

ANEXO

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

I - CONSIDERAÇÕES GERAIS:

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

II - PRINCÍPIO:

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

III - EQUIPAMENTOS:

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

IV - MATERIAL UTILIZADO:

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

V - REAGENTES:

- a) Tris (tris-hidroximetil-aminometano);
- b) Ácido clorídrico 37%;

c) Ácido tricloroacético (TCA);

d) Azocaseína.

VI - PREPARO DE SOLUÇÕES:

a) Solução de ácido clorídrico 1 M

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

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

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

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

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

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

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

VII - MÉTODO DE ENSAIO.

a) Preparo da amostra

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

b) Ensaio da amostra:

1. Em um microtubo de 2mL, adicionar 200mL de tampão tris-HCl 0,05M e 100mL do substrato (azocaseína 2%);

2. Incubar em banho-termostático a $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ e deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos);

3. Adicionar 100mL da amostra a temperatura ambiente, preparada conforme item VII a nos microtubos, em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições, e incubar no banho por 15 minutos na mesma temperatura;

4. Parar a reação adicionando 800mL de TCA 20% observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (15 minutos) seja o mesmo em todos os microtubos;

5. Em seguida, centrifugar os microtubos a 6000g (no mínimo) por 5 minutos, recolher o sobrenadante e ler em espectrofotômetro a 400nm;

c) Ensaio do branco da amostra:

1. Preparar um branco adicionando em um microtubo de 2mL, 200mL de tampão tris-HCl 0,05M, 100mL de azocaseína 2% e 800mL de TCA 20%;

2. Acondicionar em banho-termostático a $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$, deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos);

3. Adicionar 100mL de amostra e deixar no banho por 15 minutos a mesma temperatura;

4. Em seguida centrifugar os microtubos a 6000g (no mínimo) por 5 minutos, recolher o sobrenadante e ler em espectrofotômetro a 400nm.

VIII - RESULTADO.

a) Definição da Unidade de Atividade Proteolítica ($\text{UP} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$):

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

b) Cálculo do resultado:

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

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

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

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

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

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

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

I - CONSIDERAÇÕES GERAIS:

a) Todos os reagentes utilizados nos ensaios devem ser de grau analítico;

b) Todos os ensaios devem ser realizados no mínimo em triplicata, utilizando um branco para cada amostra;

c) São adotadas as seguintes Condições Padrões de Ensaio:

1. Temperatura de incubação: $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$.

2. Sistema tamponante: citrato-fosfato 0,05M pH 6,0.

3. Tempo de reação: 30 minutos.

II - PRINCÍPIO:

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

III - EQUIPAMENTOS:

a) Espectrofotômetro UV/VIS;

b) Banho-termostático;

c) Placa de aquecimento.

IV - MATERIAL UTILIZADO:

a) Béqueres;

b) Balões volumétricos;

c) Pipetas volumétricas de 15mL;

d) Provetas;

e) Micropipetas para volumes de 10 a 5000mL;

f) Tubos de ensaio com capacidade mínima de 25mL com tampa;

g) Cubetas para espectrofotômetro com 1cm de caminho óptico.

V - REAGENTES:

a) Amido solúvel;

b) Ácido cítrico;

c) Fosfato de sódio dibásico;

d) Glicose;

e) Hidróxido de sódio;

f) Tartarato de sódio e potássio;

g) Metabissulfito de sódio;

h) Fenol;

i) Ácido 3,5-dinitrosalicílico;

VI - PREPARO DE SOLUÇÕES:

a) Solução de ácido cítrico 0,05M: dissolver 1,05g de ácido cítrico em 100mL de água destilada.

b) Solução de fosfato de sódio dibásico 0,05M: dissolver 1,38g de fosfato de sódio dibásico em 100mL de água destilada.

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

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

e) Solução padrão de glicose $55,6 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1% m/v): dissolver 1g de glicose em 100mL de água destilada, considerando a pureza do reagente.

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

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

VII - MÉTODO DE ENSAIO.

a) Curva analítica de glicose:

1. Transferir 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140mL da solução glicose a $55,6 \text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ para tubos de ensaio com tampa;

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

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

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

3. Adicionar 1,5 mL de reagente DNS;

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

5. Após os 5 minutos de fervura, resfriar os tubos transferindo-os para outro becker contendo água a temperatura ambiente;

6. Após resfriamento dos tubos de ensaio, adicionar 15 mL de água destilada em cada tubo de ensaio;

7. Agitar os tubos de ensaio fechados;

8. Ler em espectrofotômetro a 550nm;

9. Construir uma curva analítica para glicose (concentração de glicose [mmol] vs. absorbância), utilizando o primeiro ponto como zero do equipamento, conforme tabela 1;

10. Construir a equação da reta, para cálculo posterior.

NOTA: a concentração de açúcares redutores será expressa em $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ de glicose.

b) Preparo da amostra

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

c) Ensaio da amostra:

1. Em um tubo de ensaio com tampa, adicionar 300mL de tampão citrato-fosfato 0,05M e 200mL de solução de amido solúvel 1%.

2. Incubar em banho-termostático a $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$, deixar atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente de 1 a 2 minutos).

3. Realizar um branco para cada replicata, com adição de amostra, substituindo o volume do substrato por tampão. Este deve ser lido juntamente com a amostra;

4. Realizar um branco sem adição de amostra, substituindo o volume da amostra por tampão. Será utilizado para zerar o equipamento, no comprimento de onda do ensaio;

5. Adicionar em cada tubo de ensaio 100mL de amostra a temperatura ambiente, preparada conforme item VII b, em intervalos de tempo previamente estipulados (15 a 30 segundos) entre as adições, e deixar no banho-termostático por 30 minutos;

6. Parar a reação adicionando 1,5 mL de reagente DNS, observando os intervalos estipulados (15 a 30 segundos) para que o tempo de reação (30 minutos) seja o mesmo em todos os tubos de ensaio.

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

8. Após os 5 minutos de fervura, resfriar os tubos transferindo-os para outro becker contendo água a temperatura ambiente;

9. Após resfriamento dos tubos de ensaio, adicionar 15 mL de água destilada em cada tubo de ensaio;

10. Agitar os tubos de ensaio fechados;

11. Ler em espectrofotômetro a 550nm;

12. Determinar a concentração de açúcares redutores utilizando a curva analítica de glicose.

VIII - RESULTADO.

a) Definição da Unidade de Atividade Amilolítica ($\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$):

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

b) Cálculos:

Cálculo da Concentração na curva analítica (mmol/mL):

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

ONDE:	C	concentração, em $\text{Mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$
	(ABS_{AM})	valor da leitura na amostra, em nm
	(ABS_{BR}^*)	valor da leitura no branco, em nm
	b	coeficiente linear
	a	coeficiente angular

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

Cálculo da atividade amilolítica:

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

ON-DE:	C	concentração de açúcares redutores na amostra (Mmol), determinada através da curva analítica de glicose.
--------	----------	--

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

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

ON-DE:	C	concentração de açúcares redutores na amostra (Mmol), determinada através da curva analítica de glicose.
	fd	fator de diluição da amostra, quando houver.

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