

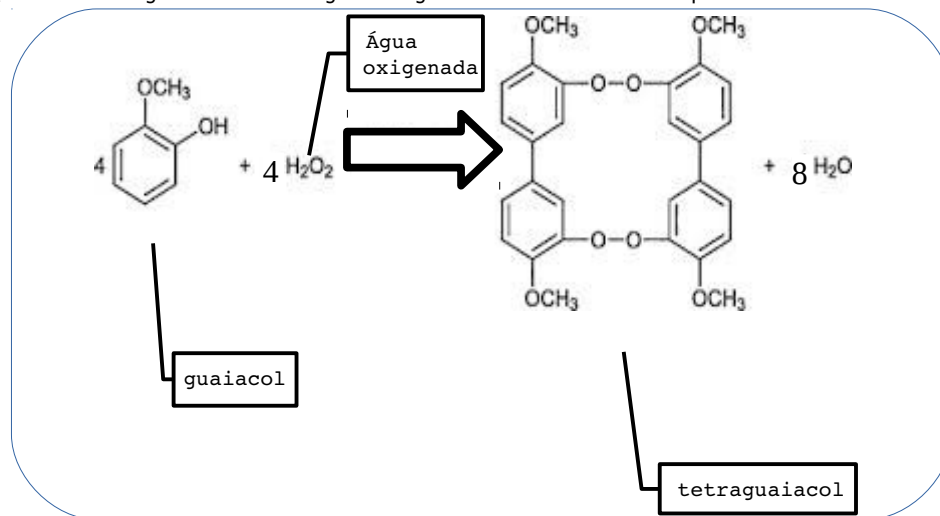
Prática Enzimas I

Introdução

A medição da atividade enzimática é prática cotidiana em laboratórios de Biologia Molecular, Farmácia e Bioquímica, e Tecnologia de Alimentos, entre outros. Em grande parte das vezes, acompanha-se o taxa de reação, e a eficiência da enzima, pela variação colorimétrica (ou absorciométrica) associada à variação na concentração do reagente ou do produto. Os valores de absorbância são então o ponto de partida para a determinação da velocidade inicial da reação e, conseqüentemente, os parâmetros de eficiência de catálise - $V_{máx}$ e K_M .

Utilizaremos na prática de hoje extrato de repolho roxo como fonte da enzima PEROXIDASE, uma óxido-redutase que transfere elétrons de diferentes tipos de moléculas derivadas do fenol e amins aromáticas (guaiacol, resorcinol, p-cresol, anilina, benzidina, etc) para moléculas da água oxigenada. O composto oxidado absorve, via de regra, em faixa do visível diferente das moléculas reduzidas. No nosso caso, o coeficiente de absorvidade molar do tetraguaiacol a 470nm é 26600 , o que significa que uma solução de tetraguaiacol 1M teria uma absorbância numa cubeta de 1cm a 470nm igual a 26600.

A reação entre o guaiacol e a água oxigenada encontra-se esquematizada abaixo:



Material

guaiacol 0.5%
água oxigenada 0.3%
extrato de repolho roxo (E.R.R.) (150 gramas de repolho roxo em 150 mL de água destilada)
Tampão acetato de sódio 0.2 M pH = 4.8
copos descartáveis
pipetas 1, 5 e 10 mL
proveta 25 mL
béqueres
pera
pisseta
pHmetro
espectrofotômetro
cubeta vidro ou plástico
pipeta Pasteur

Procedimento

- 1) prepare 10 mL de uma diluição 1:20 de E.R.R. em tampão acetato 0.2 M pH=4.8 . Daqui para frente essa diluição será denominada D1:20
- 2) monte em copinhos descartáveis os seguintes sistemas de reação (volumes em mL) [ATENÇÃO – a ordem de adição em cada tubo é:

PRIMEIRO ÁGUA DESTILADA (se houver); SEGUNDO ÁGUA OXIGENADA, TERCEIRO GUAIACOL (se houver), ÚLTIMO D1:20

	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>
guaiacol 0.5%	0	0.1	0.2	1	2
água oxigenada 0.3%	2	2	2	2	2
D1:20	1	1	1	1	1
água destilada	2	1.9	1.8	1	0

- 3) Após a adição (FEITA DE MODO MUITO RÁPIDO!) do D1:20 (ou seja, quando começa a reação) misture ENERGICAMENTE o sistema usando uma pipeta Pasteur e transfira o sistema para uma cubeta já no espectrofotômetro. Todo o procedimento tem que ser feito rapidamente pois a primeira leitura será aos 20 segundos depois de a primeira gota de D1:20 ser adicionada!
- 4) Meça a absorbância a 470nm de 20 em 20 segundos contados a partir do **início** da adição do D1:20 (por isso a agitação tem que ocorrer o mais rápido possível!) durante 5 minutos.
- 5) Construa um gráfico com quatro curvas (ou retas talvez, uma para cada sistema de reação) relacionando absorbância por tempo de reação
- 6) Construa outro gráfico relacionando nas abscissas as concentrações percentuais de guaiacol no início da reação em cada um dos quatro sistemas, e nas ordenadas os valores de absorbância dos quatro sistemas no tempo de 1 minuto

Questões para discussão

- 1) O que é uma reação de óxido redução?
- 2) Qual a finalidade do gráfico de absorbância por tempo de reação?
- 3) Qual o significado da constante de Michaelis?
- 4) Quais estratégias você sugere para interromper a reação no tempo 30 segundos?