

CONSTRUÇÃO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

VAZ, L. S.,
TEIXEIRA, M. C. V.,
CARVALHO, P. H.,
BATTESTIN, V.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.00.00-2 Bioquímica

Apresentado no
8º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP
06 a 09 de novembro de 2017 - Cubatão-SP, Brasil

RESUMO

As enzimas são biomoléculas responsáveis pela catálise de diferentes reações em sistemas biológicos. Através da diminuição da energia de ativação reacional, elas possibilitam que a vida possa ocorrer em condições amenas de temperatura e pressão. Contudo, uma das grandes dificuldades do trabalho com enzimas é como mensurá-las. Ao contrário de compostos químicos, para os quais os métodos analíticos fornecem uma concentração, as enzimas são mensuradas quanto a sua velocidade de conversão. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi construir uma curva de calibração para determinação da atividade enzimática de tanase. Para a determinação da curva foi utilizado um substrato contendo ácido tânico em diferentes concentrações e este foi incubado a temperatura de 60°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado albumina de soro bovino e levado a centrifugação. O precipitado foi re-suspenso em solução SDS + trietanolamina acrescido de solução de FeCl₃. A absorbância foi medida após 15 minutos em 530 nm. Foram construídas oito curvas de calibração, a melhor curva apresentou o valor de coeficiente de determinação (R^2) = 0,9694 e a equação da reta $y=2,7253x$. Um dos parâmetros para verificar um bom ajuste dos pontos experimentais é o R^2 . Quanto mais próximo de 1, significa que há uma boa reprodutibilidade da técnica.

PALAVRAS-CHAVE: curva padrão; enzimas; colorimétrico.

CONSTRUCTION OF CALIBRATION CURVE FOR DETERMINATION OF ENZYMATIC ACTIVITY

ABSTRACT

Enzymes are biomolecules responsible for the catalysis of different reactions in biological systems. By decreasing reactive activation energy, they enable life to occur under mild conditions of temperature and pressure. However, one of the great difficulties of working with enzymes is how to measure them. Unlike chemical compounds, for which analytical methods provide a concentration, the enzymes are measured for their conversion rate. Thus, the objective of this work was to construct a calibration curve to determine the enzymatic activity of tannase. For the determination of the curve, a substrate containing tannic acid was used in different concentrations and it was incubated at 60°C for 10 minutes. Bovine serum albumin was then added and centrifuged. The precipitate was resuspended in SDS-triethanolamine solution plus FeCl₃ solution. The absorbance was measured after 15 minutes at 530 nm. Eight calibration curves were constructed, the best curve presented the value (R^2) = 0.9694

and the equation of the line $y = 2.7253x$. One of the parameters to verify a good adjustment of the experimental points is the R^2 . The closer to 1 means that there is a good reproducibility of the technique.

KEYWORDS: calibration curve; enzymes; colorimetric.

INTRODUÇÃO

A curva padrão é a função que descreve a resposta de um detector sobre uma faixa de concentração sendo utilizada para prever a concentração de uma amostra desconhecida. Devido à existência de uma proporcionalidade direta entre a concentração das soluções e a quantidade de luz absorvida em comprimentos de onda específicos, a espectrofotometria pode ser usada como um método quantitativo de identificação de substâncias. Contudo, faz-se necessário, a obtenção de uma relação entre absorvâncias registradas em experimentos para diferentes concentrações de soluções, elaborando-se retas de calibração, ou seja, curvas padrões. Experimentalmente é possível conhecer os valores de absorvância de soluções conhecidas e assim, utilizando-se as curvas padrões, podem-se determinar matematicamente as concentrações da solução desejada (Moura *et al.*, 2007).

A curva de calibração ou curva padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorvância (A) e os de concentração. Com base na análise gráfica é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorvância em concentração. Inicialmente, verificamos no espectrofotômetro a absorvância (A) das soluções cujas concentrações sejam conhecidas (Moura *et al.*, 2007). O objetivo deste trabalho foi elaborar a curva padrão para determinar a atividade da enzima tanase utilizando ácido tânico comercial com alto grau de pureza. Essa enzima será produzida posteriormente em nosso laboratório de pesquisa e esta, apresenta grande potencial para aplicações industriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais e equipamentos utilizados

Equipamentos: balança analítica, pHmetro, béqueres, pipetas, centrifuga, banho termostático, espectrofotômetro. Materiais: ácido tânico, ácido acético, acetato de sódio, albumina de soro bovino, dodecil sulfato de sódio, trietanolamina, cloreto de ferro, cloreto de sódio, ácido clorídrico.

Curva padrão

Foram elaboradas 8 curvas de calibração utilizando as concentrações de 0,02 a 0,24% de ácido tânico comercial com alto grau de pureza. Para a determinação da curva-padrão foi utilizada a metodologia de determinação de atividade enzimática de tanase, da seguinte maneira: o substrato contendo ácido tânico em diferentes concentrações (0,3 ml) foi incubado a temperatura de 60°C por 10 minutos em banho-maria. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de solução de albumina de soro bovino (BSA), sendo em seguida centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos. O precipitado foi re-suspenso em 3 mL de solução SDS + trietanolamina acrescido de 1 mL de solução de $FeCl_3$. A absorvância foi medida após 15 minutos em 530 nm conforme metodologia descrita por Mondal *et al.*, (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção da Curva-padrão

Foram determinadas 8 curvas de calibração com concentrações conhecidas de ácido tânico. As leituras de absorvância foram realizadas para cada tubo de reação em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm. Com os resultados obtidos no espectrofotômetro sobre a absorvância de cada tubo com diferentes concentrações de solução de ácido tânico, foi possível construir a curva que será utilizada futuramente pra determinar a atividade da enzima tanase. Dentre as oito curvas de calibração determinadas, o melhor resultado está representado na Figura 1.

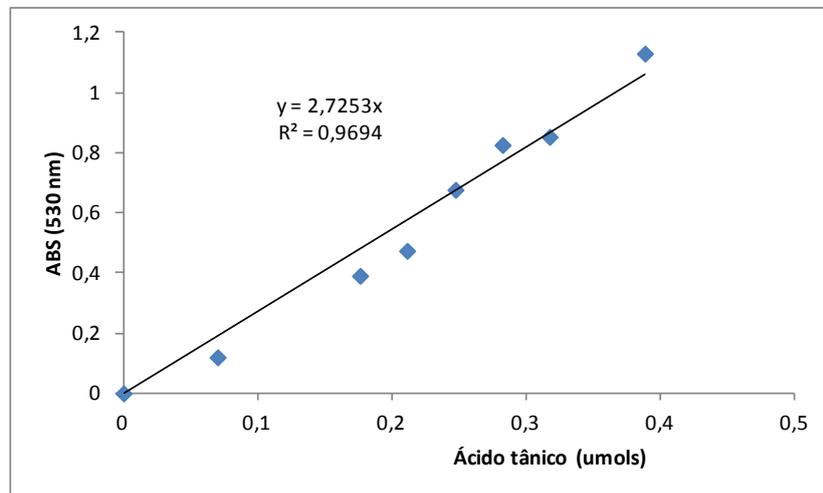


Figura 1. Curva de calibração utilizando ácido tânico comercial de alto grau de pureza

O mais importante deste gráfico (Figura 1), é a equação que ele nos fornece, pois é a partir da equação que podemos calcular a concentração do que se deseja, neste caso, será a atividade da enzima tanase. O gráfico disponibiliza também o valor de R^2 que é o coeficiente de determinação. O valor obtido foi de $R^2=0,9694$ e a equação da reta representada por: $y=2,7253x$. Um dos parâmetros para verificar um bom ajuste dos pontos experimentais é o R^2 . Quanto mais próximo de 1, significa que há uma boa reprodutibilidade da técnica, bem como, no preparo das soluções, das pesagens, das medidas volumétricas inerentes a técnica, e além disso, que os equipamentos utilizados estão respondendo bem a essa técnica colorimétrica.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pôde-se concluir que a curva de calibração está de forma linear com os pontos obtidos das concentrações das soluções analisadas. O coeficiente de determinação apresentou-se num valor muito próximo de 1, aproximadamente 0,9694, indicando que houve um bom ajuste dos dados experimentais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o IFSP e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

MONDAL, K.C. BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B.R. Colorimetric Assay Method for determination of the Tannin Acyl Hidrolase activity. *Analytical Biochemistry* 295 (2), 168-171, 2001.

MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos. Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 18 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 108). Fortaleza.