

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

ELAINE LILIAN KRAUSE COUTO

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE DA FITASE POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO - 2018

ELAINE LILIAN KRAUSE COUTO

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE DA FITASE POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

TOLEDO
2018

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

ELAINE LILIAN KRAUSE COUTO

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE DA FITASE POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus Toledo*, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

Prof^a. Dr^a. Solange Maria Cottica

MSc. Rafael Davis

Toledo, 21 novembro de 2018

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram em mim desde o começo e me apoiaram, me dando forças para seguir em frente. Principalmente a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Clayton pela compreensão e paciência, e pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória.

Agradeço aos meus queridos pais, Josefa e Vili (in memoria), de vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida.

Ao Heberton, meu esposo, pela proximidade, companheirismo, motivação transmitida e por todo auxílio em diferentes aspectos.

Aos meus filhos Leonardo, Rafaella e Guilherme, com vocês aprendi o sentido real da vida, pelo que realmente lutar, batalhar, ceder e simplesmente abdicar.

As minhas irmãs e meus irmãos: Elizabethe, Eni, Eliete, Édder e Émerson pelo carinho, amor e amizade.

Ao meu amigo e minhas amigas de trabalho: Alex, Bruna, Daiane, Mariana e especialmente Damaris, pela motivação e por estarem sempre dispostas a me ajudar.

A Empresa Tectron Tecnologia e Inovação, pelo apoio e colaboração durante o Projeto de Conclusão de Curso.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À Deus pela condução e todas as bênçãos recebidas.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

KRAUSE, Elaine Liliam. **Validação da metodologia para a determinação da atividade da fitase por espectrofotometria UV-VIS.** 2018. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Tecnólogo em Processos Químicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

Enzimas fitase possuem a propriedade de romper a ligação do fósforo orgânico ligado aos sais do ácido fítico, tornando-o disponível biologicamente. Nos vegetais, cerca de dois terços do fósforo encontram-se ligados aos fitatos. O fosfato inorgânico liberado é determinado por formar um complexo amarelo com a reação acídica molibdato/vanadato. O complexo é mensurado com o comprimento de onda de 415 nm e o fosfato inorgânico é quantificado pela curva padrão do fosfato. O método aplicado mede a atividade das fitases (FTU) pela quantidade de micromoles de fósforo inorgânico liberado do fitato de sódio, em um minuto, a uma temperatura de 37°C e em pH 5,5. (1 FTU= 1µmol P inorgânico). Validação é a realização de um estudo, comprovado que garante seja qual for o método, processo, equipamento, material, atividade ou sistema confiável e evidente, seja favorável aos resultados pretendidos. Este estudo envolveu a verificação de figuras de mérito (linearidade, sensibilidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez) do método utilizado para determinar a atividade da fitase. Avaliou-se o padrão de fitase Sigma®, matéria-prima de fitase e rações com inclusão de fitase. A curva de calibração foi construída com padrão dihidrogenofosfato de potássio (0,10-2,50 µmol/mL), em que a equação linear média obtida foi $y = 0,3694x - 0,0138$. A atividade de fitase mostrou-se instável para variações de pH, tempo e temperatura de reação, mantendo-se estável quando variou o volume de substrato. O método aplicado neste estudo apresentou linearidade, precisão, sensibilidade analítica e limites de detecção e quantificação adequados, em uma ampla faixa de concentração, tendo resultados próximos aos descritos no método.

Palavras-chave: figuras de mérito, fitase, ácido fítico.

ABSTRACT

KRAUSE, Elaine Liliam. **Validation of the methodology for the determination of phytase activity by UV-VIS spectrophotometry**. 2018. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Tecnólogo em Processos Químicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2018.

Phytase enzymes have the property of breaking the binding of the organic phosphorus bound to the phytic acid salts, making it available biologically. In plants, about two-thirds of phosphorus is bound to phytates. The released inorganic phosphate is determined by forming a yellow complex with the acidic molybdate / vanadate reaction. The complex is measured at the wavelength of 415 nm and the inorganic phosphate is quantified by the standard phosphate curve. The applied method measures the phytase activity (FTU) by the amount of micromoles of inorganic phosphorus released from sodium phytate in one minute at a temperature of 37 ° C and at pH 5.5. (1 FTU = 1 μmol inorganic P). Validation is the performance of a study, proven that guarantees whatever method, process, equipment, material, activity or system is reliable and evident, is favorable to the intended results. In this study was determined figures of merit (linearity, sensitivity, limits of detection (LD) and quantification LQ), precision, accuracy and robustness) of the method used to determine the phytase activity. In the study the phytase Sigma® standard, phytase raw material and phytase inclusion rations were evaluated. The calibration curve was constructed with standard potassium dihydrogenphosphate (0.10-2.50 μmol / mL), where the mean linear equation obtained was $y = 0.3694x - 0.0138$. Phytase activity was unstable for variations in pH, time and reaction temperature, and remained stable when the volume of substrate varied. The method applied in this study presented linearity, precision, analytical sensitivity and adequate detection and quantification limits, over a wide concentration range, with results close to those described in the method.

Keywords: figures of merit, phytase, phytic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do fitato formando complexo com nutrientes	15
Figura 2. Reação de hidrólise do fitato pela enzima.....	17
Figura 3. Curva de calibração de padrão dihidrogenofosfato de potássio.....	29
Figura 4. Curva de calibração de dihidrogenofosfato de potássio ISO (2008)	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de fósforo fítico em gramas de ingredientes	16
Tabela 2. Variação de parâmetros do método para avaliação da figura de mérito robustez.....	32
Tabela 3. Resultados das figuras de mérito para o método aplicado (30024 – ISO (2008)).....	34

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

T	temperatura (°C)
t	tempo (s, min ou h)
V	volume de solução (L ou mL)
λ	comprimento de onda
pH	Potencial de Hidrogênio
®	marca registrada
μmol	micromol
mmol	milimol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo Geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
1.2	JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Sal misto de ácido fítico ou fitato de sódio	16
2.2	Fitase.....	18
2.3	Métodos para determinação de atividade de fitase	19
2.3.1	No método de Fiske-Subbarow	19
2.3.2	No método de ensaio Cooper-Gowing	19
2.3.3	No método de descrito por Engelen em AOAC	19
2.4	Validação.....	20
2.4.1	Especificidade/Seletividade.....	20
2.4.2	Linearidade.....	21
2.4.3	Sensibilidade	21
2.4.4	Precisão	21
2.4.5	Recuperação	21
2.4.6	Robustez	22
2.4.7	Limite de detecção	22
2.4.8	Limite de quantificação.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Amostras	23
3.2	Reagentes	23
3.3	Equipamentos	23
3.4	Metodologias de determinação da atividade enzimática da fitase por espectrofotometria.....	23
3.4.1	Solução curva-padrão de dihidrogenofosfato de potássio.....	24
3.4.2	Solução substrato.....	24

3.4.3	Preparação da solução amostra teste	24
3.4.4	Determinação da reação enzimática da fitase.....	25
3.4.5	Cálculo da atividade de fitase.....	25
3.4.6	Fluxograma da determinação da atividade de fitase	27
3.5	Validação.....	28
3.5.1	Linearidade do padrão primário.....	28
3.5.2	Limite de detecção e de quantificação	28
3.5.3	Precisão	28
3.5.4	Recuperação	28
3.5.5	Robustez	29
3.5.6	Análise estatística	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5	CONCLUSÃO	37
6	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Os fitatos de sódio são sais do ácido fítico (mioinositol do ácido hexafosfórico – $C_6H_{18}O_{24}P_6$) que caracteriza um grupo complexo de elementos naturais que ocorrem especialmente em leguminosas e cereais, e que podem alterar suas propriedades funcionais e nutricionais (BENEVIDES et al. 2011). O fitato presente nos alimentos é considerado um fator antinutricional pois forma complexos insolúveis com minerais e proteínas, diminuindo a sua biodisponibilidade (TORREZAN, 2010).

O fósforo contido em alimentos de origem vegetal é pouco disponível, pois está ligado ao ácido fítico na forma de fitato e a quantidade de enzima fitase nestes alimentos é baixa, resultando no aproveitamento de cerca de um terço do fósforo total destes alimentos. Em consequência, há uma grande excreção de fósforo por animais monogástricos em águas superficiais, que pode alcançar o lençol freático, causando um grave problema de poluição ambiental que pode ser minimizado com o uso de uma enzima fitase exógena (LELIS et al, 2009).

A enzima fitase hidrolisa o ácido fítico em mioinositol e fosfato inorgânico (MULLANEY, 2003). Nos grãos de cereais, leguminosas e oleaginosas, o fitato constitui a principal forma de armazenamento de fósforo, sendo também a fonte natural de fósforo na alimentação animal (REDDY, 1982). Nos alimentos de origem vegetal o teor de ácido fítico varia de 0,5 a 6,0 %, o que corresponde 50,0 a 90,0% do total de fósforo (NOLAN & DUFAFIN, 1987).

O uso de enzimas nas rações, melhora a digestibilidade e disponibilidade de certos nutrientes para os animais, principalmente o fósforo, nitrogênio, cálcio, cobre e zinco (CAMPESTRINI, 2005).

A metodologia de quantificação da atividade enzimática da fitase é realizada sob condições específicas de temperatura e pH, sendo incubada com o fitato de sódio. Durante a incubação, a fitase liberta fosfato inorgânico a partir do fitato. A incubação é interrompida por adição do reagente ácido molibdato/metavanadato, e um complexo amarelo é produzido. A concentração é determinada espectrofotometricamente em 415 nm.

Nesse contexto, destacam-se as metodologias espectrofotométricas pelo Ultravioleta-Visível, as quais são de baixo custo, fáceis de realizar, rápidas e aplicáveis ao uso de rotina laboratorial.

Para que uma metodologia possa ser usada rotineiramente, é importante fazer a validação da mesma, ou seja, demonstrar que os métodos de ensaio utilizado apresentam resultados que permitem avaliar objetivamente a qualidade do ingrediente. Assegurando que os requisitos para a aplicação ou o uso específico pretendido foram atendidos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar a validação da metodologia para determinação espectrofotométrica da atividade enzimática da fitase.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a atividade da fitase;
- ✓ Determinar as figuras de mérito: exatidão, precisão, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.
- ✓ Comparar os resultados obtidos com os descritos na literatura.

1.2 JUSTIFICATIVA

Para indústria de alimentação animal a inclusão da enzima fitase em rações aumenta a biodisponibilidade do fósforo e de outros nutrientes, aumentando o aproveitamento e obtendo menor custo das dietas. Nesse sentido, há a necessidade de determinar a quantidade de fósforo liberado para determinar a atividade da fitase em rações e avaliar se a quantidade de enzima adicionada é adequada para a concentração de ácido fítico existente.

Uma vez que resultados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis, é preciso garantir que um método

analítico gere informações confiáveis sobre a amostra. Para isso ele deve passar por avaliação, que é denominada de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece evidências objetivas de que os métodos são adequados para o uso desejado.

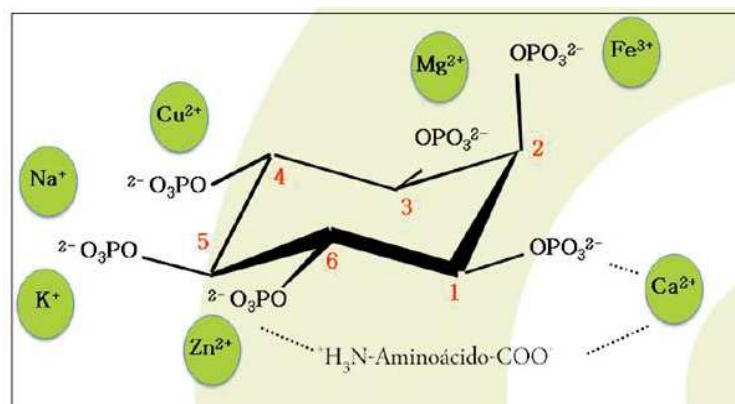
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sal misto de ácido fítico ou fitato de sódio

O termo fitato refere-se ao sal misto de ácido fítico (mioinositol hexafosfato) (SELLE e RAVINDRAN, 2007). O ácido fítico (mioinositol 1,2,3,4,5,6-hexaquis di-hidrogenofosfato) é a principal forma do acúmulo de fósforo, este compreende entre 1 a 5% no total da massa dos cereais, leguminosas, oleaginosas e castanhas (VATS e BANERJEE, 2004).

Durante o período de amadurecimento dos grãos, o fitato acumula-se rapidamente nas sementes de leguminosas e no óleo das sementes no cristal globóide dentro dos corpos protéicos (ZHOU e ERDMAN, 1995). Assim, o ácido fítico bloqueia a absorção de minerais, tais como: ferro, zinco e cálcio, atuando como fator antinutricional, a ligação resulta em sal insolúvel com fraca biodisponibilidade de minerais (ZHOU e ERDMAN, 1995). A Figura 1 mostra a estrutura do fitato de sódio formando complexos com ingredientes.

Figura 1. Estrutura do fitato formando complexo com nutrientes



Fonte: (Broz, 1994)

O ácido fítico é uma maneira utilizada pelas plantas para acumular o fósforo. Porém, está indisponível na quantidade integral em ingredientes, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Teor de fósforo fítico em gramas de ingredientes

Ingredientes	P total (%)	P fítico (%)	P fítico / P total (%)
Milho	0,28	0,20	71,4
Trigo	0,37	0,24	64,9
Farelo de Trigo	0,85	0,55	64,7
Farelo de Arroz	1,50	1,28	85,3
Aveia	0,27	0,22	81,5
Farelo de Soja	0,65	0,38	85,5
Farelo de Algodão	0,97	0,75	77,3
Farelo de Canola	1,07	0,65	60,7
Farelo de Amendoim	0,63	0,50	79,4

Fonte: NRC (1994).

Segundo Zhou et al. (1992), durante o período de estocagem, fermentação, germinação, processamento e digestão dos grãos e sementes, acontece a desfosforilação parcial do ácido fítico produzindo pentafofato (IP5), tetrafofato (IP4), trifosfato (IP3) e, provavelmente, inositol difosfato (IP2) e monofosfato (IP1), pela atuação das fitases endógenas.

O ácido fítico quando hidrolisado a mioinositol e ácido fosfórico é visto em vários biosistemas como um processo metabólico importante. O estudo em relação a produção de fitase e seu emprego como um meio de diminuir a adição de fósforo inorgânicos na alimentação, contribui para redução do resíduo de fósforo, gerado pela excreção fecal (PANDEY, et al., 2001).

O ácido fítico é um quelante de micronutrientes, sendo um inibidor para os seres humanos, as aves e para os animais monogástricos, que são incapazes de metabolizar ácido fítico, devido à falta de nível suficiente de atividade enzimática para degradar o fitato no seu trato digestivo (WODZINSKI e ULLAH, 1996).

Alimentos como os cereais, legumes, sementes e frutos, tem como fonte o ácido fítico, esses alimentos representam cerca de 40% a 60% da ingestão calórica humana em países em desenvolvimento (SCHLEMMER et al., 2009).

Segundo Vats e Banerjee (2004), o ácido fítico e intermediários de inositol foram entrelaçados em resposta de glicose no sangue, redução do colesterol e

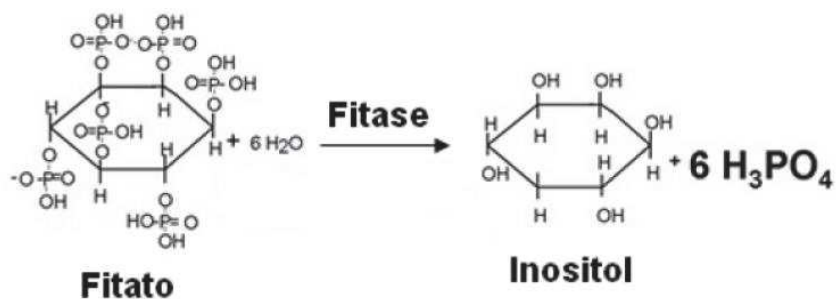
triacilgliceróis, na formação de tumores, no tratamento da doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose múltipla.

2.2 Fitase

A enzima fitase ou mioinositol-hexaquisfosfato fosfohidrolase (EC 3.1.3.8) promove a hidrólise da molécula de liberação de fosfato do fitato, que melhora a biodisponibilidade em alimentos vegetais para humanos, que ainda são consideradas de grande valor no melhoramento da qualidade nutricional de ração aumentando a quantidade de fosfato disponível (PANDEY, et al., 2001).

Segundo Newman (1991), a enzima fitase como catalisadora em uma reação, quando em solução contendo o complexo mio-inositol-hexafosfato dissolvido em água, é dissociada gerando como produtos os compostos mioinositol-penta, tetra, tri, di e monofosfato somado ao ortofosfato inorgânico. Na figura 2, demonstra a hidrólise do fitato deixando disponível o fosfato inorgânico.

Figura 2. Reação de hidrólise do fitato pela enzima fitase



Fonte: Enviropig™, 2011 modificado

A Comissão da União Internacional de Bioquímica distingue Nomenclatura das Enzimas dois tipos de fitase: 3-fitase e 6-fitase. Esta classificação baseia-se no primeiro grupo fosfato atacado pela enzima. A 3-fitase é típica para microorganismos e 6-fitase para plantas (VATS e BANERJEE, 2004).

A fitase é distribuída nos tecidos de plantas e animais e que é sintetizada por algumas espécies de bactérias e fungos. A adição desta enzima na dieta dos animais é essencial para promover uma maior absorção de fósforo e também contribui para uma diminuição nos níveis de fósforo excretados pelos animais,

reduzindo assim a poluição causada por excesso de fósforo no ambiente (VOHRA, et al., 2001).

2.3 Métodos para determinação da atividade de fitase

Existem vários métodos para estimativa de fosfatos presentes em ácido fítico, para determinação da atividade de fitase, porém são três os métodos mais usados: método de Cooper-Gowing, Fiske-Subbarow e Engelen, através da espectrofotometria (UV).

2.3.1 Método Fiske-Subbarow

Baseia-se na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio em meio ácido, resultando em um complexo fosfomolibdato de cor azul, quantificado espectrofotometricamente a 600 nm, e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração do fósforo (FISKE, et al., 1925).

2.3.2. Método Cooper-Gowing

Conforme Cooper e Gowing (1983), a determinação da atividade de fitase ocorre pela desfosforização do fitato, usualmente baseado na cor que é formada na reação do molibdato com o fósforo liberado do fitato. Este método é impreciso quando esta atividade é medida em amostras contendo fosfatos solúveis em água, porque a alta quantidade de fósforo diminui a cor formada pela hidrolise enzimática do fitato.

2.3.3 Método descrito por Engelen

No método de Engelen (1994), a enzima fitase libera fosfato a partir do substrato de mioinositol-hexafosfato (fitato). O fosfato inorgânico liberado é determinado através da formação de um complexo amarelo com um reagente ácido molibdato / vanadato. O complexo amarelo é medido a um comprimento de onda de 415 nm e o fosfato inorgânico liberado é quantificado com uma curva padrão de fosfato. Mede-se a atividade das fitases (FTU) pela quantidade de micromoles de

fósforo inorgânico liberado do fitato de sódio, em um minuto, a uma temperatura de 37°C e em pH 5,5. (1 FTU= 1µmol P inorgânico). Segundo método da ISO (2002), a enzima fitase é incubada com o fitato de sódio (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) sob condições específicas de temperatura e pH. Durante a incubação, a fitase liberta fosfato inorgânico a partir da fitato. A incubação é interrompida por adição do reagente ácido molibdato / metavanadato, e um amarelo vanadomolibdofosfórico complexo colorido é produzido. A concentração desta cor complexo é determinada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 415 nm.

2.4 Validação

Validação é um ato documentado que assegura que qualquer método, processo, equipamento, material, atividade ou sistema efetivamente e consistentemente leva aos resultados atendidos (Resolução RDC nº17/2010).

A validação de metodologias analíticas, tem como objetivo evidenciar que os requisitos de desempenho avaliados serão atendidos. É um estudo experimentalmente testado e documentado (MAPA, 2011).

Quesito da maioria dos controles de qualidade consolidados, a validação de metodologias analíticas segue orientações internacionais aplicáveis aos laboratórios, sendo resultados aprovados, dentro de uma linguagem coletiva. Processo básico de controle de qualidade de um laboratório que visa garantir a obtenção de resultados com confiabilidade, comparabilidade e rastreabilidade (BICHARA, R.; PELLEGRINO Missaglia, A.; 2011).

Os parâmetros de execução do método geralmente avaliados experimentalmente são:

- Especificidade/Seletividade;
- Linearidade (curva de calibração);
- Sensibilidade
- Precisão;
- Recuperação;
- Robustez;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;

2.4.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade do método analítico é a competência de quantificar com acurácia, o analito de importância em presença de outros elementos ou componentes presentes na matriz da amostra. Enquanto, a seletividade corresponde à eficiência em identificar substâncias, este parâmetro é um passo importante no momento do desenvolvimento e validação do método analítico e posteriormente no uso do método (GRANGEIRO, 2004).

2.4.2 Linearidade

A linearidade é capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2004). A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração para a amostra de ensaio. Sempre que possível, o valor esperado para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva de calibração (MAPA, 2011).

2.4.3 Sensibilidade

A sensibilidade numericamente é determinada pelo coeficiente angular da curva de calibração. Onde, considera o quanto da medida observada é aumentada após a adição de uma unidade em concentração na amostra de interesse (VALDERRAMA et al, 2009).

Contudo, essa medida não é capaz de informar as diferenças de concentrações que podem ser detectadas. Assim, foi introduzida uma nova figura de mérito denominada **sensibilidade analítica**, que é definida como a razão entre a inclinação da curva analítica e o desvio padrão do sinal analítico em uma determinada concentração. A sensibilidade analítica leva em consideração o ruído presente nos sinais de resposta (SKOOG et al, 2008).

2.4.4 Precisão

Precisão é a capacidade de o método analítico reproduzir um resultado, é estabelecido a partir da análise da amostragem de uma amostra. Com os valores obtidos, são calculados a média e o desvio padrão (DP), assim delimitando o Coeficiente de Variação (CV), expressos em porcentagem (United States Pharmacopeia XXV, 2000).

O parâmetro precisão pode ser expresso de três maneiras: como a repetitividade, concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação; a precisão intermediária, onde ocorre a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias, com analistas e/ou equipamentos diferentes; e da reprodutibilidade, através da realização de ensaios interlaboratoriais, avalia-se a reprodutibilidade (MAPA, 2011).

2.4.5 Recuperação

A recuperação mede a conformidade do método analítico, pode ser enunciado como o grau de concordância entre a média de um número de valores medidos e valor padrão. A determinação da recuperação deve ser analisada utilizando um padrão certificado (MAPA, 2011).

2.4.6 Robustez

A determinação da robustez pode ser averiguada com estudo do método e é analisado durante o desenvolvimento do método analítico, assim se houver alguma variação dos parâmetros analíticos, estes deverão ser controladas e prevenções devem ser incluídas no decorrer do processo. Cálculos estatísticos são aplicados para verificar alteração em diversas modificações do método (ANVISA, 2004).

2.4.7 Limite de Detecção

O Limite de Detecção é a quantidade mínima detectável do analito presente em uma amostra, entretanto não precisa ser mensurado, conforme análises realizadas. O limite de detecção é estabelecido pelo menor nível detectável, em soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, por meio do ensaio analítico (ANVISA-RE 899/2003).

2.4.8 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação é a quantidade mínima do analito, presente em uma amostra que pode ser determinada a partir das concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível com exatidão e precisão aceitável (ANVISA, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A determinação da atividade da fitase foi realizado pelo Método oficial ISO/DIS 30024, da International Organization for Standardization (ISO, 2008), o qual uma unidade de fitase (U) é definida como a quantidade que liberta 1 μmol de fósforo inorgânico por minuto a partir de fitato de sódio 7,5 mmol L^{-1} a 37°C e pH 5,5.

3.1 Amostras

As amostras foram cedidas pela Empresa Tectron Tecnologia e Inovação, do município de Toledo-Paraná. Sendo: enzima Fitase matéria prima, produto com inclusão da enzima Fitase e o Padrão Fitase da marca Sigma®. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento desta mesma empresa, as amostra foram homogeneizado, moído e armazenado em temperatura de 25 °C.

3.2 Reagentes Utilizados

Os reagentes utilizados foram: padrão de fitase (Sigma®), fitato de sódio (Sigma®), acetato de sódio tri-hidratado (Synth®), os demais: ácido acético glacial (Neon), ácido nítrico (Química Moderna), dihidrogenofosfato de potássio monobásico (Neon), hidróxido de amônio (Neon), metavanadato de amônio (Neon), molibdato de amônio (Neon) e Polisorbato 20 (tween 20%; Neon), todos de grau analítico.

3.3 Equipamentos

Na determinação da atividade enzimática foi utilizado, agitador de tubos Phoenix, balança analítica (Shimadzu), espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu), banho ultrassônico (Tecnal), centrifuga marca (Excelsa), medidor de pH (Tecnal), estufa de secagem e esterilização (Tecnal) e banho maria (Tecnal).

3.4 Solução Curva-Padrão de dihidrogenofosfato de potássio

Foi preparada a solução estoque de dihidrogenofosfato de potássio monobásico anidro 50,0 mmol L^{-1} . A partir desta solução foram preparadas 5

soluções utilizando tampão de acetato de sódio/ ácido acético $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5 como diluente, cujas concentrações variaram de $0,10\text{-}2,50 \text{ } \mu\text{mol/mL}$. Alíquotas de $0,2 \text{ mL}$ de cada diluição foram transferidas para tubos cônicos, seguido da adição de $1,8 \text{ mL}$ de solução tampão de acetato de sódio/ ácido acético $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5. Após homogeneização, foram adicionados 4 mL de solução de fitato de sódio $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e adicionados 4 mL da solução de Stop molibdato/metavadata (solução de molibdato de amônio 100 g L^{-1} com heptavanadato de amônio $2,35 \text{ g L}^{-1}$ e ácido nítrico 1:2, na proporção 1:1:2), homogeneizado e em temperatura ambiente descansar por 10 minutos, os tubos cônicos foram centrifugados por 3 minutos a 3600 rpm . As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 415 nm .

Para as medidas de absorvância foi preparado um branco apenas com os reagentes. A curva de calibração foi obtida a partir da medida da absorvância das soluções de referência, relacionando a absorvância medida versus a concentração.

3.4.1 Solução substrato

Preparou uma solução padrão de fitato de sódio $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão de ácido acético/acetato de sódio com pH ajustado em 5,5.

3.4.2 Preparação da solução amostra teste

A quantidade de material a ser utilizada na análise foi determinada de acordo com a quantidade de fitase (U g^{-1}) presente na amostra. Para a matéria prima foi pesado $0,1 \text{ g}$ para 250 mL de solução tampão acetato de sódio/ácido acético com tween 20 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5, e $3,0 \text{ g}$ para as demais amostras, com adição de fitase para 100 mL de solução tampão acetato de sódio/ácido acético com Tween 20 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5. As soluções foram colocadas em banho ultrassônico durante 30 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por 10 min em 3600 rpm .

3.4.3 Determinação da reação enzimática da fitase

Para as amostras foi pipetado 1 mL da solução tampão de acetato de sódio/ácido acético $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ com tween (acetato de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ com 1 mL de Tween 10 %) pH 5,5, para os tubos de ensaio e adicionado 1 mL de amostra em

cada tubo. Em seguida a mistura foi agitando em vortex e levado para o banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. Após, foi adicionado 4 mL da solução de fitato de sódio 7,5 mmol L⁻¹, agitando-se e levando novamente para o banho-maria em 37°C por 30 minutos. Para os brancos da análise foram adicionados 4 mL da solução de Stop (solução de molibdato de amônio 100 g L⁻¹ com heptavanadato de amônio 2,35 g L⁻¹ e ácido nítrico 1:2, na proporção 1:1:2), agitou e deixou por 30 minutos em temperatura ambiente. Após as amostras foram retiradas do banho-maria, adicionou 4 mL da solução de parada (molibdato/metavanadato de amônio). Agitou e aguardou por 10 min, para começar a centrifugação. Nas amostras consideradas (brancos) foi adicionado 4 mL da solução de fitato de sódio 7,5 mmol L⁻¹. As soluções foram agitadas, sendo posteriormente mantidas em repouso por 10 min, para então serem centrifugadas por 3 minutos a 3.600 rpm. A leitura da absorbância foi realizada com o sobreandante da mistura, em espectrofotômetro UV-VIS, em 415 nm. As determinações foram realizadas com 4 replicatas para as amostras e três replicatas para os brancos.

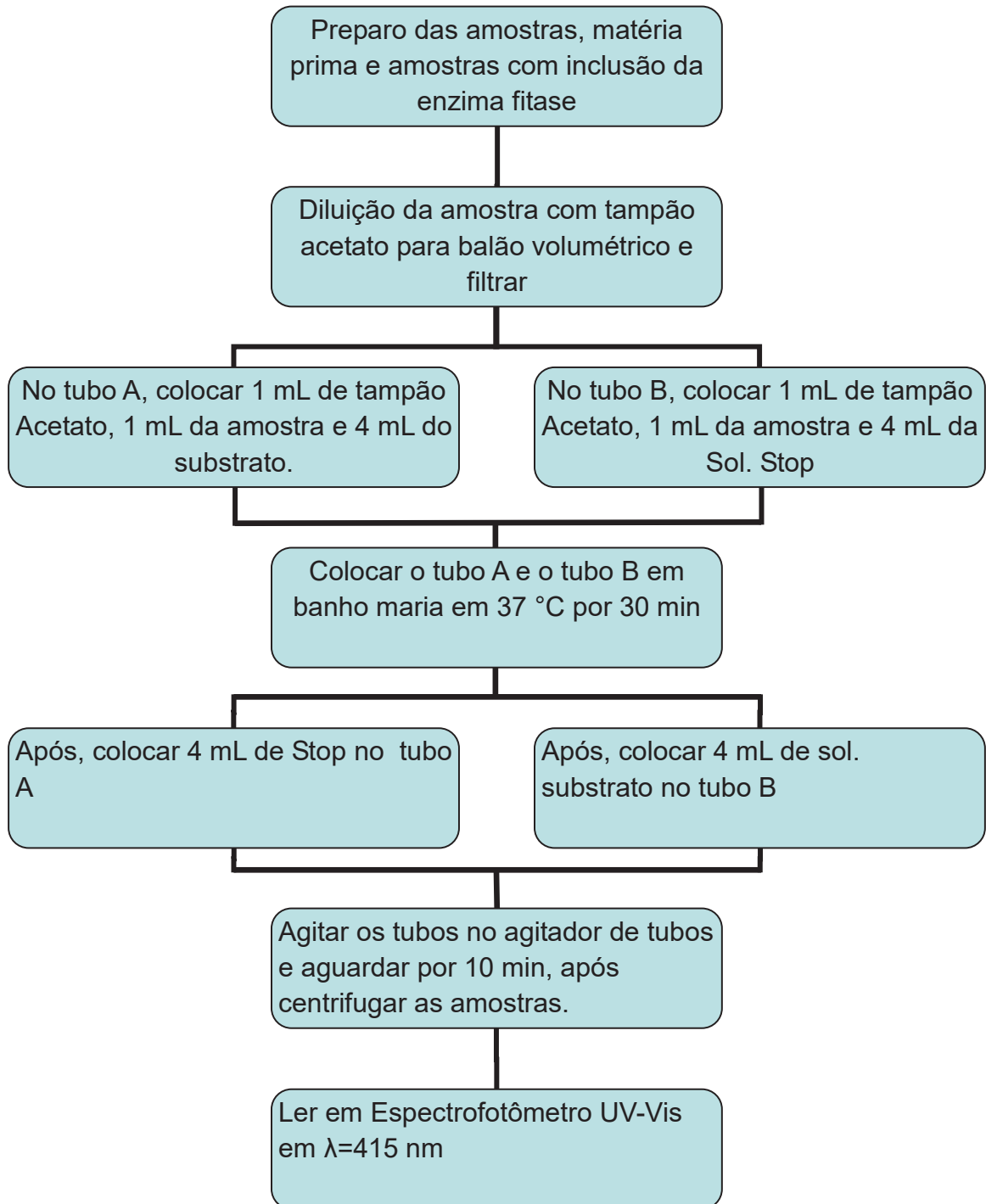
3.4.4 Cálculo da atividade de fitase:

As atividades de fitase foram calculadas apartir da equação 1.

$$U = \frac{C \times F}{S \times m \times 30} \quad (1)$$

Onde U representa a atividade de fitase; C é a atividade enzimática calculada pela equação de regressão linear, de acordo com a efetividade absorção de uma solução da amostra; F é o total de múltiplos de diluição de solução de amostra antes da reação; S é o massa na alíquota testada; m é a massa da amostra em g (gramas) e 30 é o período de reação.

3.4.6 Fluxograma da Determinação da Atividade de Fitase:



3.5. Validação

Os parâmetros de validação foram analisados de acordo com os requisitos preconizados pelo Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica (MAPA, 2011). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.5.1. Linearidade

A linearidade do padrão primário foi avaliada através da análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, a partir de três curvas de calibração idênticas, usando-se cinco concentrações na faixa de 0,10 a 2,50 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Os resultados permitiram definir o coeficiente de determinação (mínimo aceitável $R^2 = 0,999$), o desvio-padrão relativo (DPR) e a equação de regressão. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$Y = a + bX \quad (3)$$

Onde Y representa a resposta de medida; X é a concentração; a é a interseção com o eixo Y e b é a inclinação da curva analítica, que é igual a sensibilidade.

3.5.2. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados conforme método proposto por Olivieri (2015), respectivamente pelas equações 4 e 5, que empregam o desvio padrão residual, o coeficiente angular da curva de calibração e a leverage das concentrações das soluções padrão.

$$\text{LOD}_u = \frac{3.3s_{y/x}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (4)$$

$$\text{LOQ}_u = \frac{10s_{y/x}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (5)$$

onde: h_0 é leverage para o branco; $s_{y/x}$ = desvio padrão residual da curva de calibração; A = inclinação da curva de calibração; I = número de amostras utilizadas na curva de calibração;

3.5.3. Precisão

A precisão do método espectrofotométrico foi avaliada como repetibilidade, sendo expressa como coeficiente de variação de cinco replicatas.

3.5.4 Recuperação

A recuperação foi determinada a partir de amostras contendo diferentes quantidades da enzima fitase, e em amostras na concentração de análise de 100%. O método será considerado exato quando o percentual de recuperação atingir a faixa entre 85 e 115% (BRASIL, 2003 e BLAINSKI et al., 2013). A recuperação foi determinada conforme a equação 2:

$$R = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100 \quad (2)$$

onde, R é a recuperação em percentagem.

3.5.5. Robustez

A robustez do método foi determinada através de variações na temperatura (35 a 39 °C), pH (5,3 a 5,7), tempo de incubação (25 a 35 min) e concentração de fitato de sódio (75 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$)

3.5.6 Análise estatística

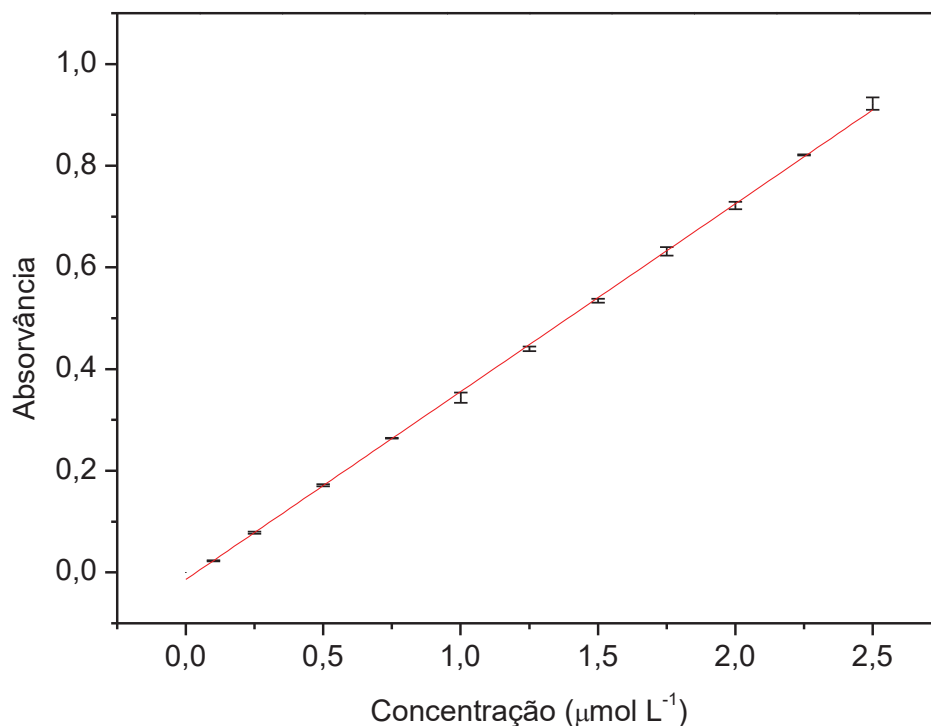
Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando $p < 0,05$ foi realizada a comparação das médias pelo teste de Tukey, sendo

as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do software Statistica, versão 8.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSAO

O método espectrofotométrico apresentou linearidade, no comprimento de onda de 415 nm, para concentrações estudadas (0,10-2,50 $\mu\text{mol/mL}$). A equação da regressão linear média foi obtida a partir de três curvas de calibração, sendo $y = 0,3694x - 0,01381$, onde: y é a absorvância (nm) e x a concentração ($\mu\text{mol/mL}$) em equivalente de fosfato (Figura 3). O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,9995$, comprovando o ajuste da curva ao intervalo de concentração utilizado.

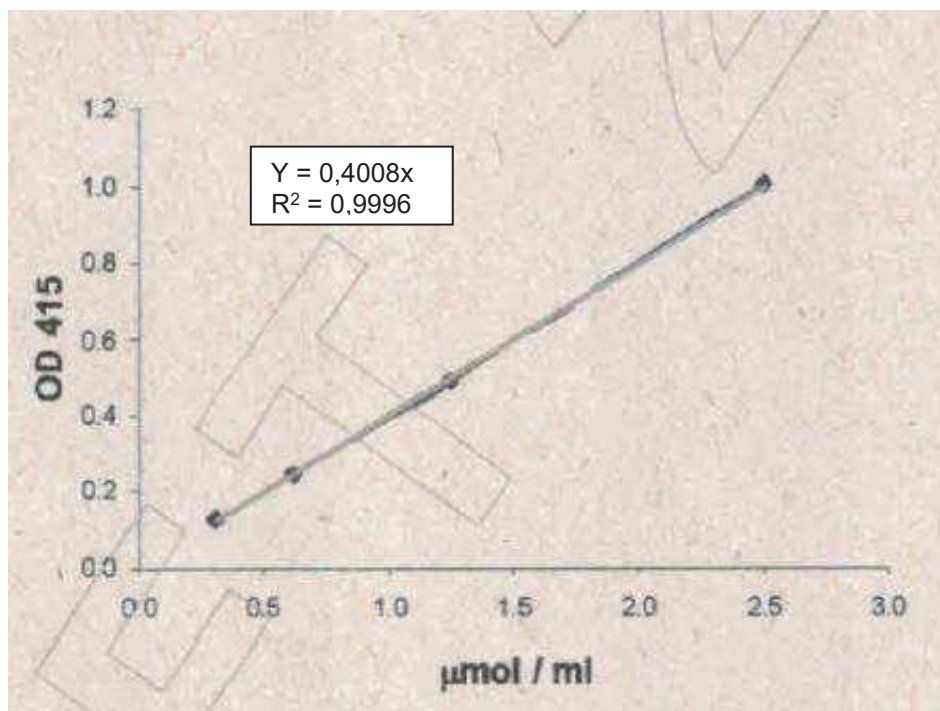
Figura 3 – Curva de calibração de padrão dihidrogenofosfato de potássio



Os dados obtidos para linearidade do método foram comparados com os valores descritos no método 30024 da ISO (2008), para a determinação da atividade da fitase em rações animais. O coeficiente angular encontrado (0,3694) ficou próximo do relatado pelo método da ISO (2008) que foi de 0,4008, conforme figura 4. O coeficiente de determinação (R^2) obtido neste trabalho foi de 0,9995, sendo que no método da ISO (2008) foi 0,9996. Estes valores indicam que o modelo linear explicou 99,95 e 99,96 %, respectivamente, da variabilidade do conjunto de dados.

O valor do coeficiente de correlação foi de 0,9998 para ambos. Segundo ANVISA (2003), as curvas de calibração devem ter um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99 e conforme INMETRO (2003) este valor deve estar acima de 0,90. Os parâmetros encontrados asseguram a qualidade da curva obtida, pois valores mais próximos de 1,0, aponta uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

Figura 4. Curva de calibração de Dihidrogenofosfato de potássio da ISO (2008).



Fonte: ISO (2008)

A Tabela 2 apresenta os resultados da variação do volume de substrato, tempo e temperatura de reação e pH, para avaliar a robustez do método 30024 da ISO (2008).

Tabela 2. Variação de parâmetros do método para avaliação da figura de mérito robustez

Parâmetros alterados	Atividade da fitase (U g ⁻¹)
Volume de substrato (mL) ¹	
1	15,09 ^a ± 0,43
2	15,29 ^a ± 0,20
4	15,62 ^a ± 0,14
Tempo de reação (min) ²	
25	14,64 ^a ± 0,55
30	15,62 ^b ± 0,14
35	15,28 ^{a,b} ± 0,09
Temperatura de reação (°C) ³	
35	14,00 ^a ± 0,48
37	15,62 ^b ± 0,14
39	13,86 ^a ± 0,78
pH ⁴	
5,3	12,62 ^a ± 0,21
5,5	15,62 ^b ± 0,14
5,7	13,76 ^c ± 0,37

¹tempo de reação de 30 min e 37 °C; ²volume de substrato de 4 mL e 37 °C; ³volume de substrato de 4 mL e tempo de reação de 30 min; ⁴volume de substrato de 4 mL e 37 °C e tempo de reação de 30 min.^aLetras diferentes para um mesmo parâmetro correspondem a diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Não houve diferença entre as médias da atividade da fitase ($p > 0,05$) quando o volume de substrato foi variado, o que indica que pequenas variações na concentração de substrato não interferem na determinação da atividade da fitase. Conforme Bisswanger (2011), embora as enzimas tenham um substrato definido de acordo com a sua função fisiológica, muitas enzimas catalisam também substâncias que são estruturalmente relacionadas ao seu substrato fisiológico.

Nesse sentido, resultados obtidos para mesma enzima mas com diferentes substratos variam consideravelmente devido à diferença da eficiência catalítica. Marounek et al (2011) ao determinar a atividade da fitase em cereais e leguminosas encontrou valores de atividade que variaram de 61 a 2114 U kg⁻¹. Costa (2012) observou que espécies como ácido úrico e a mistura de oxalato e ácido úrico interferiram na determinação de ácido fítico em urina, aumentando as concentrações de fitato determinadas em 245 e 341 %, respectivamente em relação ao controle.

A atividade obtida para a fitase foi significativamente menor ($p < 0,05$) para o tempo de reação de 25 min em relação ao tempo de reação de 30 min. Entre os tempos 30 e 35 min e 25 e 35 min não foram observadas diferenças significativas para a atividade enzimática de que a atividade obtida para os tempos de 30 e 35 min, em que não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Ao determinar a atividade da fitase em ração animal, Kim e Lei (2005), avaliaram o efeito do tempo de reação sobre a determinação da atividade desta enzima verificando que a partir de e 15 min foi alcançado o maior valor para atividade da fitase. Para os tempos de 90 e 120 min foi observada a diminuição da atividade da fitase, respectivamente de 10,4 e 8,9 %. Os autores consideraram adequado o tempo de reação de 30 min.

O emprego das temperaturas de 35 e 39 °C, resultou em uma menor atividade enzimática ($p < 0,05$) em relação a temperatura de 37 °C, evidenciando que a variação da temperatura influencia o resultado diminuindo a atividade enzimática. Em um estudo que avaliou o efeito do aquecimento da fitase comercial, obtida a partir do fungo *Aspergillus niger*, nas temperaturas de 55 e 80 °C, por 15 min, foi observada a diminuição da atividade de 72 para 51 % do valor obtido para a fitase comercial não aquecida.

Para as reações químicas o aumento da temperatura geralmente resulta em velocidades maiores de reação. Nas reações enzimáticas são observadas restrições, pois a estrutura tridimensional das enzimas é termossensível, sendo desestabilizada em temperaturas elevadas, resultando na sua desnaturação. Este processo é responsável pela diminuição da velocidade da reação em altas temperaturas (BISSWANGER, 2011).

Ullah et al. (2000) em estudo utilizou como referência a fitase de *Aspergillus niger* para a identificação da fitase produzida por *Pichia pastoris*, e definiram que acima de 60°C as duas fitases tem perda da atividade enzimática, significativamente.

Masumoto et al. (2001), estudou o efeito da temperatura da água sobre a atividade enzimática. Ainda esses autores avaliaram que o uso da enzima fitase no pré tratamento do farelo de soja, nas condições de pH 5,5 e a uma temperatura de 37°C, sua atividade enzimática é aumentada. Quando utilizado a enzima fitase na alimentação de peixes em baixas temperaturas ambientais pode diminuir a atividade da enzima, contudo o incremento dos níveis da enzima fitase na dieta seria uma opção a esta perda de eficácia (CHO; BUREAU, 2001; YOO et al., 2005). O pH que resultou na maior atividade enzimática para a fitase foi de 5,5, que foi significativamente maior ($p < 0,05$) que encontrado para os pHs 5,7 e 5,3. A atividade enzimática é muito dependente do pH. A atividade da maioria das enzimas é zero em pH fortemente ácido aumentando até um valor máximo com o aumento

do pH e diminuindo a zero em pHs fortemente alcalinos. Dois fatores influenciam este comportamento, que são: o estado de protonação de grupos funcionais de aminoácidos e cofatores envolvidos na atividade catalítica e a estrutura tridimensional da proteína. A protonação é um processo reversível enquanto que a alteração na estrutura tridimensional da proteína tende a ser irreversível. A simples protonação de um grupo funcional promove a atividade catalítica, enquanto que a protonação de outro grupo funcional pode diminuir a sua ação como catalisador (BISSWANGER, 2011).

Segundo Konergay (1996), com relação à variação do pH no trato gastrointestinal, constatou que a acidificação da dieta com ácidos orgânicos e a capacidade tamponante da dieta influenciam a atividade da fitase, sendo que a adição de ácidos orgânicos diminui a atividade da fitase.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para a estimativa da precisão (CV), exatidão (recuperação) limites de detecção e quantificação e sensibilidade do método 30024 da ISO (2008).

Tabela 3. Resultados das figuras de mérito para o método aplicado (30024 – ISO (2008))

Precisão/Exatidão	Resultado			
	Amostras	Atividade da Fitase (U/g)	CV (%) ¹	Atividade da Fitase (valores de referência) (U/g)
Ração 1	0,67 ± 0,03	4,84	0,50	134
Ração 2	44,39 ± 0,46	1,04	55,00	80,7
Ração 3	3,30 ± 0,38	11,69	2,00	165
Ração 4	2,84 ± 0,21	7,57	1,64	173
Fitase	5349,11 ± 205,02	3,83	≥ 5000,00	107
Padrão Fitase Sigma	12,02 ± 0,18	1,55	10-40	nd
Limite de detecção	0,010 (A); 0,075 µmol/mL			
Limite de quantificação	0,064 (A); 0,221 µmol/mL			
Sensibilidade	0,372 mL µmol ⁻¹			
Sensibilidade analítica	47,70 mL µmol ⁻¹			

¹Coefficiente de variação; nd= não determinado; (A) limites de detecção e quantificação expressos em termos de absorvância.

O coeficiente de variação para a atividade da fitase nas rações variou de 1,04 a 11,69 %. Para a fitase comercial e a fitase padrão, os valores do coeficiente

de variação foram de 3,83 e 1,55 %, respectivamente. Ao avaliar a precisão da determinação da atividade da fitase em amostras líquidas, contendo 750 U/kg e 1250 U/kg, aplicando o método 30024 da ISO (2008), foi obtido os valores de 13,0 e 5,2 %, respectivamente, para o coeficiente de variação da repetibilidade. Neste estudo também foi avaliada a precisão para amostras sólidas contendo 1500 U/kg, sendo observado valores na faixa de 3,1 a 9,1 % para o coeficiente de variação. A comparação dos resultados obtidos neste estudo com os relatados no referido da método da ISO (2008) indicam uma proximidade de valores, para a precisão avaliada como repetibilidade.

Costa-Bauza (2012) ao desenvolver um método colorimétrico para a determinação de fitato em urina, utilizando soluções de 1 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de fitato em urina sintética, obtiveram coeficientes de variação entre 2,5 e 7,1 %.

A exatidão foi estimada a partir dos resultados dos ensaios de recuperação, cujos valores variaram de 80,7 a 173 % para as rações, sendo obtido o valor de 107 % para a fitase comercial. Kim e Lei (2005) ao estudarem a recuperação da enzima fitase adicionada em rações de suínos, nas concentrações de 500 e 1000 U/kg, obtiveram recuperações que foram de 111,6 e 117,4 %, respectivamente, para o método desenvolvido por estes autores. Costa-Bauza (2012) ao estimar a exatidão do método de determinação de fitato, obtiveram recuperações que variaram de 95 a 97 %. Para métodos que não envolvem a determinação da atividade enzimática, a ANVISA (2003), regulamenta que os resultados do coeficiente de variação para a precisão não podem ultrapassar 5 % e, para exatidão, a recuperação não deve ser inferior a 95 %. Contudo, podem ser considerados exatos, resultados que apresentarem desempenho dentro dos limites preconizados pelos compêndios oficiais, os quais são de 80 a 120% pela RE 899/2003 (BRASIL, 2003) e de 85 a 115 % (ICH, 2005).

Segundo Avisite (2014), a qualidade de mistura da ração é afetada devido o tamanho de partícula da enzima e o número de partículas por grama de produto. Com isso, pode haver uma diferença de quase 10 vezes no número de partículas por grama da matéria prima em relação ao número de partículas da enzima. Este autor também coloca que a indústria de rações tem negligenciado esta questão.

Slominski et al. (2007) avaliaram que a estabilidade da atividade de fitases é diminuída quando submetida a processos térmicos como peletização ou também

quando é exposta a temperaturas de armazenamento inadequadas. Isso ocorre tanto para enzimas fitase na apresentação granular ou em pó. Além disso, o processo de peletização também reduz a sua atividade enzimática.

Pesquisa realizada a partir da fitase, sintetizada pelo microorganismo *Aspergillus niger*, mostraram que a adição de soluções de sais de íons Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} a esta enzima, resultou na perda de atividade. Nesse sentido foi demonstrado que ocorre a formação de complexos Fe-fitato que diminuem ou até eliminam, dependendo da concentração do íon metálico, atividade enzimática (Greiner et al., 2009).

Os valores estimados para os limites de detecção e quantificação foram de 0,010 e 0,064 unidades de absorvância, respectivamente. Os valores relatados pelo método 30024 da ISO (2008) foram de 0,011 e 0,036 unidades de absorvância. Os limites de detecção são geralmente estimados a partir da concentração do analito que origina um sinal que é três vezes maior que o desvio-padrão do branco, como foi realizado no método 30024 da ISO (2008). Segundo Olivieri (2014) este método resulta em limites de detecção subestimados. A comparação dos limites obtidos neste estudo foi próxima dos valores relatados no método 30024 da ISO (2008).

A sensibilidade analítica foi de 47,70 $\mu\text{mol/ml}$. Este valor indica que o método é capaz de distinguir soluções de dihidrogenofosfato, cujas concentrações sejam diferentes em 0,02 $\mu\text{mol/ml}$. Assim, considerando a faixa de concentração que foi utilizada neste estudo é possível verificar que o método apresentou uma sensibilidade analítica adequada.

5 CONCLUSÃO

O método aplicado neste estudo apresentou linearidade, precisão, sensibilidade analítica e limites de detecção e quantificação adequados, em uma ampla faixa de concentração, tendo resultados próximos aos descritos no método. Para a exatidão nas amostras de ração, os resultados dos ensaios de recuperação ficaram fora da faixa considerada ideal.

Contudo, para a fitase comercial o valor de recuperação dentro do valor aceitável. Com relação a robustez do método, somente o volume de substrato, na faixa avaliada, não influenciou na atividade da fitase. A variação do pH , o tempo e a temperatura de reação influenciaram na atividade desta enzima.

6 REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RE nº 899 - **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalítico**, de 29 de maio de 2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Guia para Qualidade em Química Analítica** – Uma Assistência a Acreditação, v. 1, 1. ed, Brasília, 2004.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Habilitação de Laboratórios Analíticos em saúde** – segundo os requisitos da ISO/IEC 17025 – Procedimento GGLAS 02/17025, 2. ed, Brasília, 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RE nº 1 de 29/07/2005. **Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade**. Informe Técnico nº 1 de 15 de julho de 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Resolução RDC Nº 17, DE 16 DE ABRIL DE 2010.

BENEVIDES et al.; **Fatores antinutriciona em alimentos: revisão**. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, 18(2): 2011, p. 67-79.

BICHARA, R.; PELEGRINO, M, A. **Validação de Metodologias Analíticas**: Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2011.

BISSWANGER, H. **Practical Enzymology**. 2 ed. Wiley & Sons, LTD. 2011.

BLAINSKI, E.; TORMENA, C. A.; FIDALSKI, J.; GUIMARÃES, R. M. L. **Quantificação da degradação física do solo por meio da curva de resistência do solo à penetração**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.32, 2008, p. 975-983.

BROZ, J.; OLDALE, P.; PERRINVOLTZ, A. H. **Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus diet without addition of inorganic phosphates**. British Poultry Science, London, v. 35, 1994, p. 273-280.

CAMPESTRINI, E.; et al. **Utilização de enzimas na Alimentação Animal**. Revista Eletrônica Nutritime, v.2, nº 6, novembro/dezembro 2005, p.259-272.

COSTA-BAULA. A.; GRASES. F.; GOMILA, I. et al. **A simple and rapid colorimetric for determination of phytaste in urine**, 2012.

COOPER, J.R.; Gowing, H.S. **A Method for Estimating Phosphate in the Presence of Phytate and Its Application to the Determination of Phytase**. Anal. Biochem., 1983, p.132, 285–287.

ENGELEN, A.J.; VAN DER HEEFT, E.C.; RANDSDORP, P.H. et al. **Simple and rapid determination of phytase activity.** *Journal of AOAC International*, v.77, 1994, p.760-764.

ENGELEN, A.J.; VAN DER HEEFT, F.C.; RANDSDORP, P.H. et al. **Determination of Phytase Activity in Feed by a Colorimetric Enzymatic Method: Collaborative Interlaboratory Study.** *J. AOAC Int.* 2001, p. 84, 629–633.

Enviropig Moves Ahead , University of Guelph Campus Bulletin, Retrieved 5. ed, January 2011.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. **The colorimetry determination of phosphorous.** *J. Biol. Chem.* 1925, p. 66, 375–400.

GRANGEIRO Junior, S. et al., **Validação da metodologia analítica de comprimido à Base de nevirapina.** *Controle de Contaminação, São Paulo*, n. 65, set. 2004, p. 24-28.

GREINER, R.; HALLER, E.; KONIETZNY, U.; JANY, K.D. **Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 341, Issue 2, 15 May 1997, p. 201 - 206.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). **Orientações sobre validação de Métodos de Ensaios Químicos**, Rio de Janeiro, DOQ-CGC RE008, 2003, p. 35.

ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A. **“Text on Validation of Analytical Procedures”** Mar 1995; Genebra, 2005.

International Conference on Harmonisation: ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**, nov. 2005. ISO 6497: Animal Feeding Stuffs – Sampling, 2002.

International Organization for Standardization: ISO/DIS 30024. **Animal feeding stuffs – Determination of phytase activity**, 2008.

KIM, T. W.; LEI, X. G.; **An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed**, 2005.

KONERDAY, E.T. **Phytase in Animal Nutrition and Waste Management** : BASF Reference Manual 1996, New Jersey: BASF, 1996, p. 205-216.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e Controle de Qualidade Analítica**, MAPA/ACS, 2011.

MULLANEY, E. J. and ULLAH, A. H. **The term phytase comprises several different classes of enzymes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312: 2003, p. 179-184.

- Mundo Agro Editora. **A revista do Avisite**, Campinas, SP. n° 83, junho, 2014.
- NEWMAN, K. **Phytase: The enzyme, its origin and characteristics: Impact and potential for increasing phosphorus availability**, Biotechnology in the Feed Industry, Alltech Technical Publications. Nicholasville (Kentucky) 1991, p. 169-177.
- NOLAN, K.B.; DUFAPIN. P.A. **Effects of phytase on mineral bioavailability, *in vitro* studies on Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ (also Cd²⁺) solubility in the presence of phytase**, 1987.
- NRC – National Research Council. **Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition**, 1994.
- OLIVIERI, A.C. **Analytical figures of merit: from univariate to multiway calibration**, Chem. Rev. 114. 2015, p. 5358–5378.
- PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R. et al. **Production, purification and properties of microbial phytases**. Bioresource technology, v. 77, Issue 3, May 2001, p. 203-214.
- REDDY, N. R.; SANTHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. **Phytates in legumes and cereals**. Adv. Food Res. v. 28, 1982, p.1-9.
- RIBANI, M. et al. **Validation for chromatographic and electrophoretic methods**. Química Nova, v.27, 2004, p.771-780.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. **Microbial phytase in poultry nutrition**. Animal Feed Science and Technology, v. 135, Issue 1-41, May 2007, p. 1-41.
- SLOMINSKI, B. A.; DAVIE, M. C.; NYACHOTI, M.C. et al. **Heat stability of endogenous and microbial phytase during feed pelleting**. Livest. Sci. v. 109, Issue 1-3, May 2007, p. 244–246.
- TORREZAN, R.; FRAZIER, R.; CRISTIANINI, M. **Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre os teores de fitato e inibidor de tripsina de soja**, v. 28, 2010, p.179-86.
- ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K.; LEI, X. G.; MULLANEY, E. J. Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 275, n. 2, 2000, p. 279-285.
- VATS, P.; BANERJEE, U.C. **Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositol hexak is phosphate phosphohydrolases): an overview**. Enzyme and Microbial Technology, v.35, n.1, 2004, p.3-14.
- VALDERRAMA, P.; BRAGA J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, Vol. 32, No. 5, 2009, 1278-1287.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. **Phytase Production by the Yeast, *Pichia anomala***. Biotechnology Letter 23: 2001. p. 551–554.

ZHOU, J.R.; ERDMAN, J.W. **Phytic acid in health and disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.35, n.6, 1995. p.495-508

ZHOU, J.R.; FORDYCE, E. J.; RABOY, V. et al., **Reduction of phitic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats**: Journal of Nutrition, 1992. p. 122.