

Enzimas – Efeito do tempo

Objetivos:

- 1) Demonstrar experimentalmente o estudo da cinética enzimática usando a invertase como enzima-modelo
- 2) Analisar o efeito do tempo de incubação sobre a atividade enzimática
- 3) Calcular a velocidade inicial de uma reação enzimática;

Considerações

Reação da invertase e dosagem de açúcares redutores pelo método do 3,5 dinitro salicilato (DNS)

A sacarase ou invertase é uma enzima que catalisa a hidrólise da molécula de sacarose em α -D-glicose e β -D-frutose. Estas unidades de hexoses resultantes, em meio fortemente alcalino e a quente, formam enedióis. Estes, por sua vez, podem ceder elétrons para reduzir o reagente 3,5 dinitrosalicilato (de cor amarela forte) a 3-amino-5-nitrosalicilato (de cor laranja marrom forte). Cada mol de açúcar redutor presente na solução formará 1 mol de 3-amino-5 nitrosalicilato. Pela determinação da luz absorvida a 540 nm pelo 3-amino-5-nitrosalicilato, é possível determinar a concentração de açúcar redutor presente na solução. A sensibilidade da técnica de determinação de açúcar redutor pelo DNS é de 1-20 mmol de glicose.

Cinética enzimática

Enzimas são proteínas que catalisam reações que, sob condições naturais, seriam muito lentas. O aumento da velocidade de uma reação se deve à diminuição de energia livre de ativação. A cinética enzimática tem por objetivo a compreensão do mecanismo de ação das diferentes enzimas e da velocidade das reações por elas catalisadas. Este estudo também avalia as alterações na velocidade da reação em resposta a modificações de parâmetros experimentais, como a concentração de substrato, o tempo de incubação, a temperatura de incubação ou a variação do pH.

Materiais:

Sacarose 0,02 M

Invertase em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,7

Tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,7

Reagente 3,5 dinitro salicílico (DNS) em meio alcalino

Banho maria

Espectrofotômetro

Curva padrão de glicose:

Glicose	Abs 540 nm	Abs 540 nm	Abs 540 nm

Procedimento

Efeito da variação do tempo de incubação

1. Organizar uma bateria com cinco tubos de ensaio e identificá-los com números de 1 a 5.
2. Adicionar os reagentes conforme a tabela

	Tubo	tubo	tubo	tubo	tubo
	1	2	3	4	5
Reagentes (ml)					
Tampão acetato (50 mM pH 4,7)	1	1	1	1	1
Água	1	0,8	0,8	0,8	0,8
Sacarose (0,2M)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solução de enzima (0,05 mg/ml)	-	0,2	0,2	0,2	0,2

ATENÇÃO: a enzima é sempre a última adição

- 4) Marcar 5 minutos (tubo 2), 10 min (tubo 3), 15 min (tubo 4) e 20 min (Tubo 5) imediatamente após adição da enzima.
- 5) Adicionar 1,0 ml de DNS ao tubo 1
- 6) Imediatamente após os tempos de incubação adicionar 1 ml de DNS.
- 7) Ao término da incubação do tubo 5, levar a bateria de tubos para aquecer em banho fervente durante 5 minutos.
- 8) Deixar esfriar por 5 minutos
- 9) Se necessário diluir com água destilada antes de fazer a leitura
- 10) Calibrar o espectrofotômetro com o tubo 1
- 11) Proceder a leitura de absorbância dos demais tubos

Resultados e discussão

- 1) Construa um gráfico relacionando as concentrações das soluções-padrão (mM) com seus respectivos valores de absorbância
- 2) Determine a equação de regressão da reta e o seu coeficiente de regressão
- 3) Traçar o gráfico: tempo (min) x absorbância (ordenada)
- 4) Interpretar o resultado
- 5) Usando a curva de calibração obtida, determinar calcular a atividade da invertase em UI/ml.