

ELABORAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO ÁCIDO TÂNICO COMERCIAL PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE TANASE

ELABORATION OF THE CALIBRATION CURVE USING COMMERCIAL TANIC ACID TO DETERMINE ENZYMATIC ACTIVITY OF TANNASE

Ester Helena Alves ¹ Lucas Silva Vaz ²

Mateus Cabral de Vasconcellos Teixeira ³

Fabiola Pisciotto de Oliveira ⁴

Suelene Francisca da Silva Bispo dos Santos ⁵ Vania Battestin ⁶

Data de entrega dos originais à redação em: 19/03/2019
e recebido para diagramação em: 25/09/2019

Enzimas são biomoléculas responsáveis pela catálise de diferentes reações em sistemas biológicos. Através da diminuição da energia de ativação reacional, possibilitam a ocorrência de vida em condições amenas de temperatura e pressão. Industrialmente, esse fato desperta grande interesse, pois permite a economia de energia a ser empregada aos processos de conversão, gera menos coprodutos e resíduos, sendo parte de um sistema ambientalmente amigável. 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 (como por exemplo: g.L⁻¹, Molar, etc.), as enzimas são mensuradas quanto a sua velocidade de conversão. Dessa forma, diferentes métodos ou, simplesmente, diferentes formas de se ver um mesmo método, podem levar a resultados – valores de atividade – distintos, sem que efetivamente um esteja mais correto que o outro. Isso, muitas vezes, impossibilita a comparação entre valores absolutos de um trabalho com outro. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi determinar a curva de calibração de atividade enzimática, a partir dos dados obtidos em nossos laboratórios. A molécula que será quantificada através da curva de calibração é a enzima tanase, metabólito de grande interesse para a indústria, que se destaca no cenário nacional devido a sua capacidade de produzir antioxidantes utilizados na indústria química, farmacêutica e alimentícia. A melhor curva apresentou a equação matemática $y = 7,0993x - 1,1849$, obtendo-se um valor para o coeficiente de determinação (R²) de 0,999.

Palavras-chave: Enzimas. Curva de Calibração. Espectrofotômetro. Tanase.

Enzymes are biomolecules responsible for the catalysis of different reactions in biological systems. Through the decreasing reactive activation energy, they enable life to occur under mild conditions of temperature and pressure. Industrially, this fact has attracted a lot of interest, since it allows the energy savings to be contributed to the conversion processes, generating less co-products and residues, being part of an environmentally friendly system. However, one of the great difficulties of working with enzymes is how to measure them. Unlike chemical compounds, for which the analytical methods provide a concentration (for example, g.L⁻¹, Molar, etc.), the enzymes are measured for their conversion rate. In this way, different methods, or simply different ways of seeing the same method, can lead to different results, values of activity, without actually being more correct than the other. From this, the objective of this work was to determine the calibration curve of enzymatic activity, from the data obtained in our laboratories. The molecule that will be quantified through the calibration curve is the enzyme tannase, a metabolite of great interest to the industry, which stands out in the national scenario due to its capacity to produce antioxidants used in the chemical, pharmaceutical and food industry. The best curve presented the mathematical equation $y = 7,0993x - 1,1849$, obtaining a value for the coefficient of determination (R²) of 0,999.

Keywords: Enzymes. Calibration Curve. Spectrophotometer. Tannase.

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalisadores, responsáveis por milhares de reações bioquímicas envolvidas nos mais diversos processos biológicos, tanto nos seres vivos quanto industrialmente. Possuem grande especificidade e atuam na diminuição da energia de ativação das reações, aumentando assim a velocidade das mesmas. De acordo com a estrutura de cada proteína, esta reage com o substrato na qual possui afinidade. Dessa forma a atividade enzimática se relaciona com a velocidade de conversão,

onde, segundo a Enzyme Commission, uma unidade (U) de atividade corresponde a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato ou a formação de 1 micromol de produto por minuto (1 U = 1 μmol/min) (KIELING, 2002; JÚNIOR, 2003).

Entretanto, a complexidade do trabalho com enzimas ocorre em sua mensuração, posto que estas não permitem a comparação absoluta de valores obtidos em diferentes trabalhos devido a sua medida de atividade estar diretamente ligada a velocidade de conversão. Logo,

1 - Graduanda em Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos. <esterhelena15@gmail.com >.

2 - Graduando em Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos.

3 - Graduando em Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos.

4 - Graduanda em Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos.

5 - Licenciada em Ciências Biológicas, Universidade Cidade de São Paulo, UNICID.

6 - Engenheira de Alimentos – Professora Dr^a. do curso de Licenciatura em Química, IFSP, Câmpus São José dos Campos.

métodos distintos ou, diferentes formas de se ver um mesmo método, podem resultar em valores de atividade distintos, sem que necessariamente um apresente-se mais correto que o outro. Por esta razão, se faz necessário a determinação de uma curva de calibração, válida somente para determinação da atividade enzimática de uma biomolécula exclusivamente em um laboratório (VAZ et al., 2017; MOURA et al., 2007; CORRÊA, 2018).

Dessa forma, a curva de calibração é utilizada para determinar a concentração desconhecida de uma solução. Isso é possível devido a proporcionalidade direta entre a concentração de soluções e a quantidade de luz absorvida em comprimentos de onda característicos. Portanto, a espectroscopia é a técnica mais adequada para as referidas identificações. Assim, utilizando-se diversas concentrações conhecidas, são medidas as respectivas absorvâncias, de modo a construir uma curva de calibração, na qual sua expressão matemática possibilita a determinação da concentração desconhecida de uma amostra (MOURA et al., 2007).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo elaborar a curva de calibração para determinação da atividade enzimática de tanase. A enzima, por sua vez, é objeto de grande interesse para a indústria devido a sua vasta aplicação na indústria de alimentos, sucos, cervejaria, cosméticos, farmacêutica e indústria química; é usada na produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, refrigerantes a base de café, processo de tratamento de couro, detanificação de alimentos e para tratamento de efluentes na indústria de couros (BATTESTIN et al., 2004; VALERA, 2014; ANDRADE et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2018).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Importância da determinação da curva de calibração

A curva de calibração é a função que descreve a resposta de um detector sobre uma faixa de concentração, 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. A partir disso, são elaboradas retas de calibração, ou seja, curvas de calibração. Experimentalmente é possível conhecer os valores de absorvância de soluções conhecidas e assim, utilizando-se as curvas de calibração, pode-se determinar matematicamente as concentrações da solução desejada (MOURA et al., 2007; CORRÊA, 2018; SÁ, 2006; COIMBRA; SÓTER; FREITAS, 2013; VAZ et al., 2017).

A curva de calibração corresponde à relação gráfica entre os valores de absorvância (ABS) 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. Com base nisso, inicialmente, foram verificadas no espectrofotômetro a absorvância (ABS) das soluções cujas concentrações eram conhecidas. Logo, de posse da curva de calibração, pode-se determinar a atividade enzimática da enzima tanase (VAZ et al., 2017; MOURA et al., 2007).

2.2 Espectrofotômetro

A espectrofotometria é um dos métodos de análises óptico mais utilizado nos estudos biológicos e físico-químicos. Espectrofotômetros são equipamentos apropriados para apontar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda. Este registro é denominado espectro de absorção ou espectro de transmissão, em razão do dado referente à absorvância ou transmitância, respectivamente. O espectro de absorção é específico para cada espécie química, de modo que torna-se viável a identificação de uma espécie química por seu "espectro de absorção". A característica mais importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas (PEREIRA et al., 2013; COIMBRA; SÓTER; FREITAS, 2013).

2.3 Espectrofotometria na região do visível

A absorção das radiações ultravioleta, visíveis e infravermelhas provém das estruturas das moléculas, e é específica para cada substância química. Quando a luz atravessa uma substância, parte da energia é absorvida (absorvância): a energia radiante não provoca consequência alguma sem ser absorvida. A cor das substâncias está relacionada à absorção (transmitância) de determinados comprimentos de onda da luz branca que incide sobre as mesmas, permitindo a transmissão aos olhos apenas daqueles comprimentos de onda não absorvidos. A interação da matéria com radiações de comprimento de onda entre 450 e 750 nm, denominada luz visível, se evidencia por meio das cores das substâncias. Essa luz visível, por sua vez, pode ser decomposta em diferentes radiações, compatíveis aos intervalos de comprimento de onda, caracterizados pelas colorações emitidas (HARRIS, 2005; PEREIRA et al., 2013).

Se uma radiação ininterrupta de luz branca atravessa uma amostra, a intensidade de radiação vai decrescer, de diferentes modos, para diversos comprimentos de onda. A radiação emergente poderá ser colorida (região visível), porque na região visível é possível enxergar a cor da radiação emergente. Assim, qualquer material solúvel colorido pode ser analisado quantitativamente desse modo, sendo esta a base da espectrometria de absorção visível. Portanto, a referida técnica, corresponde a análise colorimétrica empregada numa faixa de luz visível, entre o ultravioleta e o infravermelho (CECCHI, 2003; SÁ, 2006).

2.4 A enzima tanase

A tanino acil hidrolase (TAH), conhecida como tanase (EC 3.1.1.20), é uma enzima extracelular, induzível e produzida na presença de ácido tânico por bactérias, fungos e leveduras. A tanase hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo glicose e ácido gálico (BATTESTIN et al., 2004; BATTESTIN; MACEDO; FREITAS, 2008; TEIXEIRA et al., 2018; TEIXEIRA, VAZ E BATTESTIN, 2017; ANDRADE et al., 2016). Apresenta pH estável entre 3,5-8,0; com pH ótimo para sua atividade entre 5,5-6,5; sua temperatura de estabilidade está entre 30°C e 70°C, sendo sua atividade ótima detectada entre 30°C e 50°C e massa molecular entre 70kDa e 300kDa. Suas propriedades podem variar de acordo com meio de cultivo e a linhagem de microrganismo utilizada. A enzima tanase é inibida por Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺ e é

inativada por EDTA, 2-mercaptoetanol, sulfatos e cloretos de magnésio e cálcio (BATTESTIN, 2007).

Existem diversas aplicações da tanase na indústria, porém devido ao seu alto custo de produção poucas aplicações são empregadas. Sua ampla aplicação na indústria alimentícia inclui a produção de sucos e cerveja, além de contribuir na indústria de cosméticos, farmacêuticas e indústria química. É especialmente utilizada na produção de ácido gálico, estabilização da cor do vinho, chás instantâneos, processos de tratamento de couro, detanificação de alimentos e tratamento de efluentes na indústria de couro (BATTESTIN, 2007; BATTESTIN et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2018; TEIXEIRA, VAZ E BATTESTIN, 2017; VALERA, 2014; ANDRADE et al., 2016).

Além das diversas possibilidades de emprego industrial da enzima, a tanase também se destaca pela versatilidade de meios de cultivo que possibilitam a sintetização da mesma. Dessa forma, a produção da biomolécula por microrganismos permite o aproveitamento de diferentes subprodutos e resíduos agroindustriais utilizados como substratos, como resíduos vegetais de uva, caju, café, farelo de trigo, bagaço de cana, resíduos do processamento de suco de laranja e o resíduo da indústria cervejeira. A utilização desses resíduos configura um meio potencial de aproveitamento de substratos alternativos e minimização de problemas ambientais, como a poluição e o descarte inadequado de resíduos (BATTESTIN, 2007; ALVES et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

3 OBJETIVO

Elaborar a curva de calibração para determinação da atividade enzimática de tanase utilizando ácido tânico comercial com alto grau de pureza.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos utilizados

Equipamentos: balança analítica (METTLER TOLEDO – ME104), pHmetro (METTLER TOLEDO), béqueres, pipetas, centrífuga (NOVATECNICA – NT810), banho termostático (TECNAL – TE054MAG), espectrofotômetro (TECNAL UVMIS).

Materiais: ácido tânico (SIGMA-ALDRICH), ácido acético, acetato de sódio, albumina de soro bovino, dodecil sulfato de sódio, trietanolamina.

4.2 Preparo de soluções

a) Solução de substrato

Foi preparada pela adição de concentrações variadas (p/v) de ácido tânico em tampão acetato pH 5,5 - 0,2 M.

b) Solução Albumina de soro bovino (BSA)

Foi preparada na concentração de 1 mg/mL (essa solução foi preparada em tampão acetato pH 5,0-0,2 M, contendo 0,17 M de cloreto de sódio).

c) Solução SDS-trietanolamina

Foi preparada pela adição de SDS 1% (p/v) adicionado de 5% (v/v) de trietanolamina em água destilada.

d) Solução de FeCl3

Foi preparada pela adição de 0,01 M de FeCl3 em 0,01 M de ácido clorídrico.

4.3 Curva de calibração

A curva de calibração foi elaborada utilizando ácido tânico nas concentrações de 0,1 a 0,18% (Tabela 1). A construção da curva seguiu a metodologia utilizada para a 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 paralisada 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 ressuspenso em 3 mL de solução SDS-trietanolamina acrescido de 1 mL de solução de FeCl3. A absorbância foi medida após 15 minutos em 530 nm, conforme metodologia descrita por Mondal et al., (2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Construção da Curva de Calibração

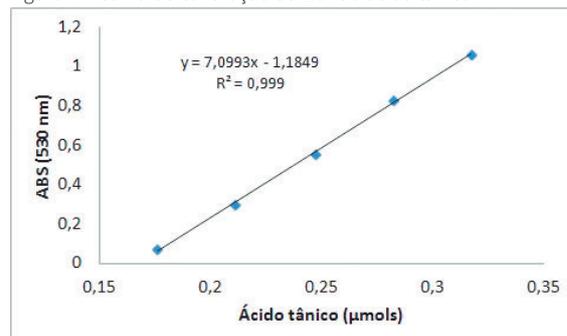
A curva de calibração foi construída com 5 pontos experimentais. Foram realizadas as leituras de absorbância (ABS) de cada tubo de reação em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm. A Tabela 1 apresenta os valores de ABS obtidos.

Tabela 1 - Valores de absorbância obtidos para a construção da curva de calibração

Ácido tânico (%)	Ácido tânico (µmols)	ABS (530 nm)
0,1	0,176	0,075
0,12	0,211	0,301
0,14	0,247	0,558
0,16	0,282	0,833
0,18	0,317	1,062

A partir dos dados obtidos acima construiu-se a curva de calibração (Figura 1), descrita pela equação matemática representada por $y = 7,0993x - 1,1849$, que obteve um valor para o coeficiente de determinação (R2) de 0,999. Um dos parâmetros para verificar um bom ajuste dos pontos experimentais é justamente o R2. 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.

Figura 1 - Curva de calibração utilizando ácido tânico



Com base nisso, a curva de calibração é um referencial essencial para a determinação da atividade enzimática de tanase. A partir da absorbância medida nas reações experimentais foi possível estimar a produção da enzima (atualmente a tanase é produzida no laboratório através da técnica de fermentação sólida).

5.2 Determinação da atividade de tanase

A partir da construção da curva de calibração, foi possível determinar a atividade enzimática de tanase, posto que a absorbância medida na reação possui uma relação linear com a concentração de ácido tânico. Os dados a seguir apresentam as absorbâncias obtidas nos ensaios de produção da enzima tanase através de processo de fermentação sólida (ALVES et al., 2018). Com base nos valores de absorbância obtidos nesses ensaios, pode-se determinar a quantidade de enzima que foi produzida no processo.

Utilizando-se da equação matemática obtida ($y = 7,0993x - 1,1849$), foram encontrados os valores correspondentes a "x". Em seguida, estes foram manipulados matematicamente para a determinação do valor que representa a atividade enzimática (Tabela 2), que por convenção é expressa por minuto de reação por mL (U/mL). Em virtude disso, os valores foram divididos por 10 (em função dos 10 min de reação no banho maria) e multiplicados por 2 (em função do 0,5 mL de extrato enzimático usado na reação).

Tabela 2 - Tratamento de dados para determinação da atividade enzimática

Reação enzimática (ABS 530 nm)	Valor de "x"	Atividade enzimática (U/mL)	Média de atividade enzimática (U/mL)
0,361	0,217753863	0,043550773	0,045691829
0,513	0,239164425	0,047832885	

A partir disso, constatou-se que a produção de tanase foi de aproximadamente 0,046 U/mL.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho foi possível concluir que o método escolhido, testado e padronizado em nosso laboratório não requer equipamentos sofisticados e reagentes com alto grau de pureza. Através dessa metodologia foi possível medir a atividade da enzima tanase. Logo, o método escolhido é simples, rápido e reproduzível.

Além disso, foi possível observar que o método apresentou um bom ajuste dos dados experimentais, posto que o coeficiente de determinação (R²) obtido ficou muito próximo de 1, aproximadamente 0,999. Portanto, a curva de calibração está expressa de forma linear com os pontos obtidos das concentrações das soluções analisadas. Utilizando-se a equação fornecida pela referida curva, foi possível calcular a concentração da substância que se deseja, neste caso, foi a atividade da enzima tanase, um composto bioativo de grande interesse da indústria química, farmacêutica e alimentícia.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. H. et al. Utilização de resíduo da indústria cervejeira na produção de enzima através da fermentação sólida. In: VII Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e

Desenvolvimento, 2018, Taubaté-SP. Anais do III Projeto de Pesquisa e Inovação. Taubaté: Unitau, 2018.

ANDRADE, P. M. L. et al. Influência de Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de Tanase por Fungo Isolado de Cacau no Sul da Bahia. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 12., 2016, Rio Grande do Sul. Anais do XII ENZITEC. Rio Grande do Sul: Universidade de Caxias do Sul (UCS), 2016.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. **Fonte e aplicações de taninos e tanases em alimentos. Alimentos e Nutrição**, v. 25, n. 1, p. 63-72, Araraquara, 2004.

BATTESTIN, V. Produção, purificação e aplicação de tanase de *Paecilomyces variotii*. Tese de doutorado - Unicamp - SP, 2007.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A.; FREITAS, V. A. P. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii*. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p.228-233, 2008.

CECCHI, H. M.; Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2ª ed. rev. - Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2003. COIMBRA, D. A.; SÓTER, M. O.; FREITAS, D. F. Determinação dos teores de ácido acetilsalicílico em amostras de plasma por espectrofotometria. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 11, n. 2, p.251-255, dez. 2013.

CORRÊA, A. C. Desenvolvimento de metodologia espectrofotométrica como alternativa para determinação do ácido 5-aminosalicílico em medicamentos. 2018. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

CRUZ JÚNIOR, Américo. Estudo da Atividade Enzimática de Lacase Imobilizada em Quitosana. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

HARRIS, C Daniel. Análise Química Quantitativa. Fundamentos da Espectrofotometria. 6ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. P. 398-423. KIELING, D. D. Enzimas: Aspectos Gerais. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2002.

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

PEREIRA, F. K. P.; FACCIIO, M. T.; SANTO, J. A. M; ALMEIDA, C. L. A.; ARAÚJO, M. L. M; SILVA, R. O; ARAUJO, F. T. S. Construção de curva de calibração por padrão externo para determinação de teor de cobre em água potável da cidade Brejo do Cruz - Paraíba por Espectrofotometria de Absorção Molecular. In: 5º Congresso Norte-Nordeste de Química. Natal - RN - UFRN, 2013.

SÁ, E. S. Determinação espectrofotométrica de ácido salicílico em produtos dermatológicos. 2006. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences - JCEC**, Online, v. 4, n. 2, 2018. ISSN: 2527-1075.

TEIXEIRA, M. C. V.; VAZ, L.; BATTESTIN, V. Uso da biotecnologia na produção de enzimas. In: VI Congresso Internacional de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento, 2017, Taubaté -SP. Anais do XXII Encontro de Iniciação Científica, 2017.

TEIXEIRA, M. C. V. et al. Tanase: uma revisão das aplicações e perspectivas. **Scientia Vitae**, v. 6, n. 22, p.24-32, dez. 2018.

VALERA, L. S. Produção e Caracterização das Tanases do Fungo Filamentoso *Aspergillus carbonarius*. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Química, Unesp, Araraquara, 2014.

VAZ, L. S. et al. Construção de curva de calibração para determinação de atividade enzimática. In: 8º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP (8º CONICT), 8., 2017, Cubatão: IFSP, 2017.