



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Biologia Molecular

Laboratório Didático de Bioquímica



## PRÁTICA – CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ENZIMAS

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Disciplina: \_\_\_\_\_ Curso: \_\_\_\_\_

- Além das medidas de biossegurança que você já sabe, você deverá ter cautela com a água fervente do banho-maria.

FIQUE ATENTO

### I. OBJETIVOS:

- Familiarizar-se com algumas peculiaridades da catálise enzimática tais como especificidade e temperatura e pH ideais;
- Avaliar o efeito de inibidores sobre a atividade catalítica da alfa-amilase salivar.

### II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As enzimas, em sua maioria, são de natureza proteica e, portanto, necessitam de sua conformação nativa (estrutura tridimensional correta) para exercerem adequadamente suas propriedades catalíticas. Alguns fatores como temperatura e pH extremos exercem grande influência sobre a atividade enzimática uma vez que podem provocar danos à estrutura da enzima, ocasionando um processo conhecido como desnaturação proteica.

Outro fator que influencia a atividade catalítica das enzimas é a sua interação com o substrato. Essa especificidade reflete diretamente na aceleração da reação que é o principal atributo das enzimas dentro de uma reação química.

As enzimas também sofrem influência de substâncias que podem atuar ativando ou inibindo sua atividade. Essas moléculas são conhecidas como ativadores e inibidores enzimáticos, respectivamente. Os inibidores enzimáticos são moléculas que diminuem a atividade da enzima, de forma reversível ou irreversível, através de mecanismos que não ocasionam a desnaturação da mesma.

### III. PROCEDIMENTO

#### PREPARO DA AMOSTRA:

- Selecionar um voluntário saudável e solicitar que o mesmo enxague a boca com água da torneira (na pia do banheiro) e, em seguida, umedeça um chumaço de algodão;
- Colocar o algodão úmido no canto da boca por 2 min., enquanto isso, salive bastante sobre o algodão;
- Retirar o algodão e lavá-lo em um béquer pequeno com 6 ml de salina fisiológica. Em seguida, utilize os dedos para umedecer e espremer o algodão a fim de retirar o máximo de saliva possível.
- A solução de saliva diluída resultante será utilizada para os testes.

### a) ESPECIFICIDADE

Numerar 3 tubos de ensaio e desenvolver a seguinte técnica:

- Adicionar os reagentes aos tubos e em seguida levar os três tubos para o banho maria;
- Temperatura de incubação: 30 - 37°C;
- pH: constante;
- Tempo de incubação: 15min.

TUBOS	AMIDO 2% (ml)	SACAROSE 2% (ml)	CELULOSE 2% (ml)	ENZIMA (ml)
1	2,0	-	-	0,5
2	-	2,0	-	0,5
3	-	-	2,0	0,5

Decorrido o tempo de incubação, acrescentar 1mL do reativo de Benedict a cada tubo, agitar levemente e levar ao banho maria a 100 °C durante 5 min. Observar o resultado.

### b) EFEITO DO pH

Numerar 3 tubos de ensaio e desenvolver a seguinte técnica:

- Adicionar os reagentes aos tubos e em seguida levar os três tubos para o banho maria;
- Temperatura de incubação: 30 - 37°C;
- pH: variável;
- Tempo de incubação: 15 min.

TUBOS	AMIDO 2% (ml)	TAMPÃO pH 2,0 (ml)	TAMPÃO pH 7,0 (ml)	TAMPÃO pH 10 (ml)	ENZIMA (ml)
1	2,0	2,0	-	-	0,5
2	2,0	-	2,0	-	0,5
3	2,0	-	-	2,0	0,5

Decorrido o tempo de incubação, adicionar duas gotas de lugol em cada tubo e agitá-los. Observar os resultados.

### c) EFEITO DA TEMPERATURA

Numerar 3 tubos de ensaio e desenvolver a seguinte técnica:

- Adicionar os reagentes aos tubos e levar cada tubo para uma temperatura diferente (banho fervente, banho a 37°C e geladeira);
- Temperatura de incubação: variável;
- pH: constante;
- Tempo de incubação: 20 min.

TUBOS	AMIDO 2% (ml)	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)	ENZIMA (ml)
1	2,0	30-37	0,5
2	2,0	0-10	0,5
3	2,0	70-100	0,5

Decorrido o tempo de incubação, adicionar duas gotas de lugol em cada tubo e agitá-los. Observar os resultados.

#### **d) EFEITO DE INIBIDORES E ATIVADORES**

Numerar 3 tubos de ensaio e desenvolver a seguinte técnica:

- Adicionar os reagentes aos tubos e em seguida levar os três tubos para o banho maria;
- Temperatura de incubação: 30 – 37 °C;
- pH: constante;
- Tempo de incubação: 15 min.

TUBOS	AMIDO 0,5% (ml)	NaCl 0,9% (ml)	CuSO <sub>4</sub> 5% (ml)	ENZIMA (ml)
1	2,0	-	-	0,5
2	2,0	1,0	-	0,5
3	2,0	-	1,0	0,5

Decorrido o tempo de incubação, adicionar duas gotas de lugol em cada tubo e agitá-los. Observar os resultados.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

SOUZA, K. A. F. D.; NEVES, V. A. Fatores que afetam a atividade enzimática. Disponível em: [http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas\\_proteinas/atividade\\_enzimatica.htm](http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/atividade_enzimatica.htm)

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.