SA18 (canino)	5,62	5,32	-5,34	4,98	-11,39
SA19 (canino)	10,12	12,20	20,55	11,10	9,68
SA20 (canino)	6,32	4,57	-27,69	6,60	4,43

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 7 e 8 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Randox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

Tabela 17 – Desempenho Formulação 9 e 10 contra concorrente G.

	Concorrente G ($\mu\text{mol/L}$)	Formulação 9 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)	Formulação 10 ($\mu\text{mol/L}$)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	852,63	-	1204,20	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	17,00	-	18,20	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	35,78	-	35,56	-
SH1	4,12	7,25	75,97	2,53	-38,59
SH2	0,66	1,02	54,55	1,56	136,36
SH3	0,72	1,03	43,06	1,84	155,56
SH4	0,66	0,85	28,79	1,00	51,52
SH5	23,08	22,56	-2,25	20,26	-12,22
SH6	22,58	24,78	9,74	20,85	-7,66
SH7	22,83	22,80	-0,13	19,45	-14,81
SH8	3,13	4,25	35,78	2,56	-18,21
SH9	3,13	3,84	22,68	2,84	-9,27
SH10	1,62	1,85	14,20	1,52	-6,17
SA11 (bovino)	2,31	2,50	8,23	3,64	57,58
SA12 (bovino)	1,85	2,06	11,35	1,84	-0,54
SA13 (bovino)	1,74	1,87	7,47	1,89	8,62
SA14 (felino)	1,39	5,00	259,71	1,75	25,90
SA15 (felino)	0,69	6,72	873,91	0,59	-14,49
SA16 (felino)	8,22	1,25	-84,79	8,52	3,65
SA17 (canino)	9,03	6,32	-30,01	10,12	12,07
SA18 (canino)	5,62	5,20	-7,47	7,85	39,68
SA19 (canino)	10,12	8,78	-13,24	11,52	13,83
SA20 (canino)	6,32	5,23	-17,25	4,52	-28,48

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 9 e 10 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Randox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

Tabela 18 – Desempenho Formulação 11 e 12 contra concorrente G.

	Concorrente G (umol/L)	Formulação 11 (umol/L)	Erro (%)	Formulação 12 (umol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	2564,1	-	3236,25	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	16,52	-	14,52	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	38,36	-	38,62	-
SH1	4,12	2,36	-42,72	2,38	-42,23
SH2	0,66	1,04	57,58	1,56	136,36
SH3	0,72	0,82	13,89	0,87	20,83
SH4	0,66	0,65	-1,52	0,65	-1,52
SH5	23,08	22,30	-3,38	23,60	2,25
SH6	22,58	25,63	13,51	30,10	33,30
SH7	22,83	25,87	13,32	25,64	12,31
SH8	3,13	3,15	0,64	3,33	6,39
SH9	3,13	3,69	17,89	4,56	45,69
SH10	1,62	2,05	26,54	2,65	63,58
SA11 (bovino)	2,31	2,45	6,06	2,45	6,06
SA12 (bovino)	1,85	5,20	181,08	2,04	10,27
SA13 (bovino)	1,74	2,56	47,13	2,78	59,77
SA14 (felino)	1,39	2,45	76,26	2,47	77,70
SA15 (felino)	0,69	1,02	47,83	3,56	415,94
SA16 (felino)	8,22	8,36	1,70	9,00	9,49
SA17 (canino)	9,03	9,87	9,30	9,98	10,52
SA18 (canino)	5,62	8,50	51,25	6,66	18,51
SA19 (canino)	10,12	15,65	54,64	10,10	-0,20
SA20 (canino)	6,32	6,32	0,00	7,52	18,99

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 11 e 12 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Randox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

Tabela 19 – Desempenho Formulação 13 e 14 contra concorrente G.

	Concorrente G (umol/L)	Formulação 13 (umol/L)	Erro (%)	Formulação 14 (umol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	1345,65	-	1452,23	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	17,17	-	18,51	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	34,52	-	32,42	-
SH1	4,12	2,25	-45,39	2,13	-48,30
SH2	0,66	0,00	-100,00	0,80	21,21
SH3	0,72	0,98	36,11	0,99	37,50
SH4	0,66	0,41	-37,88	0,23	-65,15
SH5	23,08	28,65	24,13	23,40	1,39
SH6	22,58	29,99	32,82	22,97	1,73
SH7	22,83	23,22	1,71	22,56	-1,18
SH8	3,13	1,02	-67,41	4,10	30,99
SH9	3,13	0,98	-68,69	4,00	27,80
SH10	1,62	1,65	1,85	1,74	7,41
SA11 (bovino)	2,31	3,67	58,87	2,36	2,16
SA12 (bovino)	1,85	4,10	121,62	1,90	2,70
SA13 (bovino)	1,74	1,78	2,30	1,80	3,45
SA14 (felino)	1,39	1,20	-13,67	0,7	-49,64
SA15 (felino)	0,69	0,88	27,54	0,98	42,03
SA16 (felino)	8,22	9,02	9,73	8,45	2,80
SA17 (canino)	9,03	11,14	23,37	9,54	5,65
SA18 (canino)	5,62	6,87	22,24	5,12	-8,90
SA19 (canino)	10,12	10,14	0,20	10,12	0,00
SA20 (canino)	6,32	7,42	17,41	6,66	5,38

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 13 e 14 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Randox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

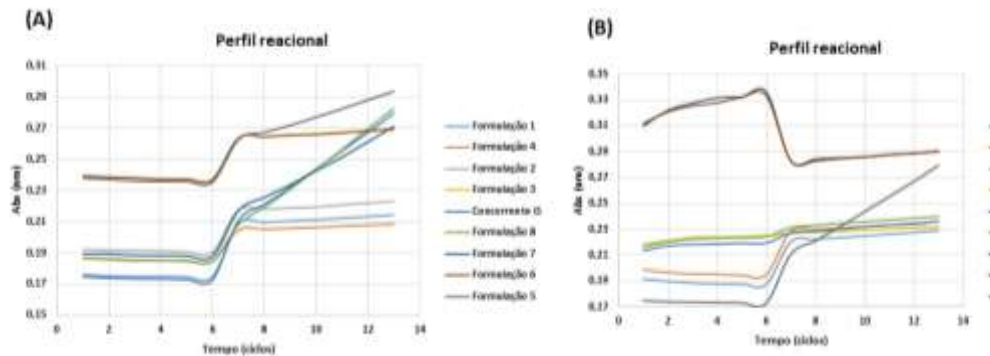
Tabela 20 – Desempenho Formulação 15 e 16 contra concorrente G.

	Concorrente G (umol/L)	Formulação 15 (umol/L)	Erro (%)	Formulação 16 (umol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	629,723	412,52	-	365,65	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	22,80	28,20	-	27,30	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	46,20	63,45	-	61,25	-
SH1	4,12	5,87	42,48	7,84	90,29
SH2	0,66	3,20	384,85	1,25	89,39
SH3	0,72	2,56	255,56	1,36	88,89
SH4	0,66	2,00	203,03	1,54	133,33
SH5	23,08	36,25	57,06	24,06	4,25
SH6	22,58	35,84	58,72	28,20	24,89
SH7	22,83	37,84	65,75	26,98	18,18
SH8	3,13	4,56	45,69	4,51	44,09
SH9	3,13	4,36	39,30	4,61	47,28
SH10	1,62	2,63	62,35	2,36	45,68
SA11 (bovino)	2,31	4,21	82,25	2,64	14,29
SA12 (bovino)	1,85	2,84	53,51	2,12	14,59
SA13 (bovino)	1,74	2,75	58,05	1,84	5,75
SA14 (felino)	1,39	2,96	112,95	1,58	13,67
SA15 (felino)	0,69	1,02	47,83	1,03	49,28
SA16 (felino)	8,22	9,26	12,65	9,41	14,48
SA17 (canino)	9,03	10,45	15,73	9,00	-0,33
SA18 (canino)	5,62	6,54	16,37	6,47	15,12
SA19 (canino)	10,12	12,12	19,76	11,10	9,68
SA20 (canino)	6,32	6,51	3,01	6,62	4,75

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal dosadas com a formulação 15 e 16 de TBA contra a dosagem do concorrente G, assim como os erros da formulação em relação ao concorrente. Está representado os controles Randox 2 e 3 usados para validar a corrida analítica.

Além disso, para cada formulação foi considerado o perfil reacional em relação ao concorrente G (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Perfil reacional da Formulação 1 a 16 X concorrente G.



(A) Perfil reacional das formulações de 1 a 8 e (B) Perfil reacional das formulações de 9 a 16 contra concorrente G. No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

Os resultados plotados nas tabelas e as curvas representadas nos gráficos demonstram que a formulação 8 foi a mais promissora, apresentando apenas sete soros com erros acima do erro total do analito de $\pm 10\%$ (Tabela 16). Além disso, é possível observar o perfil de reação, demonstrando absorbâncias próximas ao do concorrente G (Gráfico 2). Dessa forma, foi mantido para a formulação de TBA, a concentração de 150% de ThioNAD e 50% NADH.

6.2.1.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA 3HSD

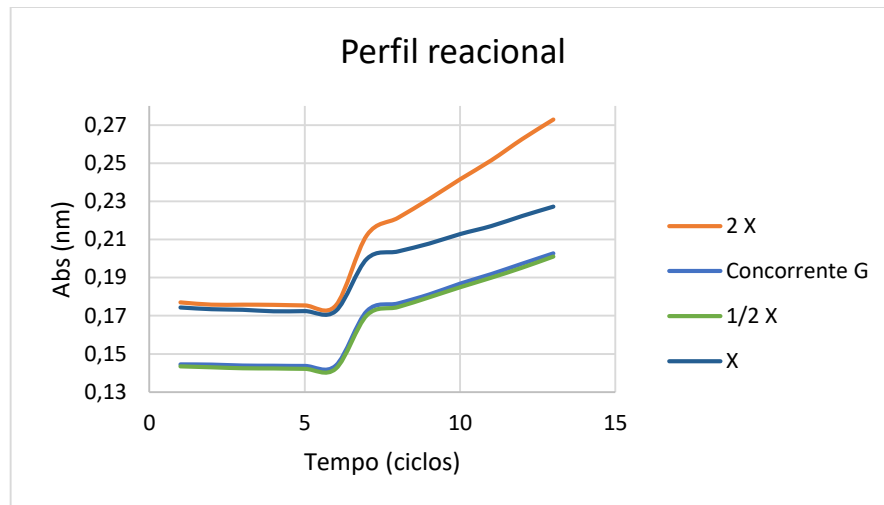
A enzima 3HSD é responsável por catalisar a reação reversível de oxirredução de 3alfa-hidroxiesteróides (ZHANG,2004). Para assegurar o melhor desempenho e detecção correta do analito, foram testadas três diferentes concentrações da enzima 3HSD, sendo: (1) X/2, (2) X e (3) 2X. Os resultados dos soros humanos e animais se encontram plotados na Tabela 21, juntamente com os erros para análise da correlação. Além da determinação de controles de nível baixo e alto para validação da corrida analítica. O perfil reacional também foi avaliado (Gráfico 3).

Tabela 21 – Desempenho concentrações de 3HSD contra concorrente G.

	Concorrente G (umol/L)	X/2 (umol/L)	Erro (%)	X (umol/L)	Erro (%)	2X (umol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	629,723	929,56	-	2688,1	-	8771,941	-
Radox 2 (17,2 - 25,8)	23,41	18,18	-	17,02	-	17,17	-
Radox 3 (38,3 - 57,5)	45,85	46,45	-	39,20	-	38,38	-
SH1	5,38	5,33	-0,93	4,57	-15,06	10,67	98,33
SH2	5,45	5,5	0,92	4,67	-14,31	10	83,49
SH3	5,2	5,29	1,73	4,85	-6,73	11,33	117,88
SH4	3,05	3	-1,64	3,16	3,61	7,33	140,33
SH5	3,18	3,2	0,63	2,97	-6,60	7,33	130,50
SH6	4,12	4,25	3,16	3,72	-9,71	10,67	158,98
SH7	3,24	3,4	4,94	3,44	6,17	6	85,19
SH8	3,62	3,78	4,42	3,35	-7,46	7,33	102,49
SH9	3,12	3,6	15,38	3,16	1,28	7,33	134,94
SH10 (bovino)	3,94	4,01	1,78	3,63	-7,87	8,67	120,05
SA11 (bovino)	5,32	5,42	1,88	4,85	-8,83	10	87,97
SA12 (bovino)	5,26	5,2	-1,14	5,04	-4,18	10	90,11
SA13 (felino)	5,2	5,4	3,85	4,85	-6,73	10	92,31
SA14 (felino)	2,42	2,45	1,24	2,4	-0,83	5,33	120,25
SA15 (felino)	2,05	3,72	81,46	4,12	100,98	9,21	349,27
SA16 (canino)	1,97	4,3	118,27	4,92	149,75	7,46	278,68
SA17 (canino)	1,9	3,49	83,68	3,59	88,95	8,33	338,42
SA18 (canino)	3,95	4,03	2,03	7,05	78,48	2,19	-44,56
SA19 (canino)	3,87	5,91	52,71	5,98	54,52	7,46	92,76
SA20 (canino)	4,11	5,65	37,47	5,98	45,50	4,82	17,27

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Formulações com três diferentes concentrações da enzima 3HSD e sua performance contra o concorrente G.

Gráfico 3 – Perfil reacional das formulações X/2, X e 2X contra concorrente G



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

Os resultados de cada concentração de enzima testada, demonstram que o ideal para realização do ensaio é a concentração 1/2 X de 3HSD, de modo a apresentar menores erros em cada determinação das amostras em relação ao concorrente G. É possível observar que a concentração 2X demonstrou erros analíticos muito altos nas determinações (Tabela 21). Ao analisar o gráfico, é possível inferir que as absorbâncias do concorrente G e da formulação com 1/2 X da 3HSD estão sobrepostas, o que corrobora com os resultados plotados na tabela (Gráfico 3).

6.2.1.3 DETERMINAÇÃO DO TAMPÃO SOLUÇÃO 1 E SOLUÇÃO 2

A maior parte dos processos químicos e biológicos são dependentes de pH, pelo fato de que ligeiras mudanças no mesmo podem alterar conformações das moléculas impedindo ou aumentando reações (MOHAN,2003). Logo, para que as formulações sejam capazes de realizar as reações é necessário o uso de tampões, que por definição asseguram o pH no microambiente de atuação da enzima. Na literatura, os ensaios de determinação de TBA ocorrem com solução 1 em pH 4,0 e solução 2 em pH 9,0. Dessa forma, foram testados quatro tampões de pH 4,0 para a solução 1, sendo: (1) Tampão A, (2) Tampão B, (3) Tampão C e (4) Tampão D que se encontram plotados na Tabela 22 e quatro tampões de pH 9,0 para a solução 2, sendo (5) Tampão E, (6) Tampão F, (7) Tampão G e (8) Tampão H plotados na Tabela 23.

Tabela 22 – Desempenho dos tampões testados para a Solução 1

	Concorrente G (umol/L)	Tampão A (umol/L)	Erro (%)	Tampão B (umol/L)	Erro (%)	Tampão C (umol/L)	Erro (%)	Tampão D (umol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	789,88	2673,79	-	4166,69	-	1985,63	-	1547,98	-
Radox 2 (17,2 - 25,8)	18,36	16,25	-	17,20	-	18,25	-	19,21	-
Radox 3 (38,3 - 57,5)	50,00	38,20	-	38,75	-	38,30	-	39,45	-
SH1	1,26	1,6	26,98	3,2	153,97	2	58,73	1,5	19,05
SH2	1,29	1,65	27,91	3,2	148,06	2	55,04	1,52	17,83
SH3	1,36	3,62	166,18	3,65	168,38	2	47,06	1,2	- 11,76
SH4	1,74	3	72,41	3,98	128,74	2,1	20,69	1,45	- 16,67
SH5	1,68	2,56	52,38	2	19,05	2,1	25,00	1,52	-9,52
SH6	1,70	2,54	49,41	3	76,47	2,62	54,12	2,01	18,24
SH7	0,55	0,85	54,55	0,89	61,82	1,25	127,27	0,7	27,27
SH8	0,63	0,68	7,94	0,87	38,10	0,85	34,92	0,7	11,11
SH9	0,40	0,72	80,00	0,84	110,00	0,64	60,00	0,5	25,00
SH10 (bovino)	0,79	0,91	15,19	0,89	12,66	0,65	-17,72	0,72	-8,86
SA11 (bovino)	0,95	1,45	52,63	0,52	-45,26	0,65	-31,58	0,82	- 13,68
SA12 (bovino)	1,90	2,01	5,79	0,63	-66,84	0,23	-87,89	1,97	3,68
SA13 (felino)	0,32	0,45	40,63	0,74	131,25	0,74	131,25	0,45	40,63
SA14 (felino)	1,50	5	233,33	4,01	167,33	4,01	167,33	2,32	54,67
SA15 (felino)	1,54	1,96	27,27	1,05	-31,82	2,03	31,82	1,54	0,00
SA16 (canino)	2,56	2,98	16,41	2,66	3,91	2	-21,88	2,3	- 10,16
SA17 (canino)	4,25	4,45	4,71	5,23	23,06	5,24	23,29	4,68	10,12
SA18 (canino)	7,56	7,8	3,17	6,54	-13,49	8,56	13,23	8,2	8,47
SA19 (canino)	8,36	9,21	10,17	4,58	-45,22	4,12	-50,72	8,6	2,87
SA20 (canino)	1,20	2,63	119,17	4,5	275,00	2,3	91,67	1,02	- 15,00

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Quatro tampões foram testados na solução 1 contra performance do concorrente G.

Tabela 23 – Desempenho dos tampões testados para a Solução 2

	Concorrente G (umol/L)	Tampão E (umol/L)	Erro (%)	Tampão F (umol/L)	Erro (%)	Tampão G (umol/L)	Erro (%)	Tampão H (umol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	828,50	924,21	-	4273,50	-	1030,75	-	1834,20	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	22,53	21,45	-	17,50	-	15,26	-	22,22	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	43,78	41,23	-	32,50	-	30,20	-	36,25	-
SH1	30,99	32,61	5,23	44,23	42,72	40,12	29,46	71,45	130,56
SH2	55,43	48,24	-12,97	26,28	-52,59	78	40,72	12,52	-77,41
SH3	29,66	28,52	-3,84	145,51	390,59	98,01	230,45	13,3	-55,16
SH4	29,49	30,12	2,14	144,66	390,54	45,65	54,80	9,49	-67,82
SH5	3,31	3	-9,37	93,8	2733,84	9,87	198,19	0,21	-93,66
SH6	2,23	2,26	1,35	92,95	4068,16	6,52	192,38	5,65	153,36
SH7	4,47	4,54	1,57	-43,8	-1079,87	1,02	-77,18	4,87	8,95
SH8	4,39	4,58	4,33	-21,15	-581,78	0,23	-94,76	3,65	-16,86
SH9	6,38	6,47	1,41	-36,11	-665,99	23,65	270,69	9,87	54,70
SH10 (bovino)	6,55	6,38	-2,60	-41,24	-729,62	5	-23,66	9,65	47,33
SA11 (bovino)	0,32	0,44	37,50	-34,83	-10984,38	0,41	28,13	0,1	-68,75
SA12 (bovino)	0,78	0,9	15,38	-32,69	-4291,03	2,56	228,21	2,5	220,51
SA13 (felino)	0,90	0,97	7,78	0,56	-37,78	0,41	-54,44	1,5	66,67
SA14 (felino)	1,05	1,36	29,52	2,56	143,81	1,68	60,00	1,3	23,81
SA15 (felino)	1,56	1,59	1,92	2	28,21	5,65	262,18	1,45	-7,05
SA16 (canino)	2,88	3	4,17	1,84	-36,11	4,78	65,97	6,35	120,49
SA17 (canino)	2,14	2,98	39,25	2,65	23,83	0,1	-95,33	4,87	127,57
SA18 (canino)	3,56	3,78	6,18	4,56	28,09	5,25	47,47	2,65	-25,56
SA19 (canino)	4,84	4,98	2,89	8,54	76,45	32	561,16	2,35	-51,45
SA20 (canino)	5,87	5,87	0,00	6,87	17,04	5,98	1,87	3,65	-37,82

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Quatro Tampões foram testados na solução 2 contra performance do concorrente G.

Além dos dados dos soros humanos e animais, os resultados de controle também foram plotados.

Através dos resultados demonstrados foi possível determinar o tampão D para a Solução 1 e o tampão E para a Solução2, uma vez que apresentaram menores quantidades de amostras com erro total maior que o erro total do analito. Mesmo nas amostras cujos erros são maiores que o erro do analito, são menores que os erros apresentados pelos outros tampões nas amostras de soro humano ou animal.

6.2.1.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA FORMULAÇÃO EM ENSAIO MONOCROMÁTICO E BICROMÁTICO

Muitos ensaios de determinação de TBA na literatura são realizados de forma bicromática, sendo os comprimentos de onda 410 e 660 nm. Dessa forma, para definição da programação da formulação em desenvolvimento foram analisadas a formulação submetida a programação monocromática (410 nm) e bicromática (410 e 660 nm), conforme resultados na Tabela 24. Em leituras bicromáticas, a absorbância utilizada para cálculo é o resultado da diferença entre as medidas realizadas no comprimento de onda primário e no comprimento de onda secundário, sendo então utilizada para minimizar um erro sistemático constante no teste, como a interferência fotométrica causada pela turbidez da lipemia ou outros componentes do soro animal ou humano (BASQUES, 2010).

De modo geral, não houve tanta diferença na determinação dos valores dos soros para o analito mesmo que tenha demonstrado menores erros, contudo em termos de variação das replicatas e para garantir robustez quanto aos principais interferentes endógenos, foi optado por utilizar a programação de forma bicromática nos ensaios de determinação de TBA.

Tabela 24 – Desempenho formulações monocromática e bicromática

	Concorrente G (umol/L)	Monocromático (umol/L)	Erro (%)	Bicromático (umol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	666,22	1243,52	-	1240,52	-
Randox 2 (17,2 - 25,8)	19,25	18,45	-	18,00	-
Randox 3 (38,3 - 57,5)	40,54	39,39	-	39,12	-
SH1	1,9	2,03	6,84	2,00	5,26
SH2	2,3	2,60	13,04	2,46	6,96
SH3	6,1	6,30	3,28	6,20	1,64
SH4	5,76	5,50	-4,51	5,45	-5,38
SH5	40,20	40,07	-0,32	40,00	-0,50
SH6	17,15	18,10	5,54	18,00	4,96
SH7	18,20	19,65	7,97	19,00	4,40
SH8	2,23	2,50	12,11	2,45	9,87
SH9	3,54	3,65	3,11	3,50	-1,13
SH10 (bovino)	8,07	9,00	11,52	8,50	5,33
SA11 (bovino)	7,80	8,00	2,56	7,90	1,28
SA12 (bovino)	5,64	5,80	2,84	5,70	1,06
SA13 (felino)	5,62	5,80	3,20	5,70	1,42
SA14 (felino)	4,52	4,68	3,54	4,65	2,88
SA15 (felino)	1,20	1,32	10,00	1,30	8,33
SA16 (canino)	0,80	1,00	25,00	0,86	7,50
SA17 (canino)	0,87	1,02	17,24	1,03	18,39
SA18 (canino)	0,96	1,20	25,00	1,20	25,00
SA19 (canino)	0,45	0,30	-33,33	0,40	-11,11
SA20 (canino)	0,78	0,85	8,97	0,80	2,56

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Dez amostras de soro humano e dez amostras de soro animal foram dosadas na formulação de TBA em programação monocromática e bicromática e seu desempenho comparado com a dosagem do concorrente G.

6.2.1.5 ENSAIO DO DOBRO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO

O estudo do dobro da concentração dos compostos de uma formulação é utilizado para que seja possível conhecer a formulação e os efeitos da alteração da concentração de cada um frente a formulação inteira. Foi realizado o estudo para os componentes da Solução 1 e da Solução 2. Para a Solução 1 composto por 4 componentes rendeu 4 diferentes formulações, representados na Tabela 25, enquanto que para o Solução 2 composto também por 4 componentes rendeu 4 diferentes formulações, representadas na Tabela 26. Totalizando 8 diferentes formulações para teste. Os resultados dos soros de matriz humana e animal de cada formulação de Solução 1 e Solução 2 contra o concorrente se encontram plotados nas Tabela 27 e 28, respectivamente. E o perfil reacional foi apresentado no Gráfico 4.

Tabela 25 – Dobro da concentração de cada componente da Solução 1 de TBA

Reagente A	2xTampão, ThioNAD, estabilizante 1, estabilizante 2
Reagente B	Tampão, 2xThioNAD, estabilizante 1, estabilizante 2
Reagente C	Tampão, ThioNAD, 2xestabilizante 1, estabilizante 2
Reagente D	Tampão, ThioNAD, estabilizante 1, 2xestabilizante 2

Tabela 26 – Dobro da concentração de cada componente da Solução 2 de TBA

Reagente E	2xNADH, 3HSD, estabilizante, Tampão
Reagente F	NADH, 2x3HSD, estabilizante, Tampão
Reagente G	NADH, 3HSD, 2xestabilizante, Tampão
Reagente H	NADH, 3HSD, estabilizante, 2xTampão

Tabela 27 – Desempenho do dobro da concentração de cada componente da Solução 1 de TBA

	Concorrente G (umol/L)	Reagente A (umol/L)	Erro (%)	Reagente B (umol/L)	Erro (%)	Reagente C (umol/L)	Erro (%)	Reagente D (umol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	775,14	919,20	-	663,98	-	1235,65	-	728,98	-
Radox 2 (17,2 - 25,8)	22,55	21,56	-	26,58	-	17,52	-	17,17	-
Radox 3 (38,3 - 57,5)	45,74	44,52	-	58,47	-	38,56	-	37,98	-
SH1	5,61	5,75	2,50	6	6,95	5,7	1,60	5,87	4,63
SH2	6,3	6,45	2,38	7	11,11	6,9	9,52	5,57	-11,59
SH3	7,48	7,3	- 2,41	8,52	13,90	8,5	13,64	5,87	-21,52
SH4	5,69	5,25	- 7,73	6,69	17,57	7,85	37,96	5,87	3,16
SH5	3,08	3,12	1,30	2,05	-33,44	3,85	25,00	2,05	-33,44
SH6	3,16	3,26	3,16	4,12	30,38	5,36	69,62	3,81	20,57
SH7	3,48	3,57	2,59	2,47	-29,02	1,2	-65,52	4,99	43,39
SH8	3	2,98	- 0,67	3,9	30,00	1,25	-58,33	3,52	17,33
SH9	1,58	1,47	- 6,96	1,57	-0,63	1,57	-0,63	4,11	160,13
SH10 (bovino)	1,1	1,12	1,82	2,26	105,45	3,6	227,27	2,64	140,00
SA11 (bovino)	1,2	1,3	8,33	1,6	33,33	5,6	366,67	2,35	95,83
SA12 (bovino)	0,35	0,32	- 8,57	0,25	-28,57	1,54	340,00	3,52	905,71
SA13 (felino)	0,79	0,78	- 1,27	0,52	-34,18	1,25	58,23	1,47	86,08
SA14 (felino)	0,95	1	5,26	0,45	-52,63	0,62	-34,74	1,45	52,63
SA15 (felino)	0,87	0,81	- 6,90	0,61	-29,89	0,34	-60,92	0,88	1,15
SA16 (canino)	1,47	1,49	1,36	1,55	5,44	1,84	25,17	3,23	119,73
SA17 (canino)	2,29	2,4	4,80	2,65	15,72	3,25	41,92	3,25	41,92
SA18 (canino)	2,05	2,2	7,32	2,36	15,12	2,36	15,12	2,05	0,00
SA19 (canino)	2,78	2,6	- 6,47	3	7,91	2,5	-10,07	2,05	-26,26
SA20 (canino)	17,2	17	- 1,16	18,52	7,67	16,45	-4,36	17,45	1,45

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Cada formulação representa uma alteração na concentração de um componente, dobrando a mesma. Os soros foram plotados e os resultados para o dobro da concentração dos componentes da solução 1 se encontram nas colunas acima.

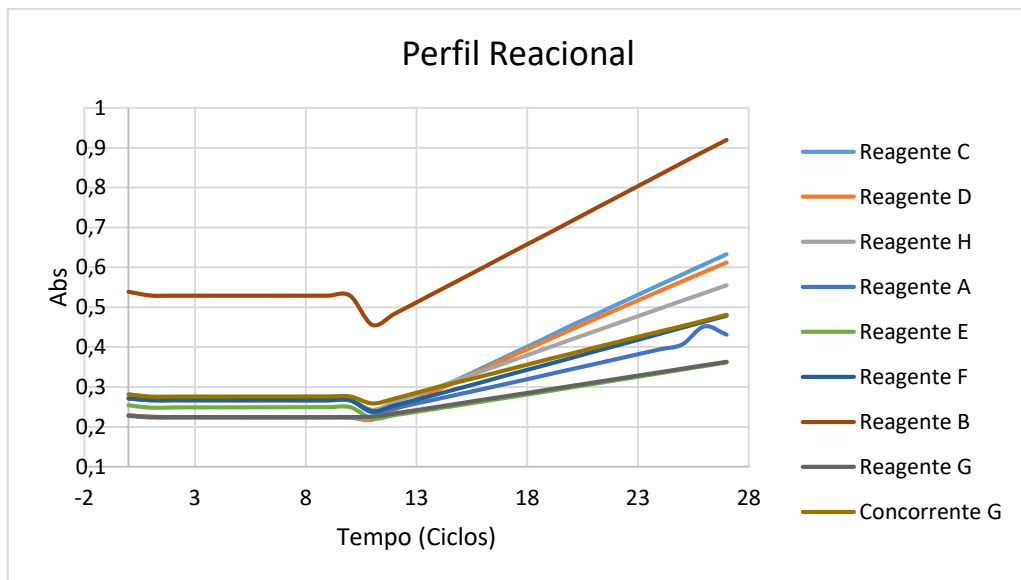
Tabela 28 – Desempenho do dobro da concentração de cada componente da Solução 2 de TBA

	Concorrente G (umol/L)	Reagente E (umol/L)	Erro (%)	Reagente F (umol/L)	Erro (%)	Reagente G (umol/L)	Erro (%)	Reagente H (umol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	775,14	1364,75	-	1114,89	-	815,45	-	874,56	-
Randex 2 (17,2 - 25,8)	22,55	25,98	-	16,98	-	20,21	-	21,41	-
Randex 3 (38,3 - 57,5)	45,74	57,57	-	37,85	-	42,16	-	43,25	-
SH1	5,61	7	24,78	4,12	-26,56	5,41	-3,57	5,5	-1,96
SH2	6,3	4,12	-34,60	4,87	-22,70	6,02	-4,44	6,33	0,48
SH3	7,48	6,68	-10,70	5,21	-30,35	7	-6,42	7,98	6,68
SH4	5,69	5,88	3,34	5,55	-2,46	5,6	-1,58	5,4	-5,10
SH5	3,08	1,14	-62,99	3,09	0,32	3,12	1,30	3	-2,60
SH6	3,16	1,58	-50,00	3,25	2,85	3,1	-1,90	3,25	2,85
SH7	3,48	5,66	62,64	2,4	-31,03	3,5	0,57	3,56	2,30
SH8	3	3,3	10,00	6	100,00	3,54	18,00	2,95	-1,67
SH9	1,58	4,74	200,00	5,02	217,72	1,33	- 15,82	1,62	2,53
SH10 (bovino)	1,1	2,68	143,64	0,2	-81,82	1,2	9,09	1,11	0,91
SA11 (bovino)	1,2	2,54	111,67	0,14	-88,33	1,21	0,83	1,25	4,17
SA12 (bovino)	0,35	0,3	-14,29	0	100,00	0,32	-8,57	0,4	14,29
SA13 (felino)	0,79	0,89	12,66	2,25	184,81	0,87	10,13	0,9	13,92
SA14 (felino)	0,95	0,99	4,21	0,98	3,16	1	5,26	0,82	- 13,68
SA15 (felino)	0,87	0,91	4,60	0,6	-31,03	0,98	12,64	0,97	11,49
SA16 (canino)	1,47	1,87	27,21	0,14	-90,48	1,5	2,04	1,65	12,24
SA17 (canino)	2,29	3	31,00	2,25	-1,75	2,36	3,06	2,29	0,00
SA18 (canino)	2,05	2,84	38,54	0,25	-87,80	2,32	13,17	2,65	29,27
SA19 (canino)	2,78	2,51	-9,71	2,87	3,24	2,85	2,52	2,7	-2,88
SA20 (canino)	17,2	20,25	17,73	12,23	-28,90	18	4,65	17	-1,16

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$. Cada formulação representa uma alteração na concentração de um componente, dobrando a mesma. Os soros foram plotados e os resultados para o dobro da concentração dos componentes da solução 2 se encontram nas colunas acima.

O teste da solução 1 sugeriu que o dobro de tampão no reagente é essencial para melhorar o desempenho da formulação, de modo a não apresentar erros maiores que o erro total do analito de $\pm 10\%$ para as amostras. Já o teste da solução 2 sugeriu que melhores resultados são obtidos quando são utilizados dobro de tampão e dobro de estabilizante na formulação. Esses dados podem ser conferidos pelos dados apresentados nas Tabelas 27 e 28. Além disso, ao observar o perfil reacional plotado no Gráfico 4 é possível obter as mesmas considerações em termo de absorvância.

Gráfico 4 – Perfil reacional do dobro da concentração dos componentes da solução 1 e 2 do TBA



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação

6.3 VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE TBA

Após as modificações necessárias descritas anteriormente, definiu-se a formulação, descrita na Tabela 29, para prosseguimento nos testes necessários para atendimentos dos critérios de regulamentação da ANVISA e MAPA para atendimento do mercado de laboratórios de análises clínicas humana e animal.

Tabela 29 – Formulação modificada de TBA

Reagente 1 (SOLUÇÃO 1)	Reagente 2 (SOLUÇÃO 2)
2xTampão D pH 4,0 (2 – 8 mM)	2xTampão E pH 9,0 (> 200 mM)
100% Thio-NAD (> 10 g/L)	50% NADH (<10 g/L)
Estabilizante 1 (0,05%)	1/2 Enzima 3HSD (> 15 KU)
Estabilizante 2 (0,05%)	2xEstabilizante (0,05%)

Além disso, os parâmetros de reação foram otimizados, de forma que o ensaio passou a ser realizado com dois comprimentos de onda como descrito pela Tabela 30.

Tabela 30 – Parâmetros modificados para reação de TBA

Comprimento de onda primário	410 nm
Comprimento de onda secundário	660 nm
Temperatura de reação	37°C
Tipo de reação	Ponto final
Volume de amostra	3 µL
Volume de SOLUÇÃO 1	275 µL
Volume de SOLUÇÃO 2	75 µL
Incubação de SOLUÇÃO 1 + amostra	300 segundos
Incubação de SOLUÇÃO 1 + amostra + SOLUÇÃO 2	180 segundos

6.3.1 PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA

A exatidão é definida como a capacidade do método em obter um resultado próximo ao valor real (BRITO et al., 2003). Existem diversas formas de realizar o ensaio de exatidão analítica, nesse trabalho, foi realizado a comparação dos valores obtidos com os valores dosados por um reagente de outra empresa que utiliza a mesma metodologia da formulação proposta, sendo esse reagente validado e documentado pela ANVISA.

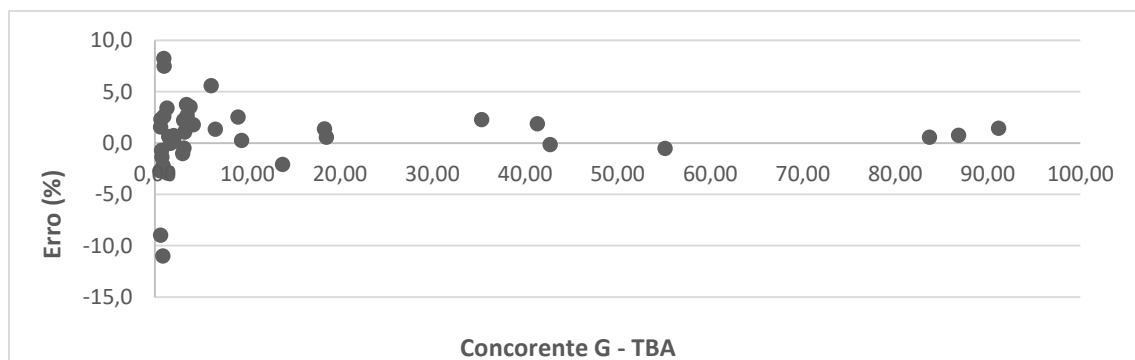
As determinações de 40 amostras de soro, sendo 20 soros humanos e 20 soros animais (dentre caninos, felinos e bovinos) resultaram em uma amostra com o erro acima do permitido para o analito, que é de $\pm 10,0\%$ (Tabela 31 e Gráfico 5).

Tabela 31 – Média das determinações de TBA no ensaio de exatidão em soro.

Soro Humano	Concorrente G (umol/L)	Biotécnica (umol/L)	Erro(%)	Soro Animal	Concorrente G (umol/L)	Biotécnica (umol/L)	Erro(%)
1	3,44	3,57	3,8	1	13,82	13,54	-2,1
2	3,22	3,25	1,1	2	3,16	3,15	-0,5
3	6,08	6,42	5,6	3	1,37	1,33	-2,9
4	6,53	6,62	1,4	4	91,17	92,51	1,5
5	3,13	3,20	2,2	5	55,15	54,88	-0,5
6	3,03	3,00	-1,0	6	41,34	42,12	1,9
7	4,14	4,22	1,8	7	42,74	42,69	-0,1
8	3,82	3,95	3,5	8	35,31	36,12	2,3
9	18,32	18,58	1,4	9	1,00	1,08	7,5
10	18,56	18,67	0,6	10	0,96	0,99	2,6
11	0,87	0,77	-11,0	11	0,73	0,73	-0,7
12	0,75	0,74	-1,3	12	1,52	1,53	0,7
13	83,71	84,19	0,6	13	2,04	2,06	0,7
14	86,85	87,53	0,8	14	3,51	3,61	2,7
15	9,38	9,41	0,3	15	1,69	1,69	0,0
16	9,01	9,24	2,6	16	2,04	2,05	0,2
17	0,62	0,56	-8,9	17	0,91	0,89	-2,2
18	0,97	1,05	8,2	18	0,56	0,55	-2,7
19	1,32	1,36	3,4	19	0,65	0,66	2,3
20	1,54	1,55	0,6	20	0,64	0,65	1,6

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$.

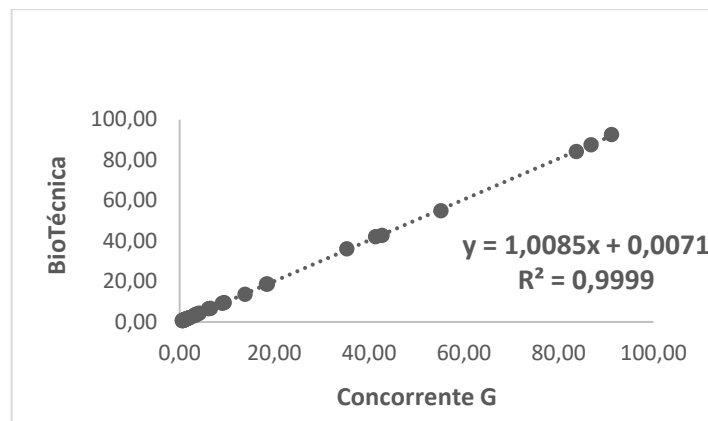
Gráfico 5 – Dispersão dos erros relacionados a quantificação de TBA



No eixo x está representado as concentrações dosadas pelo concorrente G e no eixo y o erro das dosagens.

Por meio do gráfico de regressão linear, é possível observar que as determinações apresentam uma boa correlação, evidenciado pelo R² de 0,9999 como pode ser observado no Gráfico 6. A equação $y = 1,0085x + 0,0071$, apresenta coeficiente angular acima de 0,9 e intercepto menor que o LoQ de soro, que é de 1,0 umol/L, como preconizado. Esta equação foi utilizada no teste de significância para prever a concentração de TBA nos níveis de decisão médica, no qual erro metodológico obtido para cada nível foi inferior ao erro do analito, conforme observado na Tabela 32.

Gráfico 6 – Correlação da quantificação TBA



No eixo x está representado a dosagem pelo concorrente G e no eixo y a a dosagem do reagente desenvolvido

De modo geral, a exatidão é realizada com amostras, dentro da faixa de normalidade e fora da faixa de normalidade do analito, no intuito de compreender o funcionamento do reagente frente a toda a faixa clínica relevante para o analito. Os níveis de decisão médica são valores críticos do analito de interesse que podem determinar o diagnóstico preciso de determinada condição (HUGHES, 2022). Esses níveis são determinados por profissionais médicos por meio das pesquisas clínicas e ficam disponíveis no banco de dados do Westgard. Dessa forma, é de extrema importância a análise da performance do reagente frente aos níveis determinados (WESTGARD,2004).

Tabela 32 – Concentrações de TBA obtidas pela equação gerada

Níveis de decisão médica ($\mu\text{mol/L}$)	Concentrações obtidas ($\mu\text{mol/L}$)	%DIF
0,5	0,51	2,3
10,0	10,09	0,9
20,0	20,18	0,9

6.3.2 AVALIAÇÃO DE INTERFERENTES NA FORMULAÇÃO DE TBA

O termo especificidade analítica é utilizado para definir a capacidade do método em detectar o analito de forma exata e correta mesmo na presença de outros componentes da matriz do soro, seja ele animal ou humano (BRITO et al., 2003; ICH, 2005). Entende-se por interferente qualquer substância capaz de interagir e alterar reações químicas, sendo os interferentes endógenos as substâncias encontradas nas amostras biológicas, de origem natural ou correlacionada com a saúde do paciente, como por exemplo: bilirrubina, triglicérides e ácido ascórbico (SUMITA et al., 2018). É sabido que a presença de substâncias interferentes na amostra é a causa mais comum de erros em ensaios analíticos, de modo a comprometer o resultado do teste e o paciente (KAZMIERCZAK, 2000). Por isso torna-se tão importante a análise dos reagentes frente aos interferentes mais comuns: a lipemia e hemólise, ácido ascórbico e bilirrubina (FLEMING & SWAMINATHAN, 2001) (ALMEIDA, 2014).

6.3.2.1 TESTE DE INTERFERENCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel ou termolábil e altamente utilizado como agente antioxidante, anticarcinogênico e antiviral (AZULAY, et al. 2003) (MENG, et al. 2005). Normalmente o ácido ascórbico é facilmente absorvido e atinge níveis séricos relativamente elevados, sendo considerado um interferente em potencial nas amostras de soro humano e animal (MARTINELLO, 2003). O teste de interferência de ácido ascórbico para o reagente de TBA se encontra apresentado na Tabela 33.

Tabela 33 – Determinação da interferência de ácido ascórbico

Ácido Ascórbico (mg/dL)	0	25	50	75	100
TBA (umol/L)	1,73	1,73	1,69	2,00	2,10
% Interferência	0	-0,19	-2,31	15,00	20,55

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

As análises realizadas evidenciaram que o kit em desenvolvimento possui uma robustez frente ao ácido ascórbico, sendo específico até a concentração de 50 mg/dL em soro.

6.3.2.2 TESTE DE INTERFERENCIA DE HEMOGLOBINA

A hemólise, por sua vez, é definida como liberação dos componentes intracelulares de eritrócitos e pode gerar grandes variações nos resultados dos testes pois geralmente quando há uma intensidade grande de hemoglobina na amostra, outras enzimas podem estar aumentadas também, o que pode interferir na maioria dos testes analíticos (SUMITA, 2018). A maior parte das amostras que apresentam hemólise em laboratório de análises clínicas ocorrem por manuseio incorreto do profissional da coleta do sangue ou armazenamento da amostra, mas também existe a possibilidade de ser em virtude de doença hemolítica, dessa forma a existência de amostras hemolisadas é muito comum nas rotinas laboratoriais (SUMITA, 2018). O ensaio de determinação da interferência de hemoglobina nas dosagens de TBA são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34 – Determinação da interferência de hemoglobina

Hemoglobina (mg/dL)	0	50	100	300	500
TBA (umol/L)	1,34	1,33	1,32	1,31	1,30
% Interferência	0	-0,75	-1,24	-2,24	-2,99

O teste de especificidade mostrou que o reagente é específico para detecção de TBA até a concentração mais alta de hemoglobina avaliada, que foi de 500 mg/dL.

6.3.2.3 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE TRIGLICÉRIDES

A lipemia é definida como a interferência lipídica referente a presença de partículas de quilomícrons e lipoproteínas e está geralmente associada ao grau de turbidez da amostra (ANDRADE; OLIVEIRA; SOUZA, 2016). Normalmente é mensurada nos testes clínicos utilizando emulsões comerciais de gorduras ou amostras biológicas de pacientes lipêmicos (SUN DIAGNOSTICS,2010). Nos protocolos da Biotécnica Indústria LTDA, é utilizado uma amostra de Lipovenos (Intralipid), que possui em sua composição óleo de soja, triglicerídeos de cadeia média e lectina de ovo. O perfil de interferência se dá pela dispersão da luz, prejudicando a sua transmissão pela cubeta de análise. O grau de dispersão da luz depende do número, do tamanho e do índice de refração das partículas lipídicas em suspensão (SUMITA,2018). Pode ser considerado como lipemia amostras que apresentem concentração de triglicérides a partir de 250 mg/dL (MARTÍNEZ-SUBIELA; CERÓN, 2005). Por isso, foi determinado a interferência de triglicérides na determinação de TBA, os dados se encontram na Tabela 35.

Tabela 35 – Determinação da interferência de triglicérides

Triglicérides (mg/dL)	0	250	500	1000	2000
TBA (umol/L)	1,73	1,71	1,65	1,60	1,60
% Interferência	0	-1,16	-4,43	-7,51	-7,51

É notório que o perfil de não interferência de triglicérides no ensaio de TBA foi satisfatório, de modo que em 2000 mg/dL de triglicérides, a formulação ainda foi capaz de resultar em uma concentração de TBA sem sofrer alterações significativas. O resultado obtido foi superior aos apresentados por outros fornecedores de kit de quantificação de TBA, permitindo assim uma vantagem comercial para a formulação desenvolvida.

6.3.2.4 TESTE DE INTERFERENCIA DE BILIRRUBINA

A bilirrubina é uma substância de pigmentação amarelada, produzida no organismo pela degradação da porção heme da hemoglobina e proteínas hemáticas

(MARTÍNEZ-SUBIELA; CERÓN, 2005). Quando presente em altos níveis, a bilirrubina pode interferir na medição da densidade óptica e alterar a medição do analito. Por isso, foi analisado o perfil de interferência de bilirrubina nas mensurações de TBA, como apresentado na Tabela 36.

Tabela 36 – Determinação da interferência de bilirrubina

Bilirrubina (mg/dL)	0	2,5	5	10	15
TBA (umol/L)	1,73	1,69	1,64	1,59	1,60
% Interferência	0	-2,50	-5,20	-7,90	-7,51

Os resultados demonstram que a formulação é específica para a concentração de TBA frente a maior concentração de bilirrubina testada, de 15 mg/dL.

Notoriamente, o teste de especificidade analítica comprovou que o reagente em desenvolvimento para quantificação de TBA tem a capacidade de dosar o analito de forma adequada mesmo que na presença dos principais interferentes analíticos e do método. Sua robustez tornou o kit competitivo ao mercado, tendo desempenho igual ou superior aos demais concorrentes.

6.3.3 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANALITICA DE TBA

O teste de sensibilidade é composto pela determinação do limite do branco (LoB), limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ). De modo geral, o teste é responsável por expressar a capacidade do método analítico em gerar uma variação da mensuração causada por pequeno aumento na concentração do analito presente na amostra (JUNIOR, et al, 2001). De acordo com o Comitê de métodos analíticos (Analytical Methods Committee) o limite de detecção (LoD) representa a menor concentração do analito que é possível ser distinguida na amostra, com resultados razoáveis, já o branco (LoB), é definido como uma amostra que teoricamente não há a presença do analito e o limite de detecção (LoD) como o sinal ou ruído analítico frente a concentrações mínimas do analito que é quantificado com confiabilidade nos resultados (GUIDELINE, 2005) (JUNIOR, et al, 2001). De acordo com o CLSI, o limite

de quantificação (LoQ), por sua vez, é a menor quantidade no analito que pode ser quantitativamente determinada com acurácia dentro das condições experimentais normais (CLSI, 2012).

A formulação quando submetida ao ensaio de sensibilidade analítica, resultou em um LoB de -0,05, LoD de 0,50 e LoQ de 1,0. Sendo o LoQ apresentado na Tabela 37. Os cálculos foram realizados seguindo as equações plotadas no item 5.3.3.

Tabela 37 – Determinação do LoQ da formulação modificada de TBA

Concentração da amostra (umol/L)	Erro (%)
0,20	60,00
0,50	58,47
1,00	9,05
1,50	6,50

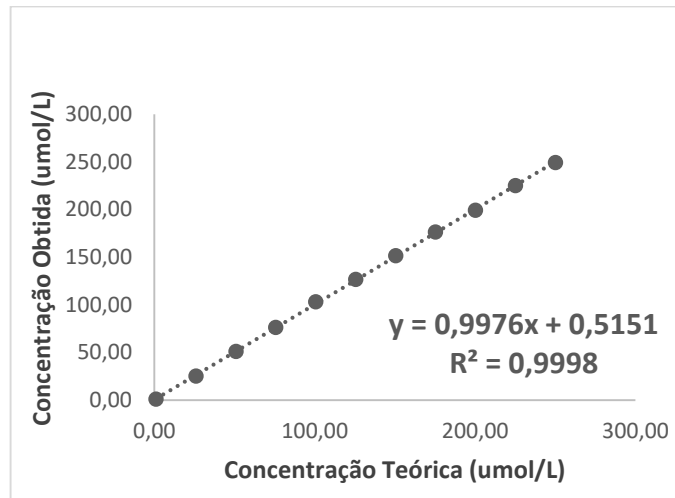
Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 10\%$.

6.3.4 DETERMINAÇÃO DO INTERVALO OPERACIONAL DA FORMULAÇÃO DE TBA

A faixa operacional do reagente é definida como o maior e o menor nível que possa ser determinado pelo método com precisão e exatidão, de forma que os resultados sejam linearmente proporcionais. Dessa forma, linearidade é definida como a capacidade de o reagente gerar resultados lineares, proporcionais a concentração do analito (BRITO, et al, 2003). A linearidade deve ser avaliada visualmente por um gráfico onde se relaciona os sinais obtidos pelo método em relação a concentração do analito para definição dos parâmetros estatísticos (GUIDELINE, 2005). A utilização de uma solução aquosa de TBA possibilitou a definição de um único intervalo operacional para o produto, que abrange tanto a quantificação de TBA no soro humano e animal.

As diluições preparadas a partir das amostras altas e baixas, de 220,0 umol/L e 1,0 umol/L de TBA respectivamente, foram dosadas pelo reagente em desenvolvimento. O Gráfico 7 representa a correção entre o valor teórico das diluições e as médias obtidas na determinação de cada ponto. Por meio da regressão linear exposta, pode-se analisar e verificar que os parâmetros da equação obtida atendem aos critérios de aceitabilidade pré-estabelecidos.

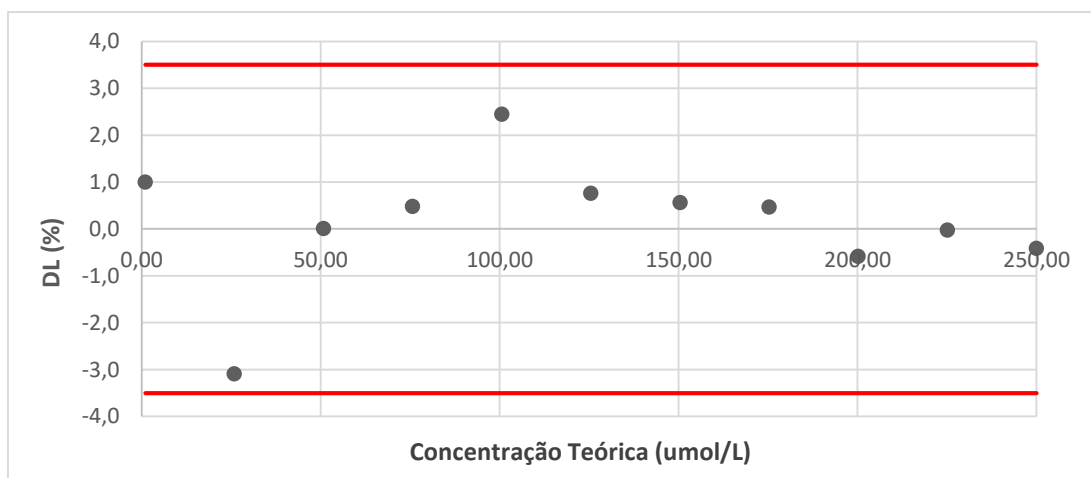
Gráfico 7 – Correlação entre as determinações teóricas e obtidas da formulação de TBA



No eixo x está representado a Concentração Teórica de TBA (umol/L) e no eixo y a Concentração Obtida (umol/L)

A dispersão de erro nas determinações de TBA, determinado pela diferença entre as médias obtidas e o valor teórico, podem ser observadas no Gráfico 8. Percebe-se que nenhuma dosagem extrapolou o desvio de linearidade estabelecido, correspondente a 35% do menor erro total do analito, e que a maioria dos erros tem seu valor próximo a zero. Portanto, temos que o intervalo operacional do Kit de TBA é de 1,0 umol/L a 250 umol/L, sendo este valor compatível e/ou superior aos kits já comercializados de mesmo método (Tabela 38).

Gráfico 8 – Dispersão de erro das determinações



Em vermelho o limite de variação permitida para o desvio de linearidade de $\pm 3,5\%$.

Tabela 38 – Comparação de desempenho da formulação TBA desenvolvida com as principais marcas concorrentes

Comparação de Desempenho							
Empresas	Metodologia	Outros Testes		Especificidade Analítica			
		Sensibilidade (µmol/L)	Linearidade (µmol/L)	Triglicérides (mg/dL)	Hemoglobina (mg/dL)	Ácido Ascórbico (mg/dL)	Bilirrubina (mg/dL)
Spinreact	5ª Geração	1,47	150	1000	250	-	85
Beckman		4	120	800	300	-	12
Dialab		1	180	750	500	50	50
Biosystems		1,6	200	2000	500	50	50
Sigma		1	150	-	-	-	-
GenWay		1,5	180	750	500	50	50
Randox		2	188	-	-	-	-
Diazys		2	220	700	400	100	8
Diazyme		1	180	-	-	-	-
BSBE		2	200	1000	500	50	-
Formulação Final TBA desenvolvida		1	250	2000	500	50	15

6.3.5 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA

De acordo com o CLIA (Clinical and Laboratory Standards Institute) a estabilidade de um reagente de diagnóstico in vitro reflete a habilidade que o mesmo possui de manter suas características de performance ao longo do tempo, garantindo os mesmos resultados para mensuração do analito. De forma geral, os testes de estabilidades visam estabelecer a duração dos produtos para que estes estejam válidos e cumprindo sua função dentro de condições definidas de armazenamento e manuseio. Dessa forma, as estabilidades testadas devem ser capazes de prever o tempo de funcionamento perante a prateleira e o produto em uso. A estabilidade dos reagentes podem ser afetadas por variáveis internas e externas como os componentes da formulação, as condições de armazenamento, manuseio entre outras (CLSI, 2009).

O reagente desenvolvido pode ser produzido em larga escala, de modo que possui estabilidade no armazenamento de 2 até a 8º C, de modo que as estabilidades em uso, tempo real, transporte e bulk serão avaliadas até a formulação completar 18 meses, uma vez que um ano de estabilidade é mais do que suficiente para os produtos de diagnóstico in vitro (WINSTEN, 1969).

Para que o reagente consiga ser enviado para registro e notificação junto à ANVISA e MAPA, é necessário a realização da estabilidade acelerada, de modo que ao submeter o reagente ao estresse térmico seja possível prever o comportamento de

estabilidade de prateleira. Caso o reagente não aguarde altas temperaturas como 37° C ou 45° C, a estabilidade acelerada pode ser realizada utilizando temperaturas mais baixas, porém, como determinado por um estudo na empresa, é necessário que o reagente permaneça estável por pelo menos 7 dias a 37° C para assegurar que permaneça estável mesmo com o transporte dos kits de diagnóstico *in vitro* ao redor do país.

6.3.5.1 ESTABILIDADE ACELERADA

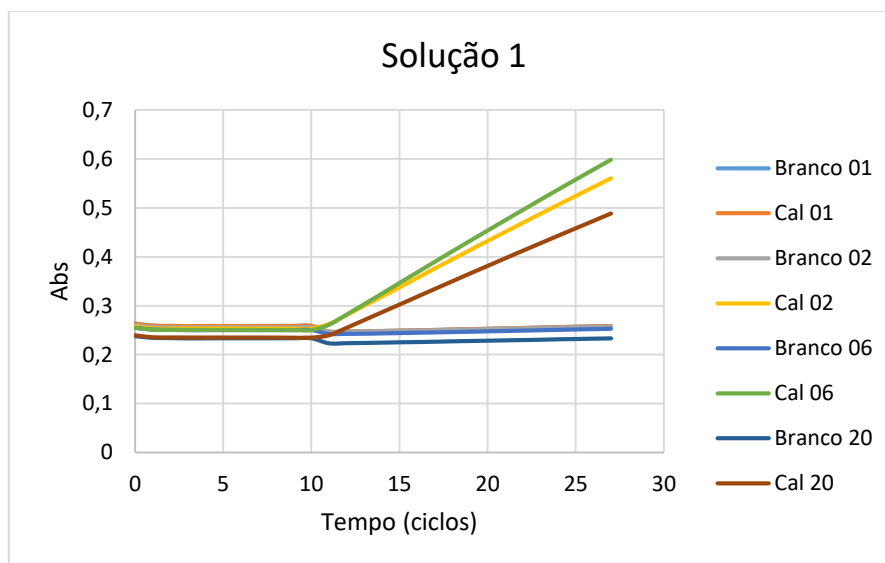
A solução 1, ao submetida em estufa a 37° C apresentou pouca queda de absorvância, continuou resultando nos mesmos valores de soro e controle mesmo após alguns dias de exposição a temperatura, como pode ser observado pelos dados apresentados na Tabela 39.

Tal resultado permite inferir que a solução 1 não representa perda de reação para a determinação de TBA, continuando estável mesmo após 20 dias em estufa 37° C. O Gráfico 9 demonstra uma pequena perda de absorvância conforme tempo de armazenamento em estufa.

Tabela 39 – Avaliação da estabilidade da formulação de TBA modificada

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 20
Fator de Calibração	581,06	588,24	531,07	535,62	608,98	639,87
Randox 3 (38,3 - 57,5)	39,56	39,54	39,10	40,20	39,87	39,56
S1	22,10	22,30	22,15	22,40	22,45	22,12
S2	1,24	1,25	1,21	1,24	1,22	1,27

Gráfico 9 – Avaliação da estabilidade 37°C da Solução 1



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

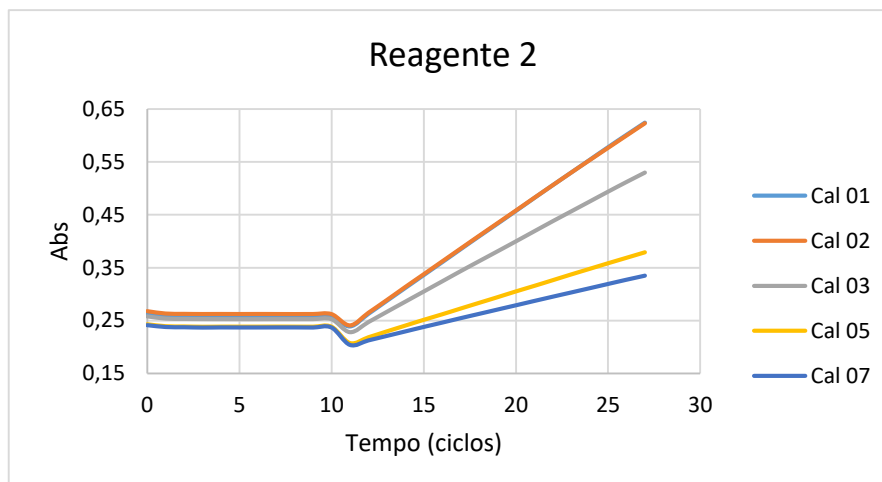
Enquanto isso, os resultados da solução 2 sob efeito de armazenamento em temperatura não foram promissores, de modo que a partir do quinto dia de estufa houve mudanças significativas na absorbância da reação. Ao final do sétimo dia foi observado um resultado para amostra e controle diferente do esperado (Tabela 40). O gráfico 10 ilustra a queda de absorbância da Solução 2 de TBA frente ao tempo de armazenamento em estufa 37°C.

Dessa forma, é possível concluir que a solução 1 da formulação não apresenta problemas de estabilidade em temperatura. Contudo, a solução 2 não possui estabilidade suficiente, demonstrando necessidade de modificações, uma vez que para o reagente continuar exercendo sua função e atendendo os parâmetros do mercado, deve ser estável por pelo menos sete dias em estufa 37°C para que seja possível realizar o transporte do kit para os diversos laboratórios de análises clínicas de saúde humana e/ou animal do país.

Tabela 40 – Avaliação da estabilidade da formulação modificada

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	445,038	454,339	550,964	1029,87	1394,70	13956,23
Randox 3 (38,3 - 57,5)	38,3	39,5	38,50	39,20	39,90	110,0
S1	21,30	21,00	21,35	21,40	22,02	50,50
S2	1,23	1,24	1,25	1,23	1,23	10,45

Gráfico 10 – Avaliação da estabilidade 37°C da Solução 2



6.3.5.2 ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

A atividade enzimática é dependente da manutenção da estrutura molecular de uma enzima pois depende dos resíduos de aminoácidos na estrutura tridimensional da proteína e interações entre os mesmos. Dessa forma, alterações no ambiente reacional podem revelar alterações nas cadeias proteicas e com isso alterar a estabilidade da solução (SILVA, 2013). Por isso foram testados alguns compostos para tentar alterar a estabilidade do Solução 2 que é a formulação que possui a enzima 3HSD.

6.3.5.2.1 AGENTES QUELANTES

É descrito em literatura que a utilização de alguns íons divalentes são inibidores da atividade da enzima 3-alfa-hidroxisteroidedehidrogenase, como por exemplo o $MnCl_2$ (SUZUKI, 1974). De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), agentes quelantes são substâncias que possuem capacidade de fixar íons metálicos formando um complexo solúvel chamado de colato (IUPAC, 1997). Segundo Engert e Turner, o reagente de determinação de TBA deve ser preparada

na presença de EDTA para assegurar estabilidade do mesmo (ENGERT; TURNER, 1973). Dessa forma, os agentes quelantes possuem a função de remover impurezas metálicas presentes na composição advindas da água ou de matérias primas que possam atrapalhar a reação e conseqüentemente a determinação correta do analito (LOMBARDO,2020). Dessa maneira, foram testadas formulações com a presença de quelantes: (1) quelante A, (2) quelante B, (3) quelante C e (4) quelante D para melhorar a estabilidade da formulação, sendo apresentadas pelas Tabelas 41,42,43 e 44 respectivamente e representadas pelos gráficos A, B, C e D do Gráfico 11.

Tabela 41 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante A

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	709,72	547,35	547,34	559,91	1245,01	12789,01
Randox 3 (38,3 - 57,5)	38,30	38,41	39,91	45,40	58,20	124,52
S1	22,41	23,10	21,90	22,04	28,45	60,23
S2	1,12	1,15	1,10	1,15	2,12	4,78

Tabela 42 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante B

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	446,03	346,26	316,52	332,58	560,23	564,17
Randox 3 (38,3 - 57,5)	38,80	39,01	40,12	40,07	39,97	41,20
S1	23,54	22,41	23,30	22,94	23,41	23,17
S2	1,40	1,39	1,41	1,42	1,41	1,40

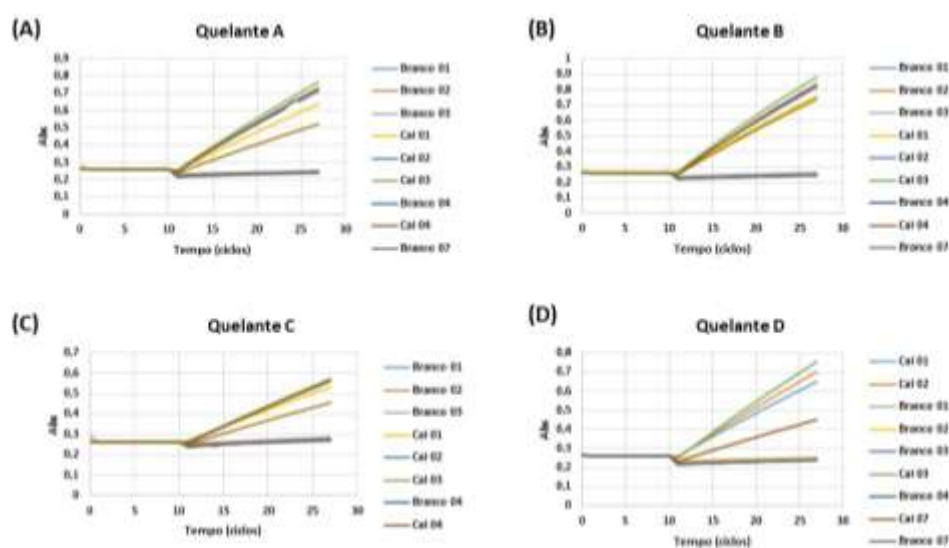
Tabela 43 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante C

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5
Fator de Calibração	342,94	290,53	253,17	652,20
Randox 3 (38,3 - 57,5)	39,52	41,42	40,25	63,50
S1	21,40	21,45	21,50	80,20
S2	1,70	1,78	1,75	5,34

Tabela 44 – Avaliação da estabilidade da formulação com quelante D

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	546,23	548,87	599,87	580,78	605,32	859,05
Randox 3 (38,3 - 57,5)	39,54	40,02	39,78	41,42	48,20	71,21
S1	28,90	28,74	29,20	29,29	39,20	50,50
S2	1,30	1,38	1,34	1,35	1,36	7,80

Gráfico 11 – Avaliação da estabilidade 37° C da formulação com adição de quelantes



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação. (A) corresponde ao desempenho do Quelante A, (B) corresponde ao desempenho do Quelante B, (C) corresponde ao desempenho do Quelante C e (D) corresponde ao desempenho do Quelante D.

A partir dos resultados demonstrados foi possível aferir que o quelante B foi promissor por apresentar menor queda de absorvância conforme o tempo de armazenamento em estufa 37°C. Os outros quelantes apresentaram quedas mais significativas sob estresse térmico. Pode-se concluir que em sete dias de armazenamento, os quelantes A, C e D resultaram em concentrações alteradas para as amostras e controles, demonstrando alterações nas absorvâncias e fatores (Tabelas 41,43,44 e Gráfico 11).

6.3.5.2.2 AGENTES REDUTORES

Os agentes redutores são difundidos pela capacidade de reduzir quantitativamente as ligações dissulfeto em proteínas e peptídeos, tendo sua função aumentada quando utilizado em combinação com agentes quelantes, de modo que seja inibido a interação dos metais com o agente redutor diminuindo sua eficiência (ZHANG, 2020). Para aumentar a estabilidade enzimática, foram testados três agentes redutores, sendo: (1) agente redutor E, (2) agente redutor F e (3) agente redutor G representados e descritos pelas Tabelas 45,46 e 47 e Gráfico 12.

Tabela 45 – Avaliação da estabilidade da formulação com agente redutor E

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	323,21	346,58	458,90	518,9	605,25	874,20
Randox 3 (38,3 - 57,5)	41,20	41,58	42,20	43,00	41,05	58,90
S1	20,30	21,20	20,85	20,67	21,22	25,62
S2	1,56	1,57	1,55	1,50	1,54	1,82

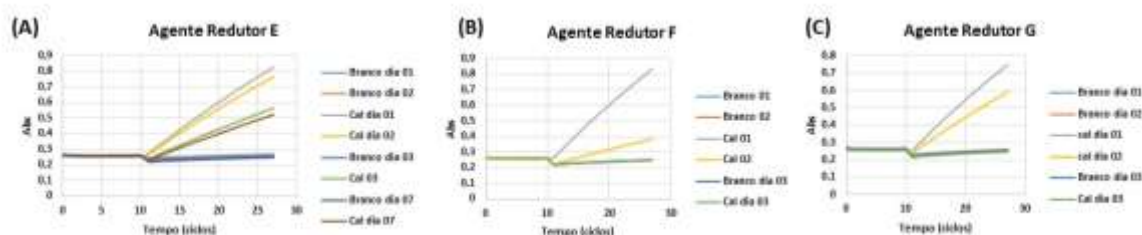
Tabela 46 – Avaliação da estabilidade da formulação com agente redutor F

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fator de Calibração	309,97	825,65	12478,95
Randox 3 (38,3 - 57,5)	39,85	40,21	68,14
S1	21,45	22,40	56,89
S2	1,23	1,25	2,50

Tabela 47 – Avaliação da estabilidade da formulação com agente redutor G

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fator de Calibração	321,45	389,20	13748,12
Randox 3 (38,3 - 57,5)	39,56	40,25	87,98
S1	22,45	23,56	65,32
S2	1,75	1,84	7,42

Gráfico 12 – Avaliação da estabilidade 37°C da formulação com adição de agente redutores



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação. (A) corresponde ao Agente Redutor E, (B) corresponde ao Agente Redutor F e (C) corresponde ao Agente Redutor G.

Através dos resultados plotados, foi possível observar que o agente redutor E apresenta melhor performance quanto ao estresse térmico, uma vez que os reagentes F e G já no segundo dia de armazenamento a 37°C apresentaram quedas significativas de absorbância e conseqüentemente alterações de valores de controle e soro.

6.3.5.2.3 AVALIAÇÃO DO COMPOSTO S e G

A termoestabilidade pode ser aumentada alterando o microambiente enzimático, baseado no fato de que o microambiente pode afetar as forças intramoleculares proteicas e estabilizar a estrutura de modo a aumentar a atividade enzimática mesmo nas condições de estresse térmico (GIANFREDA; SCARFI, 1991). Dois aditivos foram testados com a finalidade de melhorar o microambiente da enzima na formulação e permitir melhor termoestabilidade, sendo: Os compostos G e S.

Os resultados de fator de calibração, controle e amostras estão plotados nas Tabelas 48 e 49, e a representação das absorbâncias estão apresentadas no Gráfico 13.

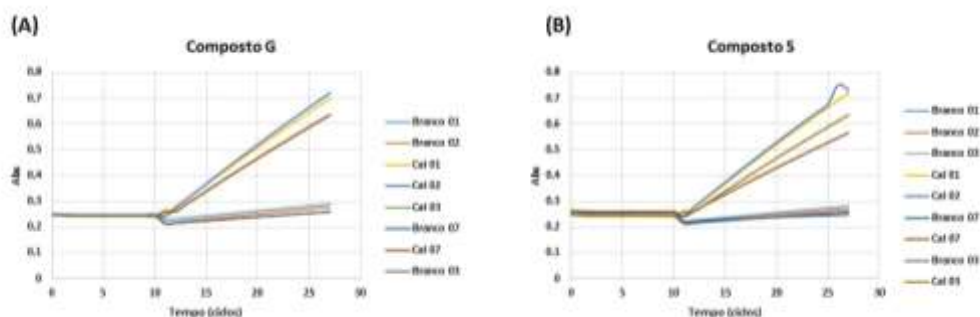
Tabela 48 – Avaliação da estabilidade da formulação com composto G

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	401,44	390,02	530,00	542,62	589,78	590,12
Randox 3 (38,3 - 57,5)	42,57	42,71	40,11	41,12	40,65	41,23
S1	21,45	21,30	21,21	21,47	21,50	23,54
S2	1,24	1,30	1,32	1,42	1,44	1,36

Tabela 49 – Avaliação da estabilidade da formulação com composto S

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	401,61	368,59	415,12	578,03	597,45	608,45
Randox 3 (38,3 - 57,5)	42,42	42,50	43,52	42,32	41,28	61,61
S1	22,45	21,02	22,50	22,40	22,39	27,08
S2	1,42	1,44	1,40	1,47	1,50	1,74

Gráfico 13 – Avaliação da estabilidade 37°C da formulação com adição de composto G e S



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação. (A) Corresponde ao Composto G e (B) Corresponde ao Composto S.

Ao analisar os resultados é possível concluir que o composto G mostrou influência na estabilidade, uma vez que demonstrou menor queda de absorbância conforme aumentava os dias de armazenamento em 37°, além de não expressar alterações significativas nos valores de controle e amostra ao longo do tempo. O composto S também atuou sob a termoestabilidade, no entanto não foi tão satisfatório quanto o composto G. Dessa forma, os resultados sugerem que o composto G deve fazer parte da composição da formulação de quantificação de TBA.

6.3.5.2.4 SAL, SOLVENTE ORGÂNICO E DETERGENTE

A adição de solvente orgânico em uma formulação para kits de diagnóstico *in vitro* possui diversas funções, porém a escolha do solvente orgânico deve levar em conta a sua utilização em sistema automático. Grandes quantidades de solventes, podem precipitar as proteínas causando turbidez nas cubetas de reação e estragando os analisadores automatizados, impedindo a mensuração do analito e gerando prejuízo para os laboratórios. Além disso, umas das funções do uso de solvente orgânico é a capacidade de ligação com partículas de lipídeos do soro humano, clareando a amostra e por consequência prevenindo a interferência por triglicérides no ensaio (DENNEY, 2001).

A adição de sal pode ser útil em formulações de kits de determinação de analitos de diagnóstico *in vitro* pela capacidade de estabilizar os reagentes, uma vez que a concentração de sal, assim como o pH pode mudar a condição da solução e consequentemente ter efeito sob a catálise enzimática (PARK; RAINES, 2001). Os detergentes agem como surfactantes, que possuem efeito estabilizador por promover a exclusão de parte das proteínas do meio, evitando efeitos do microambiente reacional sob a enzima, evitando mudanças indesejáveis (SILVA, 2018).

Dessa maneira, foram testados adição de um sal, um detergente e um solvente orgânico para avaliar se haveria algum impacto positivo ou negativo na formulação, resultando nas seguintes formulações: (1) sal, (2) detergente e (3) solvente orgânico, como demonstrado nas Tabelas 50,51 e 52 e Gráfico 14.

Tabela 50 – Avaliação da estabilidade da formulação com adição de sal

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	358,55	349,17	344,83	364,43	465,7	501,20
Randox 3 (38,3 - 57,5)	98,78	99,70	97,54	98,01	97,23	97,97

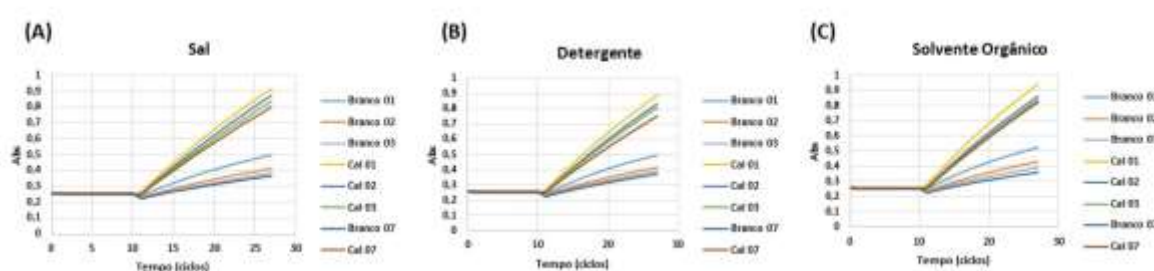
Tabela 51 – Avaliação da estabilidade da formulação com adição de detergente

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	415,11	400,64	391,85	391,85	421,41	524,778
Randox 3 (38,3 - 57,5)	60,60	60,54	64,87	60,98	61,45	62,62

Tabela 52 – Avaliação da estabilidade da formulação com adição de solvente orgânico

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	362,47	348,02	362,71	335,45	475,80	623,50
Randox 3 (38,3 - 57,5)	104,5	99,89	108,02	107,50	106,2	99,98

Gráfico 14 – Avaliação da estabilidade 37°C da formulação com adição de sal, solvente e detergente



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação. (A) Corresponde a adição de Sal, (B) Corresponde a adição de Detergente e (C) Corresponde a adição de Solvente Orgânico.

Para a composição final da formulação de TBA não foi adicionado sal, solvente orgânico ou detergente pois de acordo com os resultados por mais que a queda de absorbância da reação tenha sido menor, foi possível observar uma alteração no branco da reação que resultou em concentrações diferentes de controle e amostra.

6.3.5.2.5 ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 1

Novamente reforçando o papel do pH na reação enzimática, foi estudado o comportamento da Solução 1 frente a dois outros pHs de modo a tentar melhorar ainda mais a estabilidade: (1) pH 3,5 e (2) pH 4,5, apresentados nas Tabelas 53 e 54 e Gráfico 15.

Em pH 3,5 foi possível observar uma mudança de absorbância de reação que fica evidente com 7 dias de armazenamento a 37°C, de modo a alterar os valores de amostra e soro, a queda fica evidente na curva de reação demonstrada pelo gráfico 24.

Para o pH 4,5 concluiu-se que a queda de absorvância foi menor que no pH de 3,5, porém continuou apresentando alterações de valores com 7 dias de armazenamento em estufa.

Com os resultados demonstrados, inferiu-se que o melhor pH para realização dos testes era 4,0, uma vez que sua alteração para valores menores ou maiores não resultou em melhora no desempenho da formulação frente ao estresse térmico.

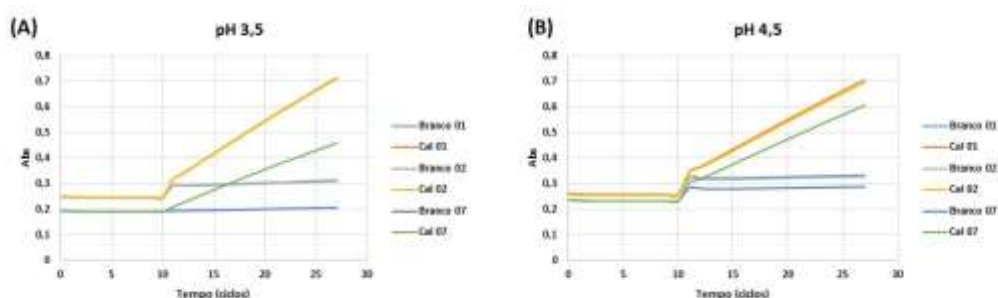
Tabela 53 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 1 em pH 3,5

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	417,01	423,91	404,04	485,70	491,12	987,52
Randox 3 (38,3 - 57,5)	43,52	44,21	43,98	43,61	44,10	50,12
S1	21,20	22,01	21,35	21,65	21,21	27,45
S2	1,10	1,11	1,12	1,10	1,15	1,98

Tabela 54 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 1 em pH 4,5

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	440,72	445,69	527,7	540,12	570,62	604,23
Randox 3 (38,3 - 57,5)	41,25	42,05	41,32	41,41	41,02	58,00
S1	21,21	21,45	20,54	21,45	21,65	44,87
S2	1,17	1,12	1,15	1,17	1,15	2,8

Gráfico 15 – Avaliação da estabilidade do Solução 1 em pH 3,5 e 4,5



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação. (A) Corresponde ao pH 3,5 e (B) Corresponde ao pH 4,5.

6.3.5.2.6 ESTUDO DE pH DA SOLUÇÃO 2

A enzima 3HSD é estável na faixa de pH: 8,0 – 10,0 (ASAHIKASEI). Para ampliar o estudo de estabilidade na faixa de pH, foram testados dois outros valores de pH: (1) pH 8,5 e (2) pH 9,5 apresentados nas Tabelas 55 e 56 e Gráfico 16.

Com os resultados demonstrados, inferiu-se que o melhor pH para realização dos testes era 9,0, uma vez que sua alteração para valores menores ou maiores não resultou em melhora no desempenho da formulação frente ao estresse térmico. E o pH de 8,5 não foi observado o mesmo perfil de reação esperado para a determinação do TB, como pode ser observado pela representação gráfica (Gráfico 16).

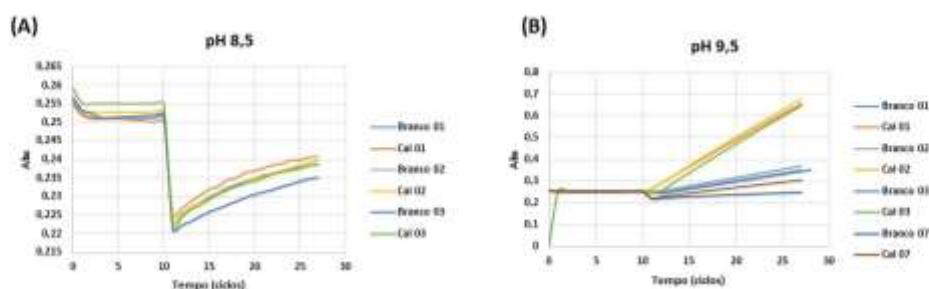
Tabela 55 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 2 em pH 8,5

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Fator de Calibração	2956,01	3212,25	3624,02
Randox 3 (38,3 - 57,5)	356,23	345,52	380,01

Tabela 56 – Avaliação da estabilidade da formulação do Solução 2 em pH 9,5

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Fator de Calibração	520,63	525,24	526,84	530,12	534,12	524,02
Randox 3 (38,3 - 57,5)	102,30	105,85	104,75	108,56	104,23	105,20

Gráfico 16 – Avaliação da estabilidade do Solução 2 em pH 8,5 e 9,5



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação. (A) Corresponde ao pH 8,5 e (B) Corresponde ao pH 9,5.

6.4 DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DE TBA

Após todas modificações realizadas, a formulação final para compor o kit de quantificação de TBA da Biotécnica é apresentada na Tabela 57. As informações e concentrações importantes para os reagentes foram codificadas ou mostradas de forma abrangente, de modo a proteger o segredo industrial e propriedade intelectual da empresa.

Tabela 57 – Composição formulação final de TBA

Reagente 1 (SOLUÇÃO 1)	Reagente 2 (SOLUÇÃO 2)
2xTampão D pH 4,0 (2 – 8 mM)	2xTampão E pH 9,0 (> 200 mM)
100% Thio-NAD (> 10 g/L)	50% NADH (<10 g/L)
Estabilizante 1 (0,05%)	1/2 Enzima 3HSD (> 15 KU)
Estabilizante 2 (0,05%)	2xEstabilizante (0,05%)
-	Quelante B
-	Agente redutor E
-	Composto G

O valor da formulação final foi calculador e ao comparar com o produto importado e comercializado pela Biotécnica, o desenvolvimento resultou em uma redução de 10 vezes do custo com o produto, de forma que o objetivo do trabalho para o analito foi atingido.

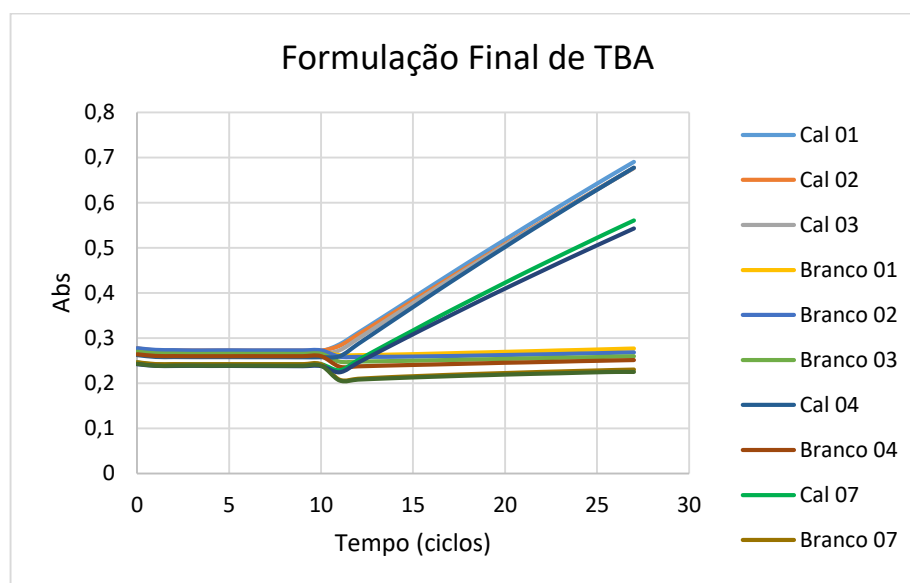
6.4.1 ESTABILIDADE ACELERADA DA FORMULAÇÃO FINAL

A formulação final de TBA foi submetida a estabilidade acelerada a 37^o C e os resultados são apresentados na Tabela 58 e Gráfico 17.

Tabela 58 – Avaliação da estabilidade da formulação final de TBA a 37° C

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 25
Fator de Calibração	408,16	409,00	407,99	399,81	409,15	562,01
Randox 3 (38,3 - 57,5)	45,05	45,23	45,12	45,10	45,20	45,45
S1	20,23	21,20	20,45	20,78	21,02	20,56
S2	1,32	1,30	1,28	1,32	1,30	1,35

Gráfico 17 – Avaliação da estabilidade da formulação final de TBA a 37° C



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

Com os resultados plotados, é possível concluir que a formulação final de TBA, em que Solução 1 e Solução 2 foram armazenados em estufa 37° C, se manteve estável de modo que há pequenas mudanças de absorbâncias de modo proporcional e que é facilmente revertida com o fator, não alterando as concentrações resultantes para soro e controle. Além disso, a formulação é capaz de se manter estável por pelo menos 7 dias para que possa ser transportada normalmente para as diversas localidades do país.

6.4.2 AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL

Foram determinadas 40 amostras de soro, sendo 20 de soro animal e 20 de soro humano, de diferentes valores, de modo a abranger toda a faixa operacional do

produto, reavendo os parâmetros que devem ser atendidos para o mercado. Os resultados são mostrados na Tabela 59.

Tabela 59 – Avaliação da formulação final de TBA

Soro Humano	Concorrente G (umol/L)	Biotécnica (umol/L)	Erro(%)	Soro Animal	Concorrente G (umol/L)	Biotécnica (umol/L)	Erro(%)
1	3,44	3,57	3,8	1	13,82	13,54	-2,1
2	3,22	3,25	1,1	2	3,16	3,15	-0,5
3	6,08	6,42	5,6	3	1,37	1,33	-2,9
4	6,53	6,62	1,4	4	91,17	92,51	1,5
5	3,13	3,20	2,2	5	55,15	54,88	-0,5
6	3,03	3,00	-1,0	6	41,34	42,12	1,9
7	4,14	4,22	1,8	7	42,74	42,69	-0,1
8	3,82	3,95	3,5	8	35,31	36,12	2,3
9	18,32	18,58	1,4	9	1,00	1,08	7,5
10	18,56	18,67	0,6	10	156,23	155,41	-0,52
11	1,50	1,58	5,33	11	184,79	184,52	-0,15
12	1,02	1,04	2,94	12	1,52	1,53	0,7
13	83,71	84,19	0,6	13	2,04	2,06	0,7
14	86,85	87,53	0,8	14	3,51	3,61	2,7
15	9,38	9,41	0,3	15	1,69	1,69	0,0
16	9,01	9,24	2,6	16	2,04	2,05	0,2
17	1,24	1,20	-3,23	17	174,54	180,00	3,13
18	2,00	2,20	10,00	18	200,36	201,40	0,52
19	1,32	1,36	3,4	19	241,58	246,00	1,83
20	1,54	1,55	0,6	20	250,00	254,12	1,65

É possível observar através dos resultados plotados que nenhuma amostra demonstrou erro total maior que o erro total do analito, de modo a demonstrar exatidão da formulação. Além disso, como as amostras possuíram valores em toda a faixa operacional do produto, pode-se inferir que não houve alteração na sensibilidade e linearidade do kit.

De maneira geral, a formulação de TBA foi desenvolvida de modo a apresentar boas características competitivas dos parâmetros exigidos para regulamentação e comercialização apresentando menor custo quando comparada com importação do produto.

6.5 FORMULAÇÃO BASE PARA QUANTIFICAÇÃO DE NEFA

6.5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE NEFA

A formulação base para o kit colorimétrico *in vitro* para quantificação de Ácidos graxos não esterificados (NEFA) foi baseada nos achados do seguinte levantamento bibliográfico: (PERIS et al., 1997), (CHILLIARD; BAUCHART; BARNOUIN, 1984), (FAUSA; SKALHEGG, 1974), (STERN; SHAPIRO, 1953), (KRUKOVSKY; KNAYSI, 1942), (JOHNSON; PETERS, 1993), (JEBENS; SEJERSTED, 1992), (CHRISTMASS et al., 1998) e (LIFE; PRODUCTS, 2014). Todas as informações aqui apresentadas são propriedade intelectual da Biotécnica Indústria LTDA, por isso, foram codificadas ou apresentadas de maneira abrangente para proteção do segredo industrial da formulação.

De modo geral, através da interpretação dos dados da literatura a formulação birreagente de NEFA foi elaborada como descrito na Tabela 60, visando execução correta do ensaio de determinação do analito.

Tabela 60 – Primeira formulação proposta para o kit de quantificação de NEFA, com base na literatura.

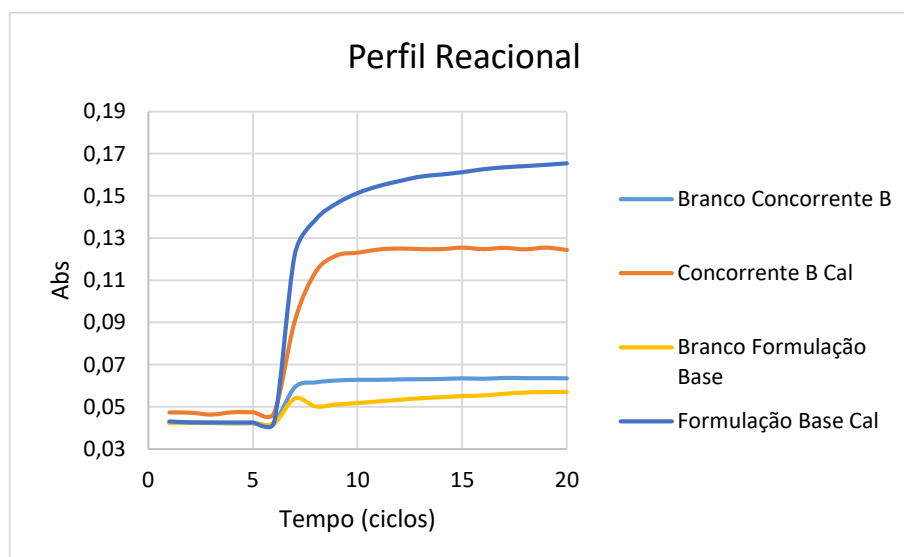
Solução 1	Solução 2
Tampão pH 7,0 (50 – 100 mM)	Tampão pH 7,0 (50 – 100 mM)
Coenzima A (coA) (< 5 mM)	Enzima AcilcoA oxidase (ACOD) (>20 KU)
ATP (< 15 mM)	Peroxidase (POD) (>1 KU)
Enzima AcilcoA Sintetase (ACS) (>3 KU)	Agente Colorimétrico (>0,5 mM)
4-Aminoantipirina (4-AAP) (>0,1 mM)	Composto N (2 – 30 mM)

O protocolo de ensaio foi estabelecido também com base na literatura, principalmente com as instruções de uso dos concorrentes e estão apresentados na tabela 59. As amostras e reagentes utilizados na proporção de 3 µL de amostra para 225 µL de reagente, sendo 180 µL de Solução 1 e 45 µL de Solução 2, ou seja, três partes de Solução 1 para uma parte de Solução 2. A reação ocorreu sob incubação a 37° C por 10 minutos. Sendo realizadas as leituras de absorbância nos tempos T1 e T2, ao final de 5 minutos, em uma reação crescente (Gráfico 18 e Tabela 61). A leitura foi feita a 550 nm.

Tabela 61 – Parâmetros de reação para realização dos testes de NEFA

Comprimento de onda	550 nm
Temperatura de reação	37° C
Tipo de reação	Ponto final
Volume de amostra	3 µL
Volume de SOLUÇÃO 1	180 µL
Volume de SOLUÇÃO 2	45 µL
Incubação de SOLUÇÃO 1 + amostra	270 segundos
Incubação de SOLUÇÃO 1 + amostra + SOLUÇÃO 2	300 segundos

Gráfico 18 – Perfil reacional de NEFA



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

A rastreabilidade da calibração do ensaio de NEFA é proveniente do valor informado pelo concorrente B, que tem origem atribuída de um ensaio espectrofotométrico UV.

6.5.1 AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA

A formulação inicial foi preparada em balança analítica e seguindo as instruções encontradas na literatura. Foi realizada uma análise visual do reagente preparado na formulação inicial contra a formulação do concorrente B (Figura 42). Para descobrir se a formulação produziu um reagente válido, primeiro foi avaliado o

desempenho frente aos controles e algumas amostras de soro humano e animal, de modo a descobrir se a formulação estava reagindo a presença do analito. O erro entre as amostras foi calculado e analisado com base no erro total do analito. O erro total do analito utilizado para as amostras de NEFA foi de $\pm 40\%$ determinado por Karpe (KARPE; DICKMANN; FRAYN, 2011).

Para avaliação do desempenho inicial da formulação, em equipamento automático AU400 as concentrações obtidas para algumas amostras de soro humano e animal em comparação com o concorrente B foi foram plotado apresentadas na Tabela 62.

Figura 42 – Aspecto visual Solução 1/Solução 2 Formulação Base X Concorrente B



O Aspecto visual da solução 1 e 2 da formulação inicial proposta e do concorrente B se diferem.

É possível concluir que a formulação inicial mostrou potencial porém todos os erros nas amostras foram acima do erro total do analito, demonstrando necessidade de aprimoramento da formulação. Além disso, a coloração do Solução 1 e Solução 2 não estavam idênticas ao aspecto visual do Solução 1 e Solução 2 do concorrente B. O Solução 1 do concorrente B apresenta uma coloração transparente e o Solução 1 da formulação inicial foi de uma coloração amarelada, enquanto que o Solução 2 do concorrente B é amarelo escuro e transparente e o Solução 2 da formulação inicial foi amarelo palha bem claro.

Tabela 62 – Desempenho inicial da formulação base frente ao concorrente B.

	Concorrente B (mmol/L)	Formulação Inicial NEFA (mmol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	17,6678	6,6269	-
Nefa Control 1 (0,36 - 0,58)	0,48	0,21	-
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	0,57	-
SH1	0,35	0,74	111,43
SH2	0,60	0,98	63,33
SH3	0,54	0,78	44,44
SH4	0,10	0,34	240,00
SH5	0,32	0,65	103,13
SH6	0,30	0,9	200,00
SH7	0,45	0,67	48,89
SH8	0,70	0,98	40,00
SH9	0,17	0,74	335,29
SH10	0,23	0,63	173,91
SA11 (bovino)	0,37	0,66	78,38
SA12 (bovino)	0,47	0,75	59,57
SA13 (bovino)	0,41	0,97	136,59
SA14 (felino)	0,39	0,56	43,59
SA15 (felino)	0,36	0,67	86,11
SA16 (felino)	0,36	0,69	91,67
SA17 (canino)	0,87	1,47	68,97
SA18 (canino)	0,17	0,87	411,76
SA19 (canino)	0,16	0,65	306,25
SA20 (canino)	0,29	0,41	41,38

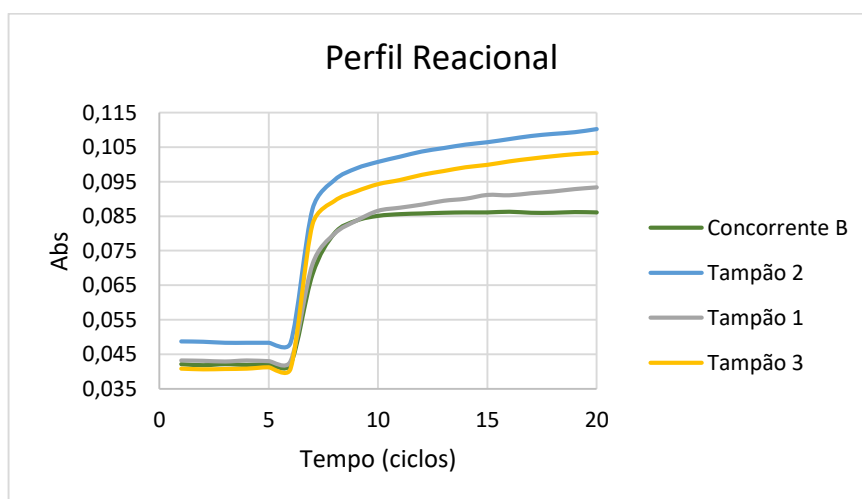
Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

6.6 OTIMIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO BASE DE NEFA

6.6.1 DETERMINAÇÃO DO TAMPÃO OU SOLVENTE ORGÂNICO DA FORMULAÇÃO

Como mencionado anteriormente, uma reação enzimática depende do microambiente para que seja efetiva e estável. Dessa forma, foram testados compostos para melhorar a reação, sendo: três tampões: (1) Tampão 1, (2) Tampão 2 e (3) Tampão 3, mostradas na Tabela 63 e no Gráfico 19. Também foi realizado o teste de solvente orgânico e solução aquosa: (4) Solvente 1, (5) Solvente 2, (6) Solvente 3 e (7) Solução Aquosa, descritos na Tabela 64 e no Gráfico 20.

Gráfico 19 – Perfil reacional de NEFA e tampões



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação

Tabela 63 – Desempenho da formulação com diferentes tampões.

	Concorrente B (mmol/L)	Tampão 1 (mmol/L)	Erro (%)	Tampão 2 (mmol/L)	Erro (%)	Tampão 3 (mmol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	17,6678	15,4083	-	8,2844	-	8,7681	-
Nefa Control 1 (0,36 -0,58)	0,48	0,65	-	0,32	-	0,33	-
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	0,90	-	0,71	-	0,70	-
SH1	0,35	0,41	17,14	0,8	128,57	0,91	160,00
SH2	0,60	0,78	30,00	0,89	48,33	0,9	50,00
SH3	0,54	0,68	25,93	0,8	48,15	0,63	16,67
SH4	0,10	0,19	90,00	0,45	350,00	0,41	310,00
SH5	0,32	0,4	25,00	0,59	84,38	0,74	131,25
SH6	0,30	0,39	30,00	0,78	160,00	0,62	106,67
SH7	0,45	0,57	26,67	0,84	86,67	0,33	-26,67
SH8	0,70	0,84	20,00	0,98	40,00	0,54	-22,86
SH9	0,17	0,25	47,06	0,34	100,00	0,01	-94,12
SH10	0,23	0,26	13,04	0,36	56,52	0,84	265,22
SA11 (bovino)	0,37	0,47	27,03	0,41	10,81	0,45	21,62
SA12 (bovino)	0,47	0,58	23,40	0,87	85,11	0,25	-46,81
SA13 (bovino)	0,41	0,55	34,15	0,69	68,29	0,1	-75,61
SA14 (felino)	0,39	0,56	43,59	0,87	123,08	0,87	123,08
SA15 (felino)	0,36	0,47	30,56	0,98	172,22	0,64	77,78
SA16 (felino)	0,36	0,4	11,11	0,41	13,89	0,12	-66,67
SA17 (canino)	0,87	1,06	21,84	1,58	81,61	0,87	0,00
SA18 (canino)	0,17	0,27	58,82	0,78	358,82	0,87	411,76
SA19 (canino)	0,16	0,24	50,00	0,65	306,25	0,1	-37,50
SA20 (canino)	0,29	0,36	24,14	0,54	86,21	0,98	237,93

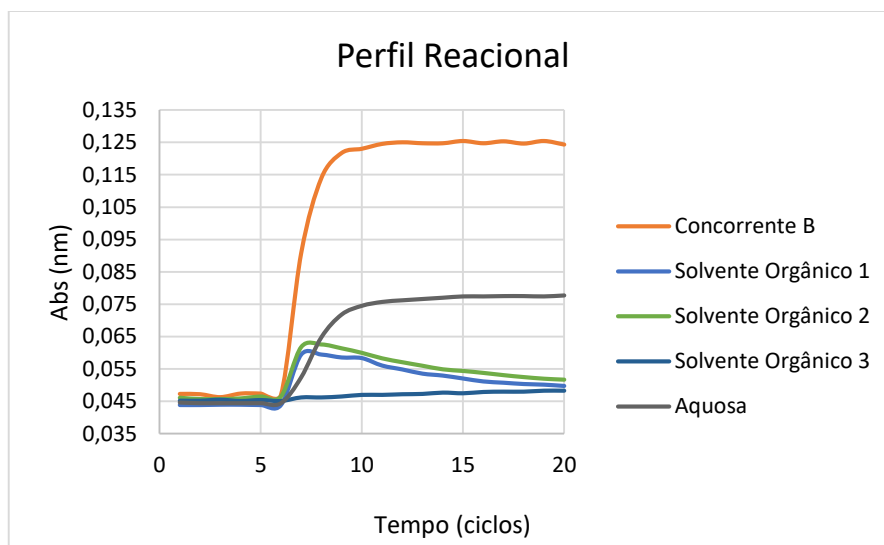
Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

Tabela 64 – Desempenho da formulação com diferentes Solvente Orgânico e água

	Concorrente B (mmol/L)	Solvente 1 (mmol/L)	Erro (%)	Solvente 2 (mmol/L)	Erro (%)	Solvente 3 (mmol/L)	Erro (%)	Água (mmol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	17,6678	270,23	-	295,65	-	255,84	-	27,87	-
Nefa Control 1 (0,36 - 0,58)	0,48	0,22	-	0,20	-	0,21	-	0,34	-
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	1,16	-	1,15	-	1,20	-	1,05	-
SH1	0,35	0,77	120,00	0,84	140,00	1,05	200,00	0,69	97,14
SH2	0,60	0,89	48,33	0,78	30,00	1,07	78,33	0,72	20,00
SH3	0,54	0,9	66,67	0,94	74,07	1,78	229,63	0,68	25,93
SH4	0,10	0,21	110,00	0,95	850,00	1,98	1880,00	0,96	860,00
SH5	0,32	0,87	171,88	0,96	200,00	1,63	409,38	0,78	143,75
SH6	0,30	0,84	180,00	0,65	116,67	1,65	450,00	0,87	190,00
SH7	0,45	0,59	31,11	0,87	93,33	0,25	-44,44	0,68	51,11
SH8	0,70	0,98	40,00	0,48	-31,43	0,87	24,29	0,89	27,14
SH9	0,17	0,71	317,65	0,98	476,47	0,98	476,47	0,26	52,94
SH10	0,23	1,02	343,48	0,56	143,48	0,65	182,61	0,45	95,65
SA11 (bovino)	0,37	0,14	-62,16	0,54	45,95	0,47	27,03	0,45	21,62
SA12 (bovino)	0,47	0,78	65,96	0,64	36,17	0,12	-74,47	0,52	10,64
SA13 (bovino)	0,41	0,98	139,02	0,66	60,98	0,36	-12,20	0,65	58,54
SA14 (felino)	0,39	1,06	171,79	0,84	115,38	0,98	151,28	0,41	5,13
SA15 (felino)	0,36	0,87	141,67	0,98	172,22	1,06	194,44	0,84	133,33
SA16 (felino)	0,36	1,04	188,89	0,69	91,67	1,45	302,78	0,75	108,33
SA17 (canino)	0,87	1,47	68,97	0,77	-11,49	0,12	-86,21	0,98	12,64
SA18 (canino)	0,17	0,65	282,35	0,77	352,94	0,98	476,47	0,26	52,94
SA19 (canino)	0,16	0,48	200,00	0,65	306,25	0,87	443,75	0,26	62,50
SA20 (canino)	0,29	0,96	231,03	0,65	124,14	0,87	200,00	0,45	55,17

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

Gráfico 20 – Desempenho da formulação com diferentes Solvente Orgânico e água



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

Os resultados demonstram que a utilização de solvente orgânico impede a reação de determinação de NEFA pois altera o perfil reacional da determinação e que o tampão 1 é o que fornece resultados mais promissores, com menor erro nas amostras, apresentando perfil reacional parecido com o concorrente B.

6.6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS DA REAÇÃO

6.6.2.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACOD

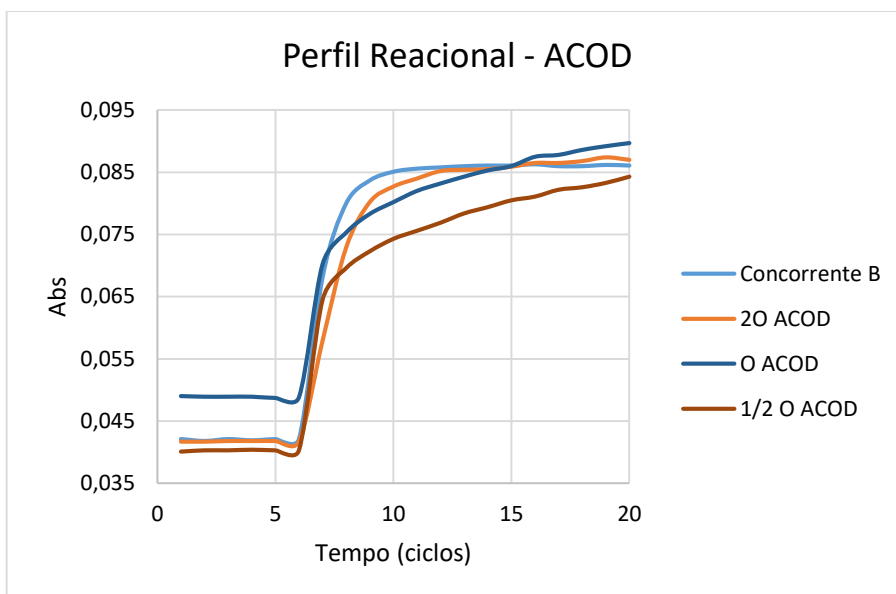
A enzima Acil coA oxidase (ACOD) é muito importante para a reação enzimática de determinação de NEFA (figura 5). Dessa forma, a enzima foi testada em três concentrações diferentes: O/2, O e 2O. Os resultados seguem apresentadas na Tabela 65 e o perfil reacional foi plotado no Gráfico 21.

Tabela 65 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACOD

	Concorrente B (mmol/L)	O/2 (mmol/L)	Erro (%)	O (mmol/L)	Erro (%)	2O (mmol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	17,6678	28,4910	-	6,6269	-	19,6851	-
Nefa							
Control 1 (0,36 -0,58)	0,44	0,21	-	0,36	-	0,42	-
Control 2 (0,76 - 1,14)	0,94	0,55	-	0,70	-	0,80	-
SH1	0,23	0,69	200,00	0,1	-56,52	0,2	-13,04
SH2	0,25	0,72	188,00	0,2	-20,00	0,2	-20,00
SH3	0,24	0,68	183,33	0,2	-16,67	0,22	-8,33
SH4	0,63	0,96	52,38	0,69	9,52	0,64	1,59
SH5	0,65	0,78	20,00	0,99	52,31	0,7	7,69
SH6	0,8	0,87	8,75	0,41	-48,75	0,77	-3,75
SH7	0,75	0,68	-9,33	0,65	-13,33	0,82	9,33
SH8	0,7	0,89	27,14	0,41	-41,43	0,8	14,29
SH9	0,71	0,26	-63,38	0,1	-85,92	0,81	14,08
SH10 (bovino)	0,8	0,45	-43,75	1,45	81,25	0,9	12,50
SA11 (bovino)	0,84	0,45	-46,43	0,36	-57,14	0,92	9,52
SA12 (bovino)	0,82	0,52	-36,59	0,9	9,76	0,91	10,98
SA13 (felino)	0,45	0,65	44,44	0,12	-73,33	0,65	44,44
SA14 (felino)	0,48	0,41	-14,58	0,51	6,25	0,5	4,17
SA15 (felino)	0,65	0,84	29,23	0,78	20,00	0,7	7,69
SA16 (canino)	0,55	0,75	36,36	0,97	76,36	0,61	10,91
SA17 (canino)	0,23	0,98	326,09	0,26	13,04	0,23	0,00
SA18 (canino)	0,18	0,26	44,44	0,02	-88,89	0,15	-16,67
SA19 (canino)	0,47	0,26	-44,68	0,6	27,66	0,5	6,38
SA20 (canino)	0,33	0,45	36,36	0,65	96,97	0,33	0,00

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

Gráfico 21 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACOD



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação

Os resultados plotados inferem que a enzima ACOD deve compor a formulação em concentração 20 para um melhor desempenho frente a mensuração do analito nas amostras de soro humano e animal, apresentando apenas uma amostra com erro maior que o erro total do analito.

6.6.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ACS

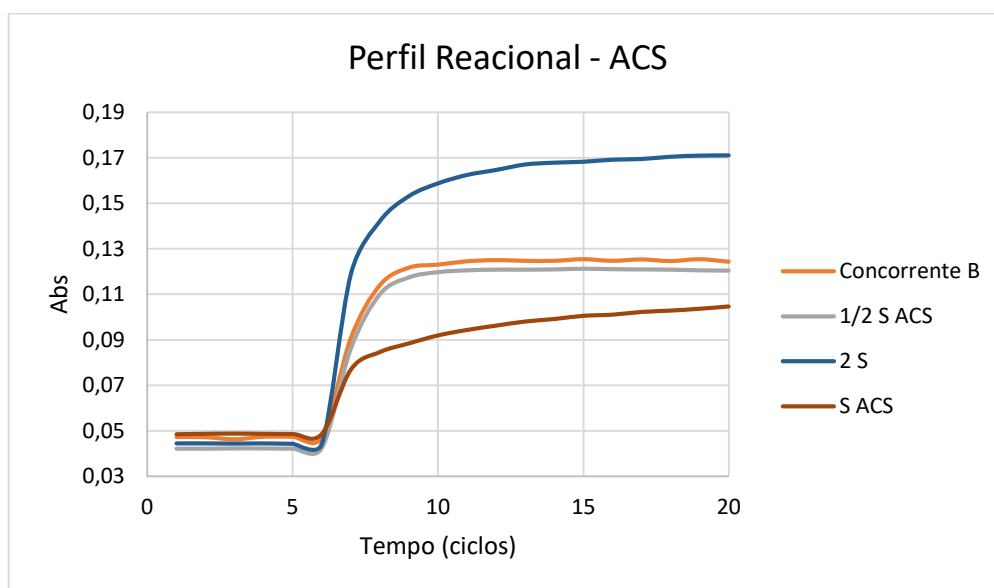
Além da enzima ACOD, a enzima Acil coA Sintetase (ACS) também é extremamente importante para a reação de determinação de NEFA (figura 5). Dessa forma, foram testadas três concentrações diferentes da enzima para determinar a formulação final de NEFA, sendo: S/2, S e 2S. Os resultados se encontram apresentados na Tabela 66 e a reação representada graficamente no Gráfico 22.

Tabela 66 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACS

	Concorrente B (mmol/L)	S/2 (mmol/L)	Erro (%)	S (mmol/L)	Erro (%)	2S (mmol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	17,2365	14,5285	-	19,5412	-	9,2510	-
Nefa							
Control 1 (0,36 -0,58)	0,42	0,41	-	0,36	-	0,60	-
Control 2 (0,76 - 1,14)	0,91	0,90	-	0,70	-	1,29	-
SH1	0,72	0,8	11,11	0,2	-72,22	1,52	111,11
SH2	0,52	0,55	5,77	0,2	-61,54	1,2	130,77
SH3	0,23	0,35	52,17	0,22	-4,35	0,6	160,87
SH4	0,68	0,69	1,47	0,64	-5,88	2,3	238,24
SH5	0,4	0,36	-10,00	0,7	75,00	0,95	137,50
SH6	0,12	0,16	33,33	0,77	541,67	0,35	191,67
SH7	0,35	0,33	-5,71	0,82	134,29	0,66	88,57
SH8	0,42	0,4	-4,76	0,8	90,48	0,74	76,19
SH9	0,51	0,55	7,84	0,81	58,82	1,06	107,84
SH10 (bovino)	0,58	0,6	3,45	0,9	55,17	1,42	144,83
SA11 (bovino)	0,32	0,36	12,50	0,92	187,50	0,72	125,00
SA12 (bovino)	0,27	0,25	-7,41	0,91	237,04	0,5	85,19
SA13 (felino)	0,98	1	2,04	0,65	-33,67	2,01	105,10
SA14 (felino)	0,41	0,45	9,76	0,5	21,95	0,91	121,95
SA15 (felino)	0,15	0,22	46,67	0,7	366,67	0,24	60,00
SA16 (canino)	0,22	0,24	9,09	0,61	177,27	0,41	86,36
SA17 (canino)	0,36	0,38	5,56	0,23	-36,11	0,71	97,22
SA18 (canino)	0,74	0,72	-2,70	0,15	-79,73	1,42	91,89
SA19 (canino)	0,58	0,6	3,45	0,5	-13,79	1,2	106,90
SA20 (canino)	0,52	0,55	5,77	0,33	-36,54	0,98	88,46

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

Gráfico 22 – Desempenho da formulação com diferentes concentrações de ACS



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação

Para uma melhor determinação do analito foi analisado a concentração da enzima ACS que deve ser de 1/2S para que os erros na mensuração de NEFA sejam menores que o erro do analito e o perfil de absorvância de reação próximo ao do concorrente B, tido como correto. Foi possível observar que erros muito altos foram observados com a concentração 2S de ACS.

6.6.2.2 DETERMINAÇÃO DO COFATOR ENZIMÁTICO

Um cofator é um composto químico ou íon metálico capaz de auxiliar a enzima a catalisar a reação enzimática (UPPADA,2014). Para as enzimas necessárias na determinação de NEFA, alguns cofatores são descritos em literatura. Três cofatores foram selecionados e testados, sendo: M, N e P. Os erros foram calculados e apresentados na Tabela 67 e a representação gráfica se encontra no Gráfico 23.

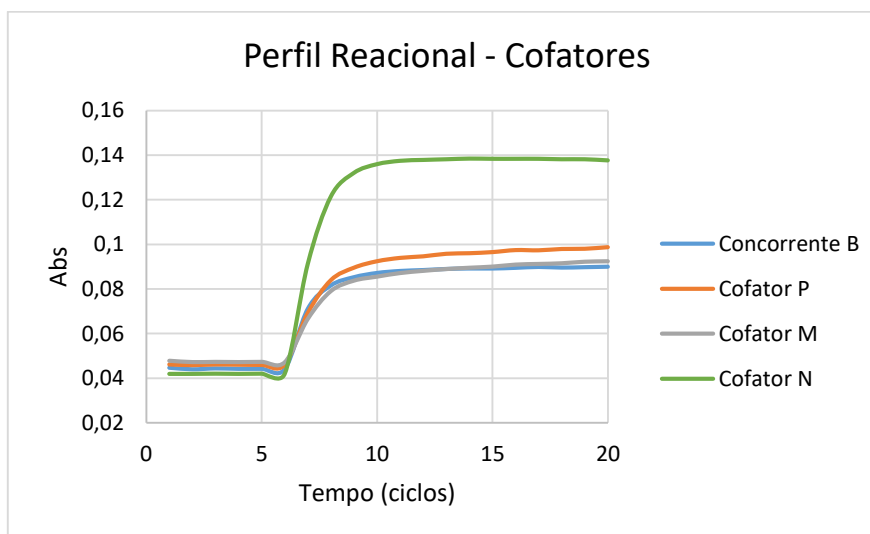
Tabela 67– Desempenho da formulação com diferentes cofatores enzimáticos

	Concorrente B (mmol/L)	Cofator M (mmol/L)	Erro (%)	Cofator N (mmol/L)	Erro (%)	Cofator P (mmol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	17,6678	17,8600	-	7,5210	-	16,2302	-
Nefa Control 1 (0,36 -0,58)	0,48	0,44	-	0,80	-	0,37	-
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,96	0,90	-	1,40	-	0,80	-
SH1	0,32	0,31	-3,13	0,66	106,25	0,4	25,00
SH2	0,3	0,32	6,67	0,63	110,00	0,36	20,00
SH3	0,54	0,55	1,85	0,84	55,56	0,62	14,81
SH4	0,42	0,4	-4,76	0,63	50,00	0,63	50,00
SH5	0,8	0,83	3,75	0,98	22,50	0,84	5,00
SH6	0,71	0,7	-1,41	0,77	8,45	0,87	22,54
SH7	0,62	0,66	6,45	0,89	43,55	0,9	45,16
SH8	0,21	0,18	-14,29	0,45	114,29	0,52	147,62
SH9	0,16	0,15	-6,25	0,63	293,75	0,2	25,00
SH10 (bovino)	0,14	0,15	7,14	0,2	42,86	0,14	0,00
SA11 (bovino)	0,27	0,28	3,70	0,36	33,33	0,33	22,22
SA12 (bovino)	0,41	0,44	7,32	0,54	31,71	0,45	9,76
SA13 (felino)	0,45	0,41	-8,89	0,85	88,89	0,48	6,67
SA14 (felino)	0,66	0,68	3,03	0,63	-4,55	0,89	34,85
SA15 (felino)	0,14	0,15	7,14	0,84	500,00	0,24	71,43
SA16 (canino)	0,22	0,2	-9,09	0,85	286,36	0,28	27,27
SA17 (canino)	0,78	0,8	2,56	1,2	53,85	0,88	12,82
SA18 (canino)	0,33	0,34	3,03	0,67	103,03	0,46	39,39
SA19 (canino)	0,39	0,4	2,56	0,97	148,72	0,48	23,08
SA20 (canino)	0,41	0,39	-4,88	0,63	53,66	0,56	36,59

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

O cofator N foi o que mais apresentou erros maiores que o erro total do analito, logo foi descartado como opção para compor a formulação de determinação de NEFA. No entanto o cofator P apresentou poucos erros em relação concorrente B, enquanto o cofator M não apresentou nenhum erro maior que o erro do analito. Dessa forma, o cofator escolhido foi o M, uma vez que também apresentou o perfil reacional mais próximo do concorrente, conforme observado no gráfico 34.

Gráfico 23 – Desempenho da formulação com diferentes cofatores



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação

6.6.3 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO COMPOSTO N NO REAGENTE DE NEFA

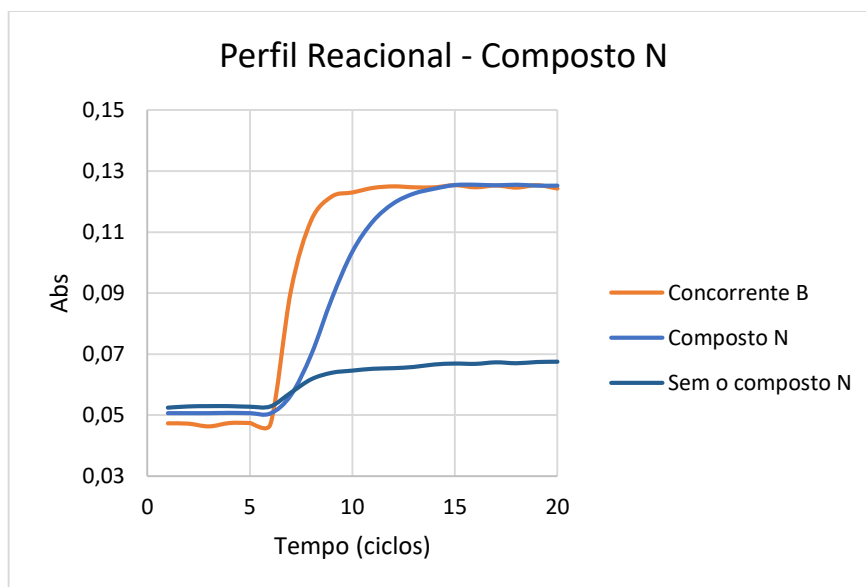
O composto N corresponde a um composto específico encontrado para determinação de NEFA e de alto valor agregado. Dessa forma, foi avaliada a reação na presença e ausência do composto, de forma a tentar avaliar a necessidade do composto para redução dos custos da formulação. O perfil da reação foi plotado de forma representativa no Gráfico 24. Os resultados foram plotados na Tabela 68.

Tabela 68 – Desempenho da formulação com ou sem o composto N

	Concorrente B (mmol/L)	Com Composto N (mmol/L)	Erro (%)	Sem Composto N (mmol/L)	Erro (%)
Fator de calibração	17,6678	15,2368	-	32,6584	-
Nefa Control 1 (0,36 - 0,58)	0,48	0,44	-	0,23	-
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,96	0,90	-	0,71	-
SH1	0,32	0,36	12,50	0,2	-37,50
SH2	0,3	0,4	33,33	0,12	-60,00
SH3	0,54	0,65	20,37	0,03	-94,44
SH4	0,42	0,48	14,29	0,4	-4,76
SH5	0,8	0,84	5,00	0,03	-96,25
SH6	0,71	0,78	9,86	0,95	33,80
SH7	0,62	0,6	-3,23	0,05	-91,94
SH8	0,21	0,2	-4,76	0,9	328,57
SH9	0,16	0,2	25,00	0,01	-93,75
SH10 (bovino)	0,14	0,15	7,14	0,36	157,14
SA11 (bovino)	0,27	0,3	11,11	0,1	-62,96
SA12 (bovino)	0,41	0,38	-7,32	0,96	134,15
SA13 (felino)	0,45	0,46	2,22	0,41	-8,89
SA14 (felino)	0,66	0,67	1,52	0,87	31,82
SA15 (felino)	0,14	0,2	42,86	0,02	-85,71
SA16 (canino)	0,22	0,26	18,18	0,78	254,55
SA17 (canino)	0,78	0,81	3,85	0,66	-15,38
SA18 (canino)	0,33	0,35	6,06	0,04	-87,88
SA19 (canino)	0,39	0,44	12,82	0,87	123,08
SA20 (canino)	0,41	0,42	2,44	0,9	119,51

Seja SH a sigla para Soro Humano e SA para soro animal. Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

Gráfico 24 – Desempenho da formulação com ou sem o composto N



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

Foi possível concluir que a determinação de NEFA necessita da presença do composto N, que desempenha função essencial para manutenção do perfil reacional e quantificação correta do analito nas diferentes amostras de soro humano e animal (Tabela 68). Sem o composto N, pode-se observar perda reacional total (Gráfico 24).

6.7 VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESEMPENHO DO KIT DIAGNÓSTICO DE NEFA

6.7.1 ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

6.7.1.1 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Tabela 69 – Determinação da interferência de ácido ascórbico

Ácido Ascórbico (mg/dL)	0	2,5	5,0	7,5	10,0
NEFA (mmol/L)	1,73	1,73	2,00	2,00	2,10
% Interferência	0	-0,19	15,00	15,00	20,55

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

O reagente demonstrou pouca especificidade para o NEFA frente a presença de ácido ascórbico, de forma necessitar de modificações para melhorar essa performance.

6.7.1.2 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE TRIGLICÉRIDES

Tabela 70 – Determinação da interferência de triglicérides

Triglicérides (mg/dL)	0	250	500	1000	2000
NEFA (mmol/L)	1,73	2,00	2,10	2,30	2,60
% Interferência	0	15,00	20,55	32,95	50,29

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

A mesma baixa especificidade para o analito foi demonstrada para triglicérides, apresentando interferência em 500 mg/dL do intralipid. Dessa forma, se faz necessário melhorar a formulação nesse quesito.

6.7.1.3 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE HEMOGLOBINA

Tabela 71 – Determinação da interferência de hemoglobina

Hemoglobina (mg/dL)	0	50	100	300	500
NEFA (mmol/L)	1,73	1,69	1,62	1,60	1,60
% Interferência	0	-2,31	-6,35	-7,51	-7,51

O reagente se demonstrou robusto, de forma a continuar específico para a dosagem de NEFA até uma concentração de 500 mg/dL de hemoglobina.

6.7.1.4 TESTE DE INTERFERÊNCIA DE BILIRRUBINA

Tabela 72 – Determinação da interferência de bilirrubina

Bilirrubina (mg/dL)	0	2,5	5	10	15
NEFA (mmol/L)	1,74	1,75	1,74	1,79	1,76
% Interferência	0	0,57	0	2,87	1,15

O reagente também se demonstrou robusto frente a bilirrubina, de forma a continuar específico para a dosagem de NEFA até uma concentração de 15 mg/dL de bilirrubina.

6.7.2 ADIÇÃO DE COMPOSTOS PARA MELHORAR PERFORMANCE DE INTERFERÊNCIA

Para melhorar o desempenho frente ao ácido ascórbico foi adicionada a enzima ascorbato oxidase em três concentrações: (1) 1/2 AO, (2) AO e (3) 2 AO representadas pelas Tabelas 73,74 e75 respectivamente.

Tabela 73 – Determinação da interferência de ácido ascórbico 1/2 AO

Ácido Ascórbico (mg/dL)	0	2,5	5,0	7,5	10,0
NEFA (mmol/L)	1,53	1,53	1,65	2,00	2,04
% Interferência	0	0	7,84	30,72	33,33

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

Tabela 74 – Determinação da interferência de ácido ascórbico AO

Ácido Ascórbico (mg/dL)	0	2,5	5,0	7,5	10,0
NEFA (mmol/L)	1,53	1,53	1,62	1,70	2,30
% Interferência	0	0	5,88	11,11	50,33

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

Tabela 75 – Determinação da interferência de ácido ascórbico 2AO

Ácido Ascórbico (mg/dL)	0	2,5	5,0	7,5	10,0
NEFA (mmol/L)	1,53	1,53	1,54	1,60	1,63
% Interferência	0	0	0,65	4,57	6,54

A adição de detergentes na formulação se faz necessária pois certos componentes do soro humano, principalmente o triglicérides pode gerar turbidez nas cubetas de reação dos aparelhos automáticos e interferir na mensuração do teste (DENNEY, 2001). Para melhorar o desempenho frente ao triglicérides foram testados dois detergentes em duas concentrações: (1) detergente 1, (2) dobro detergente 1, (3) detergente 2 e (4) dobro detergente 2, representadas pelas tabelas 76,77, 78 e 79 respectivamente.

Tabela 76 – Determinação da interferência de triglicérides com a formulação com detergente 1

Triglicérides (mg/dL)	0	250	500	1000	2000
NEFA (mmol/L)	1,73	1,75	1,86	2,30	2,30
% Interferência	0	1,16	7,51	32,95	32,95

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

Tabela 77 – Determinação da interferência de triglicérides com a formulação com dobro detergente 1

Triglicérides (mg/dL)	0	250	500	1000	2000
NEFA (mmol/L)	1,73	1,75	1,86	2,30	2,30
% Interferência	0	1,16	7,51	32,95	32,95

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

Tabela 78 – Determinação da interferência de triglicérides com a formulação com detergente 2

Triglicérides (mg/dL)	0	250	500	1000	2000
NEFA (mmol/L)	1,73	2,02	2,02	2,10	2,12
% Interferência	0	16,76	16,76	21,39	22,54

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

Tabela 79 – Determinação da interferência de triglicérides com a formulação com dobro de detergente 2

Triglicérides (mg/dL)	0	250	500	1000	2000
NEFA (mmol/L)	1,73	2,02	2,02	2,10	2,12
% Interferência	0	16,76	16,76	21,39	22,54

Em vermelho os erros acima do critério de aceitabilidade, que é de $\pm 10\%$ de interferência

Foi realizada a dosagem de duas amostras com cada formulação para conferência da dosagem do analito tanto após a adição da enzima ascorbato oxidase, quanto de detergente. Os resultados se encontram na tabela 80 e 81, respectivamente.

Tabela 80 – Determinação da dosagem de NEFA com adição de Ascorbato Oxidase (AO)

	Concorrente B (mmol/L)	½ AO (mmol/L)	Erro (%)	AO (mmol/L)	Erro (%)	2 AO (mmol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	17,4585	16,2358	-	18,0121	-	17,8456	-
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	0,90	-	0,84	-	0,94	-
S1	0,34	0,34	0	0,34	0	0,34	0
S2	0,25	0,26	4,00	0,24	-4,00	0,25	0

Tabela 81 – Determinação da dosagem de NEFA com adição de detergente

	Concorrente B (mmol/L)	Detergente 1 (mmol/L)	Erro (%)	Dobro Detergente 1 (mmol/L)	Erro (%)	Detergente 2 (mmol/L)	Erro (%)	Dobro de Detergente 2 (mmol/L)	Erro (%)
Fator de Calibração	17,4585	17,4242	-	28,0121	-	14,8456	-	10,2014	-
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	0,94	-	0,76	-	0,84	-	0,87	-
S1	0,34	0,34	0	0,64	88,24	0,74	117,65	0,88	158,2
S2	0,25	0,26	4,00	0,29	16,00	0,32	28,00	0,34	36,00

Em vermelho destaca-se erros acima do erro total de analito de $\pm 40\%$.

A partir do observado foi escolhido a presença de Ascorbato Oxidase na concentração 2AO na formulação final por melhorar o perfil de não interferência para o ácido ascórbico na determinação de NEFA e o detergente 1 em sua concentração normal para melhorar o desempenho frente triglicérides. Dessa forma, o reagente se apresentou mais robusto, sendo específico até 500 mg/dL de triglicérides e 10 mg/dL de ácido ascórbico.

6.7.3 PRÉVIA DA EXATIDÃO ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA

A formulação com as modificações representadas pela Tabela 82, foi submetida a prévia da exatidão analítica.

Tabela 82 – Formulação modificada para NEFA

Reagente 1 (SOLUÇÃO 1)	Reagente 2 (SOLUÇÃO 2)
Tampão 1 pH 7,0 (50 – 100 mM)	Tampão 1 pH 7,0 (50 – 100 mM)
Coenzima A (coA) (< 5 mM)	2 O Enzima AcilcoA oxidase (ACOD) (>20 KU)
ATP (< 15 mM)	Peroxidase (POD) (>1 KU)
½ S Enzima AcilcoA Sintetase (ACS) (>3 KU)	Agente Colorimétrico (>0,5 mM)
4-Aminoantipirina (4-AAP) (>0,1 mM)	Composto N (2 – 30 mM)
Cofator M	Detergente 1
2 AO Ascorbato Oxidase	-

Os resultados para a prévia de exatidão são apresentados na Tabela 83. As determinações de 40 amostras de soro, sendo 20 humanos e 20 animais (dentre caninos, felinos e bovinos) resultaram em nenhuma amostra com o erro acima do permitido para o analito, que é de $\pm 40,0\%$ (Tabela 83 e Gráfico 25).

Por meio do gráfico de regressão linear, é possível observar que as determinações apresentam uma boa correlação, evidenciado pelo Solução 2 de 0,9998 como pode ser observado no Gráfico 26. A equação $y = 1,0014x + 0,0107$, apresenta coeficiente angular acima de 0,9 e intercepto menor que o LoQ de soro, que é de 0,08 mmol/L, como preconizado. Esta equação foi utilizada no teste de significância para prever a concentração de NEFA nos níveis de decisão médica, no qual erro metodológico obtido para cada nível foi inferior ao erro do analito, conforme observado na Tabela 84.

Tabela 83 – Avaliação da formulação modificada de NEFA

Soro Humano	Concorrente B (mmol/L)	Biotécnica (mmol/L)	Erro(%)	Soro Animal	Concorrente B (mmol/L)	Biotécnica (mmol/L)	Erro(%)
1	0,23	0,24	4,4	1	0,31	0,32	1,6
2	0,30	0,33	10,2	2	0,58	0,59	1,7
3	0,42	0,41	-3,6	3	0,33	0,30	-7,7
4	0,51	0,55	7,9	4	1,03	1,03	0,5
5	0,67	0,67	0,8	5	2,41	2,48	2,9
6	0,72	0,77	7,7	6	3,63	3,62	-0,3
7	0,36	0,41	14,1	7	1,42	1,46	2,8
8	0,99	1,00	1,5	8	0,53	0,53	1,0
9	1,05	1,07	1,4	9	0,18	0,16	-11,4
10	5,40	5,38	-0,5	10	0,46	0,45	-3,3
11	0,71	0,73	2,8	11	0,22	0,24	9,3
12	0,15	0,15	0,0	12	0,30	0,32	6,8
13	0,46	0,48	4,3	13	0,51	0,50	-2,9
14	0,44	0,45	3,4	14	0,23	0,23	0,0
15	0,41	0,40	-1,2	15	0,15	0,16	6,9
16	0,88	0,90	2,3	16	0,67	0,68	1,5
17	7,49	7,51	0,3	17	0,78	0,76	-2,6
18	0,13	0,15	16,0	18	0,37	0,35	-4,1
19	0,63	0,64	1,6	19	1,03	1,06	2,9
20	0,78	0,81	3,9	20	4,51	4,56	1,1

Gráfico 25 – Dispersão dos erros relacionados a quantificação de NEFA

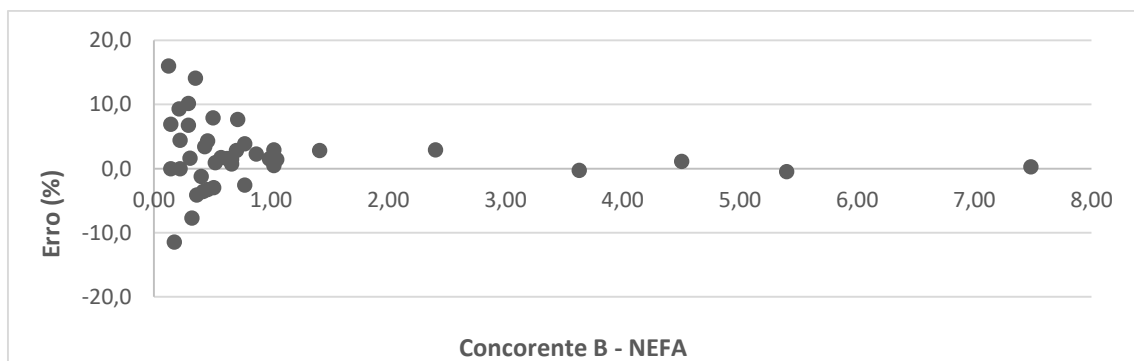


Gráfico 26 – Correlação da quantificação NEFA

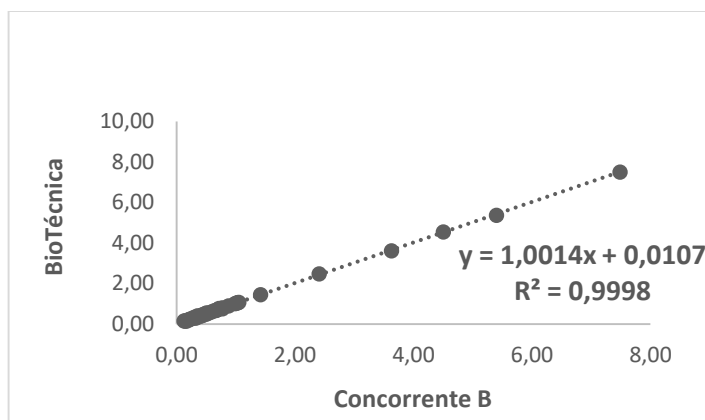


Tabela 84 – Concentrações de NEFA obtidas pela equação gerada

Níveis de decisão médica (mmol/L)	Concentrações obtidas (mmol/L)	%DIF
0,1	0,11	10,8
0,5	0,51	2,3
1,00	1,01	1,2

6.7.4 PRÉVIA DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA

A formulação quando submetida ao ensaio de sensibilidade analítica, resultou em um LoB de 0,01, LoD de 0,05 e LoQ de 0,08. Sendo o LoQ apresentado na Tabela 85. Os cálculos foram realizados seguindo as equações plotadas no item 5.3.3.

Tabela 85 – Determinação do LoQ da formulação modificada de NEFA

Concentração da amostra (mmol/L)	Erro (%)
0,02	60,00
0,05	58,47
0,08	12,23
0,10	10,65

Em vermelho os erros acima do erro total do analito, que é de $\pm 40\%$.

6.7.5 PRÉVIA DA LINEARIDADE ANALÍTICA DA FORMULAÇÃO DE NEFA

As diluições preparadas a partir das amostras com concentrações altas e baixas, de 2 mmol/L e 0,08 mmol/L de NEFA respectivamente, foram dosadas pelo

reagente em desenvolvimento. O Gráfico 27 representa a correlação entre o valor teórico das diluições e média obtidas na determinação de cada ponto. Por meio da regressão linear exposta, pode-se analisar e verificar que os parâmetros da equação obtida atendem aos critérios de aceitabilidade pré-estabelecidos. Além disso, uma análise estatística sobre os resultados evidenciam que o p-valor obtido foi inferior ao nível de significância pré-determinado, confirmando a linearidade do produto em teste.

A dispersão de erro nas determinações de NEFA, representado pelas diferenças entre as médias obtidas e o valor teórico, podem ser observadas no Gráfico 28. Percebe-se que nenhuma dosagem extrapolou o desvio de linearidade estabelecido, correspondente a 35% do menor erro total do analito, e que a maioria dos erros tem seu valor próximo a zero. Portanto, temos que o intervalo operacional do Kit de NEFA é de 0,08 mmol/L a 2,0 mmol/L, sendo este valor compatível com os kits já comercializado de mesmo método.

Gráfico 27 – Dispersão de erro das determinações

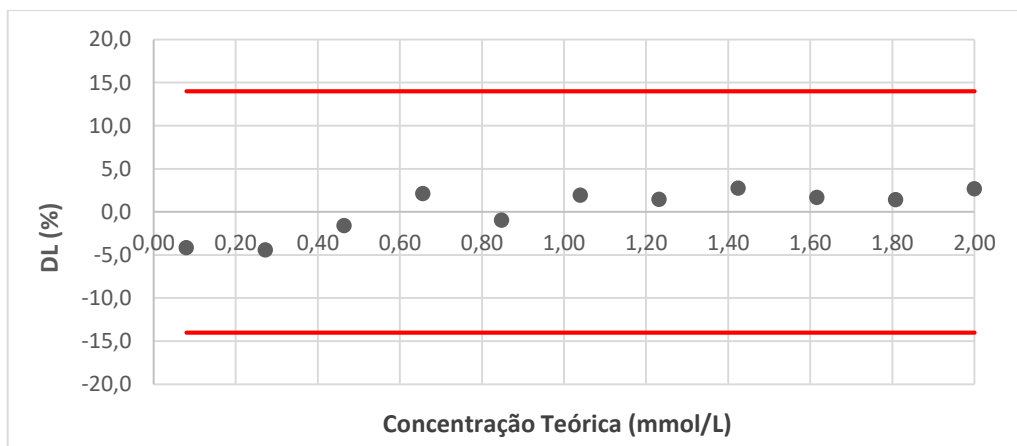
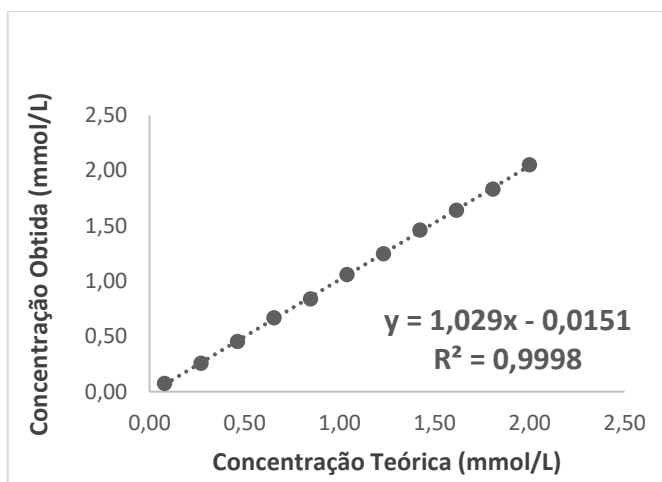


Gráfico 28 – Correlação entre as determinações



6.7.6 ENSAIO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO DE NEFA

6.7.6.1 ESTABILIDADE ACELERADA

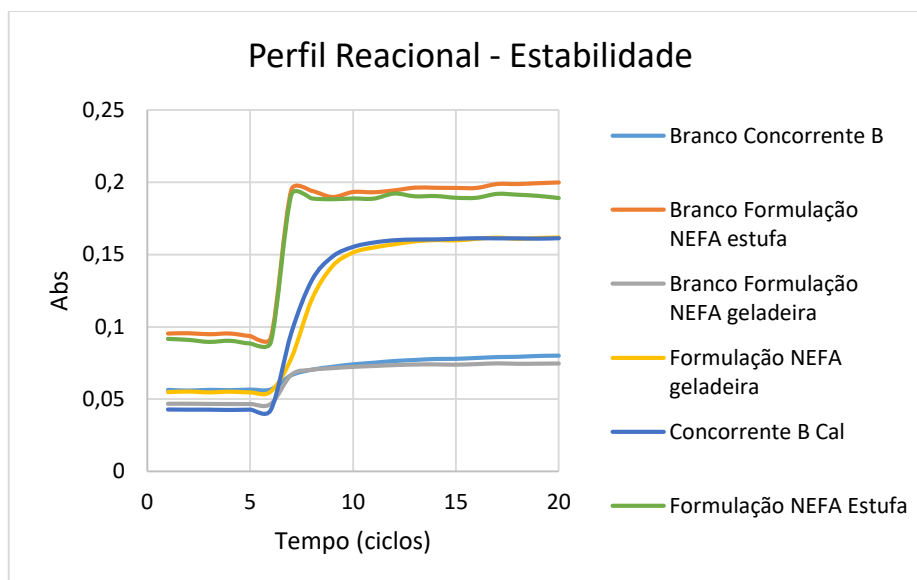
A formulação de Solução 1 e Solução 2 foram submetidas a estabilidade acelerada, de modo que foi armazenado a 37^o C. Com apenas um dia de estufa, o reagente 2 foi precipitado conforme mostrado na Figura 43. Dessa forma, com um dia na estufa a reação de NEFA foi perdida como pode ser observado pelo Gráfico 29 e Tabela 86.

Figura 43 – Aspecto visual da Solução 2 pós estufa



O Aspecto visual da solução 2 pós estufa ficou muito diferente do concorrente e apresentou precipitação.

Gráfico 29 – Reação após armazenamento a 37°



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação

Tabela 86 – Estabilidade Formulação modificada NEFA

Estabilidade Formulação Final de NEFA (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,2535	-2458,90
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	20,26
S1	1,45	540,60

6.8 TESTES PARA MELHORAR A ESTABILIDADE

6.8.1 ADIÇÃO DO COMPOSTO F e B NA FORMULAÇÃO DE NEFA PARA PREVINIR PRECIPITAÇÃO

Para acabar com a precipitação do Solução 2, foram testados dois compostos: B e F, cujos resultados estão representados nas Figuras 44 e 45, Gráfico 30 e Tabelas 87 e 88, respectivamente.

É possível observar que o composto B não se mostrou eficiente em evitar a precipitação do reagente 2 após armazenamento a 37°C. Com a adição do composto F, a coloração do Solução 2 da formulação Biotécnica ficou muito próxima da coloração do Solução 2 do concorrente B. Além disso, o Solução 1 se tornou parecido

com a coloração do concorrente após modificações supracitadas nos estudos anteriores.

Apesar do composto F ter resolvido o problema de precipitação do Solução 2, de modo geral, a formulação ainda apresenta queda de absorbância a medida que o tempo de armazenamento sob estresse térmico aumenta. Dessa forma, a formulação encontrava-se promissora para a estabilidade com mais modificações, uma vez que com adição do composto F, houve manutenção de valores de soro e controle mesmo com a queda de absorbância apresentada pela formulação.

Figura 44 – Aspecto visual do Solução 2 pré e pós estufa do composto B



O Aspecto visual da Solução 2 após adição do composto B continuou diferente do concorrente e apresentando precipitação.

Figura 45 – Aspecto visual do Solução 2 pré e pós estufa do composto F



O Aspecto visual da Solução 2 após adição do composto F se mostrou igual ao concorrente e sem precipitação.

Gráfico 30 – Reação da formulação com composto B e F após armazenamento a 37°C



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação. (A) Corresponde a adição do Composto B e (B) Corresponde a adição do Composto F.

Tabela 87 – Estabilidade Formulação com composto B

Estabilidade Formulação NEFA com composto B (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,2535	1803640
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	256,38
S1	1,45	6983,02

Tabela 88 – Estabilidade Formulação com composto F

Estabilidade Formulação NEFA com composto F (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,2535	32,5641
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	0,94
S1	1,45	1,43

6.8.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO F NA FORMULAÇÃO

Como o composto F se mostrou mais promissor quanto a melhora de estabilidade da reação, foram testadas diferentes concentrações denominadas (1)1/2 e (2)2F, cujo resultados se encontram nas Tabelas 89 e 90 e Gráfico 31.

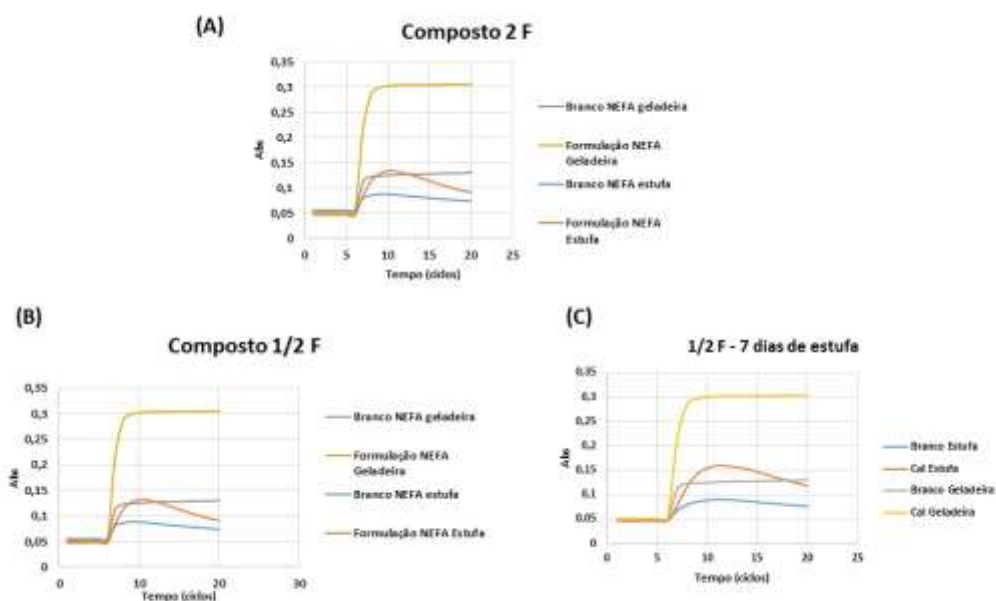
Tabela 89 – Estabilidade Formulação com 1/2 F

Estabilidade Formulação NEFA 1/2 composto F (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,4256	33,2685
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	0,92
S1	1,45	1,40

Tabela 90 – Estabilidade Formulação com 2 F

Estabilidade Formulação NEFA 2x composto F (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,8445	33,4562
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,94	0,95
S1	1,45	1,43

Gráfico 31 – Reação da formulação com composto 1/2 F e 2F após armazenamento a 37° e 1/2F após 7 dias de estufa



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorbância da reação. (A) Corresponde ao dobro da concentração do composto F, (B) Corresponde a metade da concentração do composto F e (C) Corresponde a metade da concentração do composto F após sete dias de estufa.

Como qualquer concentração do composto F mostrou-se promissora para melhorar a estabilidade da formulação de NEFA, escolheu-se a concentração 1/2 para

diminuir custo da formulação. Dessa forma, avaliou-se o desempenho por 7 dias em estufa. Os resultados se encontram na Tabela 91 e Gráfico 31.

Tabela 91 – Estabilidade Formulação com 1/2 F por 7 dias a 37° C

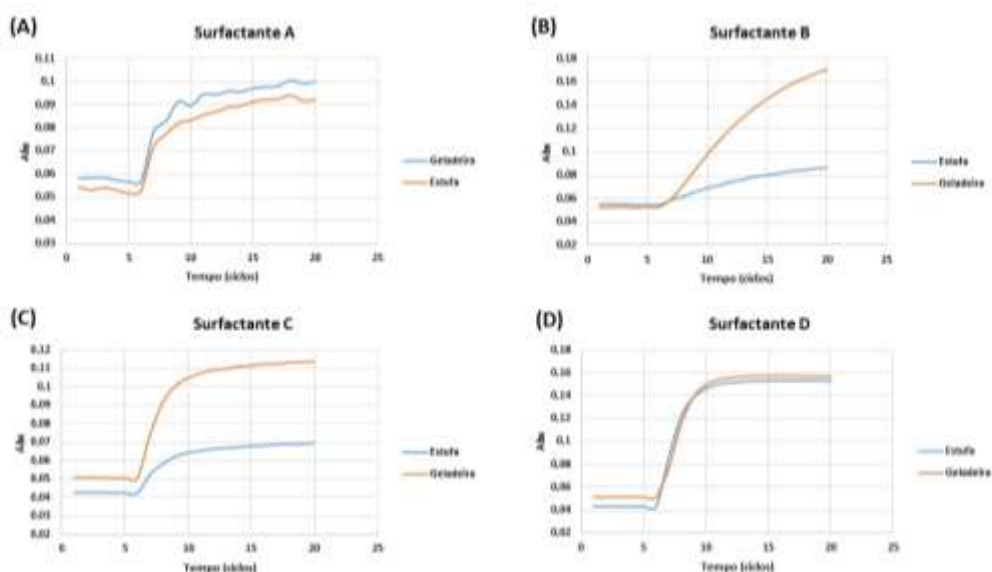
Estabilidade Formulação NEFA 1/2 composto F (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	7 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,8445	32,8545
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	0,94	0,92
S1	1,45	1,40

Como descrito, a adição do composto F é promissora para melhora da estabilidade da formulação de NEFA, por evitar a precipitação do Solução 2 e que mesmo com a queda de absorbância não remete perda de valores no soro e controle. No entanto, a queda de absorbância não é proporcional e deve ser melhorada, uma vez que tal queda pode prejudicar os ensaios de determinação dos NEFA.

6.8.3 DETERMINAÇÃO DE SURFACTANTES

Como visto anteriormente, a determinação de surfactantes é importante para o microambiente reacional e pode contribuir significativamente com a estabilidade da reação frente a temperatura. Com base em levantamento bibliográfico, foram selecionados quatro surfactantes na tentativa de melhorar a estabilidade: (1) Surfactante A, (2) Surfactante B, (3) Surfactante C e (4) Surfactante D. Os dados são apresentados nas Tabelas 92, 93, 94 e 95 respectivamente e os perfis reacionais foram plotados no Gráfico 32.

Gráfico 32 – Reação da formulação com surfactante A,B,C e D após armazenamento a 37° C



No eixo x está representado o tempo da reação e no eixo y a absorvância da reação. (A) Corresponde ao Surfactante A, (B) Corresponde ao Surfactante B, (C) Corresponde ao Surfactante C e (D) Corresponde ao Surfactante D.

Tabela 92 – Estabilidade Formulação com surfactante A

Estabilidade Formulação NEFA surfactante A (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	23456,01	2415,25
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	4,50	4,55
S1	6,30	4,02

Tabela 93 – Estabilidade Formulação com surfactante B

Estabilidade Formulação NEFA surfactante B (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	-1245,01	-1458,02
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	2,36	2,54
S1	4,17	5,26

Tabela 94 – Estabilidade Formulação com surfactante C

Estabilidade Formulação NEFA surfactante C (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,5489	42,5231
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	1,05	0,70
S1	1,43	1,30

Tabela 95 – Estabilidade Formulação com surfactante D

Estabilidade Formulação NEFA surfactante D (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	1 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,4526	30,1245
Nefa Control 2 (0,76 - 1,14)	1,02	1,03
S1	1,43	1,45

A partir dos dados plotados, é possível concluir que o surfactante A e o surfactante B mudaram o perfil reacional padrão da determinação dos NEFA e dessa forma não determinaram corretamente as amostras do analito.

O surfactante C demonstrou o perfil reacional padrão do analito mas também não conseguiu manter estabilidade frente ao estresse térmico, enquanto que o surfactante D se mostrou eficaz ao demonstrar a reação de determinação de NEFA e de permanecer estável frente a temperatura. Dessa forma, para compor a formulação final de NEFA foi escolhido o surfactante D.

6.8.3 DETERMINAÇÃO ESTABILIDADE FORMULAÇÃO FINAL

Considerando todas as modificações descritas neste trabalho, foram consideradas para a da formulação final do NEFA, estando representadas na Tabela 96.

Tabela 96 – Formulação final para NEFA

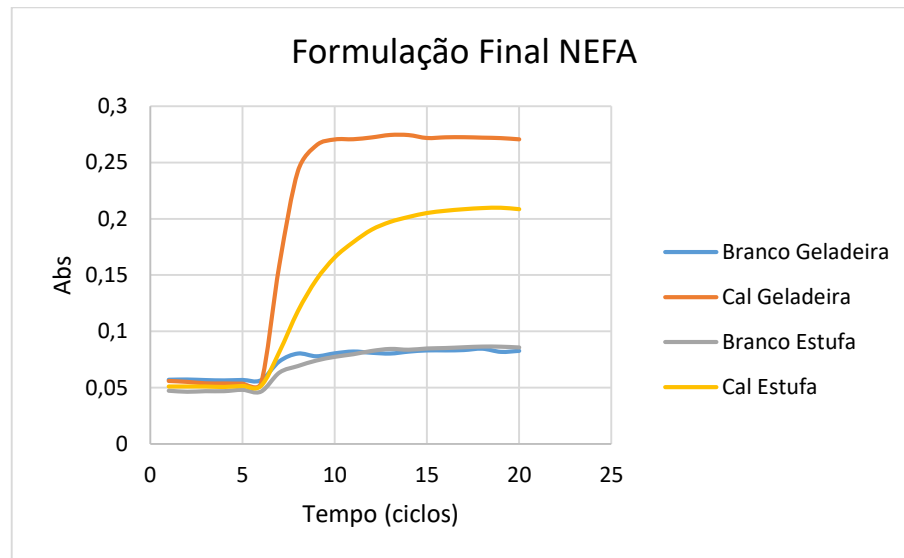
Reagente 1 (SOLUÇÃO 1)	Reagente 2 (SOLUÇÃO 2)
Tampão 1 pH 7,0 (50 – 100 mM)	Tampão 1 pH 7,0 (50 – 100 mM)
Coenzima A (coA) (< 5 mM)	2 O Enzima AcilcoA oxidase (ACOD) (>20 KU)
ATP (< 15 mM)	Peroxidase (POD) (>1 KU)
½ S Enzima AcilcoA Sintetase (ACS) (>3 KU)	Agente Colorimétrico (>0,5 mM)
4-Aminoantipirina (4-AAP) (>0,1 mM)	Composto N (2 – 30 mM)
Cofator M	Detergente 1
2 AO Ascorbato Oxidase	½ Composto F
-	Surfactante D

A formulação final foi submetida ao teste de estabilidade acelerada, de modo que os dados de amostra e soro são apresentados na Tabela 97 e a representação gráfica da reação no Gráfico 33.

Tabela 97 – Estabilidade Formulação Final de NEFA

Estabilidade Formulação final NEFA (mmol/L)	Geladeira (2 – 8°C)	7 dia de estufa 37°C
Fator de Calibração	17,2563	31,2653
NEFA Control 2 (0,76 - 1,14)	0,95	0,92
S1	1,43	1,44

Gráfico 33 – Reação da formulação final após armazenamento a 37° C



É possível observar que a formulação final de NEFA mantém a concentração da amostra e dos controles, porém continua decaindo a absorbância que deve ser ajustada para melhor atendimento dos parâmetros do kit no mercado.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, é possível concluir que o desenvolvimento de duas novas formulações para os kits de diagnóstico *in vitro* foram realizados de modo que a formulação de TBA foi concluída e a formulação de NEFA precisa de ajustes finais para melhorar o desempenho da estabilidade frente a temperatura.

Ambas as formulações possuem vantagens como a facilidade de manuseio, uma vez que são prontos para uso, fornecendo praticidade, não havendo necessidade de reconstituir ou diluir os reagentes. Também é possível empregar os kits nos analisadores automatizados, uma vez que sua proporção de reagentes, sendo 1 porção de Solução 2 para 3 porções de Solução 1 favorável.

A formulação final de cada kit apresentou ótimas características de desempenho, mostrando ser um método sensível, com uma faixa operacional ampla e maior que as disponíveis pelos concorrentes. As formulações também apresentaram ótima exatidão com os concorrentes G e B, que apresentam um produto de mesma metodologia para determinação de cada analito, permitindo, assim como os kits usados como referência, que as novas formulações sejam utilizadas em pacientes que apresentam quadros de doenças metabólicas ou hepatobiliares.

De modo geral, as formulações dos kits diagnósticos propostas apresentaram desempenho igual ou superior aos kits disponíveis no mercado, garantindo competitividade do produto no mercado e permitindo uma melhor avaliação de pacientes que apresentam doenças de cunho hepatobiliar ou metabólico. Além disso, é possível concluir que a formulação de TBA trata-se da primeira formulação nacional da metodologia para o analito e vai permitir redução de custos com importação. A formulação de NEFA já atende os parâmetros do mercado mas para a empresa em questão seria necessário ajustar a estabilidade em temperatura, para garantir o transporte ao redor do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLI, A. et al. Elevated non-esterified fatty acid and β -hydroxybutyrate in transition dairy cows and their association with reproductive performance and disorders: A meta-analysis. **Theriogenology**, v. 93, p. 99–104, 2017.
- ALMEIDA, Taís Corrêa et al. Avaliação da interferência de fatores pré-analíticos na mensuração dos metabólitos do óxido nítrico e determinação dos intervalos de referência para uma população saudável. 2014.
- ANDRADE, Nívea Nara N.; OLIVEIRA, Marcio V.; SOUZA, Claudio L. Procedures to minimize interference of hypertriglyceridemia in laboratory exams of lipemic samples in acute pancreatitis: a case report. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, n. 2, p. 103-106, 2016
- ANTONIS, A. Semiautomated Method for the Colorimetric Determination of Plasma Free Fatty Acids. **Journal of lipid research**, v. 6, n. 2, p. 307–312, 1965.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - Rdc Nº 36, De 26 De Agosto De 2015. **D.O.U**, v. Seção 1, n. 164, p. 43, 2015.
- ASRANI, Sumeet K. et al. Burden of liver diseases in the world. **Journal of hepatology**, v. 70, n. 1, p. 151-171, 2019.
- AZZULAY, M.M et al. Vitamina C. **Educação Médica Continuada**. Rio de Janeiro.2003
- BADDELA, V. S.; SHARMA, A.; VANSELOW, J. Non-esterified fatty acids in the ovary: Friends or foes? **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2020.
- BAIRD, J. D.; BLACK, M. W.; FAULKNER, D. E. Semi-automated method for the determination of free fatty acids in plasma. **Journal of clinical pathology**, v. 20, n. 6, p. 905–909, 1967.
- BASQUES, J. C. Fotometria e Padronização. Lagoa Santa - **MGLabtest Diagnóstica S.A**, , 2010.
- BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.
- CHEMICAL, A. et al. Revision of allowable limits of performance. p. 9, 2010.
- CHEN, Y.; SMITH, H.; TARR, H. Performance evaluation of a third party enzymatic total bile acid assay for use on the Roche Integra 800 analyzer. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 15, p. 1013–1014, 2015.
- CHILLIARD, Y.; BAUCHART, D.; BARNOUIN, J. Determination of plasma non-esterified fatty acids in herbivores and man: a comparison of values obtained by manual or automatic chromatographic, titrimetric, colorimetric and enzymatic methods. **Reproduction, nutrition, development**, v. 24, n. 4, p. 469–482, 1984.

CHRISTMASS, M. A. et al. A semiautomated enzymatic method for determination of nonesterified fatty acid concentration in milk and plasma. **Lipids**, v. 33, n. 10, p. 1043–1049, 1998.

CLSI document **EP17–A2**: evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures. 2012.

CLSI. Metrological Traceability and Its Implementation: A Report. CLSI document **EP32-R**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

CLSI, Interference Testing in Clinical Chemistry; approved guideline, 2nd ed, clsi document ep07-a2, wayne, pa, 2005.

CLSI. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. CLSI document **EP25-A**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

CONTRERAS, G. A.; SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 281–289, 2011.

CRUZEIRO, Joice Alves et al. Análise crítica da legislação brasileira referente ao registro de produtos para diagnóstico de uso in vitro com enfoque nos testes rápidos. 2015.

DIAS, V. C. Evaluation of the Randox® 5th generation enzymatic–colorimetric assay for quantitation of serum total bile acids on the INTEGRA® 800. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 13–14, p. 1106, 2012.

DIAZYME LABORATORIES. Total Bile Acids Assay Kit Configuration. v. 44, n. 0, p. 8475531, 2010.

DENNEY, Jerry W. Assay for total and direct bilirubin. **U.S. Patent n. 6,326,208**, 4 dez. 2001.

DOLE, V. P. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. **The Journal of clinical investigation**, v. 35, n. 2, p. 150–154, 1956.

DOLE, V. P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 235, n. 9, p. 2595–2599, 1960.

ELPHICK, M. C. Modified colorimetric ultramicro method for estimating Nefa in serum. **Journal of clinical pathology**, v. 21, n. 5, p. 567–570, 1968.

ENGERT, Richard; TURNER, Michael D. Problems in the measurement of bile acids with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. **Analytical Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 399–407, 1973.

FAUSA, O.; SKALHEGG, B. A. Quantitative determination of bile acids and their conjugates using thin layer chromatography and a purified 3 α hydroxysteroid dehydrogenase. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 3, p. 249–254, 1974.

FEDERAL, U.; MARIA, D. E. S. PRÉ-ANALÍTICOS NA MENSURAÇÃO DOS

METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO E. p. 1–80, 2014.

FERNANDES, J. L. N.; WOLLINGER, W.; GARRIDO, B. C. Rastreabilidade em medicina laboratorial: um estímulo global para resultados exatos no cuidado com o paciente. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 4, p. 402–411, 2019.

FLEMING, J. J.; SWAMINATHAN, S. Interference in autoanalyzer analysis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 16, n. 1, p. 22-30, 2001.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FRANCESCHINA, S. C. Ácidos Biliares: Metabolismo E Aplicações Diagnósticas. n. Figura 1, p. 9, 2015.

FRAYN, K. N. Plasma non-esterified fatty acids: Why are we not measuring them routinely? **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 413–414, 2005.

GEVIT, G. DE P. D. DE USO IN VITRO-; ANVISA. Manual para regularização de produtos para diagnóstico de uso in vitro na anvisa. p. 108, 2012.

GIANFREDA, Liliansa; SCARFI, Maria Rosaria. Enzyme stabilization: state of the art. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 97-128, 1991.

GUIDELINE, ICH Harmonized Tripartite et al. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (SOLUÇÃO 1), v. 1, n. 20, p. 05, 2005.

HANSON, N. Q.; FREIER, E. F. Effect of protein on the determination of total bile acids in serum. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 171–175, 1983.

HUGHES, Andrew EO; JACKUPS JR, Ronald. Clinical Decision Support for Laboratory Testing. **Clinical chemistry**, v. 68, n. 3, p. 402-412, 2022.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and MethodologyINTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMA, 2005.

INMETRO/IPQ. Vocabulário Internacional de Metrologia – Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. JCGM 200:2008, v. 1a Edição, p. 90, 2009.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, **Oxford** (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

ISSO VIM DGUIDE 99999. International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM). **International Organization for Standardization**, 2004

JEBENS, E.; SEJERSTED, O. M. Enzymatic microdetermination of plasma and serum free fatty acids. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 52, n. 7, p. 717–724, 1992.

JI, J. Z; MENG, Q. H. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays.. **Clinica Chimica Acta** V. 412, p. 1550-1553, 2011.

JOHNSON, M. M.; PETERS, J. P. Technical note: an improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. **Journal of animal science**, v. 71, n. 3, p. 753–756, 1993.

JUNIOR, Ozelito. P. A. et al. Validação de métodos analíticos. Cad. Pesq. São Luis v.12 p 116-131. 2001

K, G.; K, G. Determination of Bilirubin. **Practical Biochemistry**, p. 109–109, 2011.

KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: Time for a reevaluation. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2441–2449, 2011.

KAZMIERCZAK, S. C. et al. Bilirubin in Newborns : Comparison with HPLC and an Automated Diazo Method. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 1096–1097, 2000.

KRUKOVSKY, V. N.; KNAYSI, G. A New Colorimetric Method for the Determination of Free Fatty Acids in Milk Fat. **Journal of Dairy Science**, v. 25, n. 8, p. 659–661, 1942.

LIFE, B.; PRODUCTS, S. Non-Esterified Fatty Acids (NEFA) Assay Kit Manual. 2014.

LIU, Y. et al. Detection technologies and metabolic profiling of bile acids: A comprehensive review. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.

LOMBARDO, Márcia. Estabilização e conservação de formulações farmacêuticas e cosméticas: aspectos de qualidade e de segurança. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, n. 7, p. 43-55, 2020.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018.

MARCELLIN, Patrick; KUTALA, Blaise K. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver International*, v. 38, p. 2-6, 2018.

MARTINELLO, Flávia; SILVA, Edson Luiz da. Interferência do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos: estudos in vivo e in vitro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 323-334, 2003.

MARTÍNEZ-SUBIELA, Silvi; CERÓN, Jose J. Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 7, p. 625, 2005.

MATSUBARA, C. et al. A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase. **Analytical Biochemistry**, v. 130, n. 1, p. 128–133, 1983.

MCART, J. A. A. et al. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. [s.l.] **Elsevier Ltd**, 2013. v. 198

Measurement of Total Bile Acids. n. April, 2014.

MENG, Qing H. et al. Interference of ascorbic acid with chemical analytes. **Annals of clinical biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 475-477, 2005.

MIKSA, I. R.; BUCKLEY, C. L.; POPPENG, R. H. Detection of nonesterified (free) fatty acids in bovine serum: Comparative evaluation of two methods. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 2, p. 139-144, 2004.

MOHAN, Chandra. Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems, p. 20-21, 2003.

MONTE, M. J. et al. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 7, p. 804-816, 2009.

OLIVEIRA, C. A. DE; MENDES, M. E. **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática - Volume I**. 2010

OLIVEIRA, C. A. DE; MENDES, M. E. **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática - Volume III**. 2012

PARK, Chiwook; RAINES, Ronald T. Quantitative analysis of the effect of salt concentration on enzymatic catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 46, p. 11472-11479, 2001.

PERIS, F. et al. Comparison of two commercial kits for the enzymatic determination of nonesterified fatty acids in goat serum. **Small Ruminant Research**, v. 26, n. 1-2, p. 181-187, 1997.

PRECEDENCE RESEARCH (Canada/India). In Vitro Diagnostics Market (By Product Type: Reagents, Instruments, Services; By Technology: Hematology, Molecular Diagnostics, Immunology, Coagulation, Clinical Chemistry, Microbiology, Others; By Application: Diabetes, Cardiology, Nephrology, Infectious Disease, Oncology, Drug Testing, Autoimmune Diseases, Others; By End Use: Laboratory, Hospital, Home Care, Others) - **Global Market Size, Trends Analysis, Segment Forecasts, Regional Outlook 2020 - 2027**. 2020. Disponível em: <https://www.precedenceresearch.com/in-vitro-diagnostics-market>. Acesso em: 05 mai. 2022

QURESHI, M. Y.; SMITH, S. M.; MURPHY, G. M. Colorimetric enzymatic measurement of serum total 3 α -hydroxy bile acid concentrations without extraction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 317-320, 1984.

ROHR, U. P. et al. The value of in vitro diagnostic testing in medical practice: A status report. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1-16, 2016.

SARAFIDIS, P. A.; BAKRIS, G. L. Non-esterified fatty acids and blood pressure elevation: A mechanism for hypertension in subjects with obesity/insulin resistance? **Journal of Human Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 12-19, 2007.

SHARMA, K. Review on bile acid analysis. **Int J Pharm**, v. 3, n. 2, p. 28-34, 2012.

SHIMIZU, S. et al. Enzymatic determination of serum-free fatty acids: A colorimetric

method. **Analytical Biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 193–198, 1980.

SILVA, Carla et al. Practical insights on enzyme stabilization. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 335-350, 2018.

SILVA, C. R.; SIMONI, J. DE A. Avaliação da capacidade tamponante - um experimento participativo. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 405–409, 2000.

SILVA, Elisangela Teixeira da et al. Estabilização de proteases para aplicação tecnológica. 2013.

STERN, I.; SHAPIRO, B. A rapid and simple method for the determination of esterified fatty acids and for total fatty acids in blood. **Journal of clinical pathology**, v. 6, n. 2, p. 158–160, 1953.

SUN DIAGNOSTICS, LLC: Assay Interference: A Need for Increased Understanding and Testing. 2010

SUMITA, N. M. et al. Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial (SBPC/ML): fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais. 1. ed. Baruerí - **SP: Editora Manole Ltda.**, 2018.

SUZUKI, K.; TAMAOKI, B. I. In vitro metabolism of testosterone in seminal vesicles of rats. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 5, n. 3, p. 249-256, 1974.

UPPADA, Vanita; BHADURI, Sumit; NORONHA, Santosh B. Cofactor regeneration—an important aspect of biocatalysis. **Current science**, p. 946-957, 2014.

VAN HOECK, V. et al. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: A possible pathway to subfertility? **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, p. 19–29, 2014.

WESTGARD, J. Spanish Society of Clinical Chemistry and Molecular Pathology (SEQC) table of Desirable Quality Specifications based on Biological Variation.2004

WINSTEN, Seymour; CEHELYK, Barbara. A rapid micro diazo technique for measuring total bilirubin. **Clinica Chimica Acta**, v. 25, n. 3, p. 441-446, 1969.

ZHANG, Fan et al. The effect of reducing agent DTT on pasting, hydration and microstructure properties of foxtail millet. **Journal of Cereal Science**, v. 95, p. 103044, 2020.

ZHANG, G. H. et al. An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 1, p. 87–92, 2004.

ZHOU, W. et al. Gold Nanoparticles for in Vitro Diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10575–10636, 2015.

3 α -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE [3 α -HSD II]. **ASAHIKASEI**. Disponível em: <https://www.asahi-kasei.co.jp/shindan/en/enzyme/enzyme-technical-data/t-58.html>