

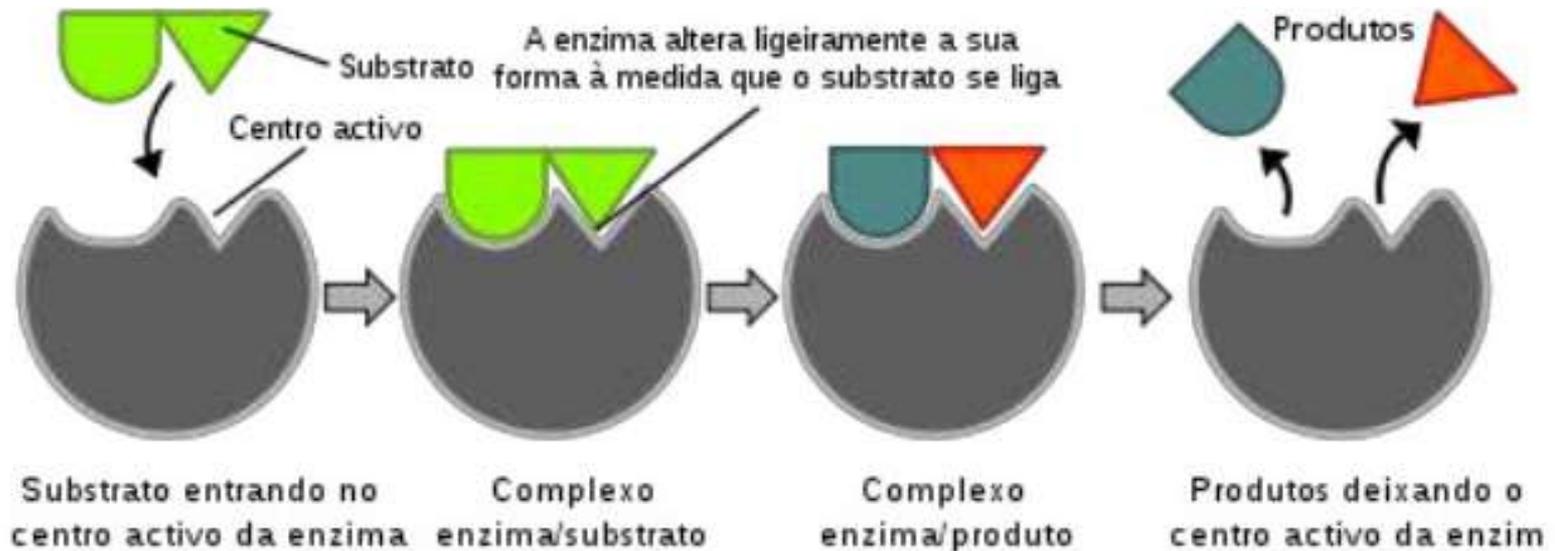
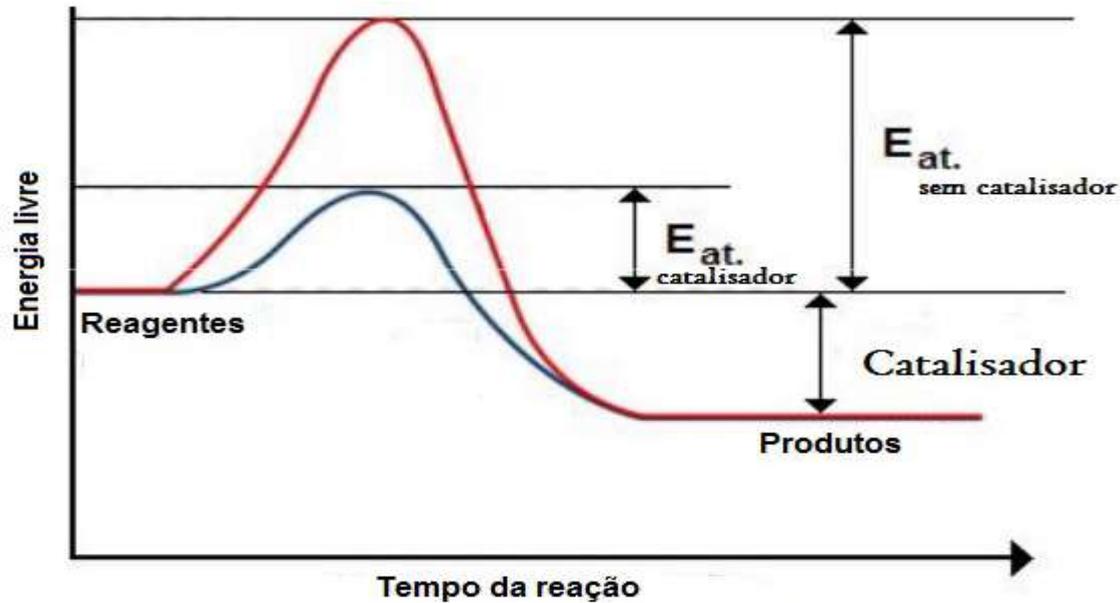
***Bioquímica para Ciências Biológicas* Código: 5920976**

Professor responsável: María Eugenia Guazzaroni

Com a colaboração e assistência técnica de: Thalita
Aparecida Riul Prado

Aula prática: Avaliação da atividade enzimática da catalase (de *Escherichia coli*) frente a fatores de interferência na cinética enzimática, especificamente a temperatura.

CINÉTICA QUÍMICA ENZIMÁTICA



Alguns fatores comuns que interferem na velocidade da reação enzimática

- Concentração do substrato'
- pH



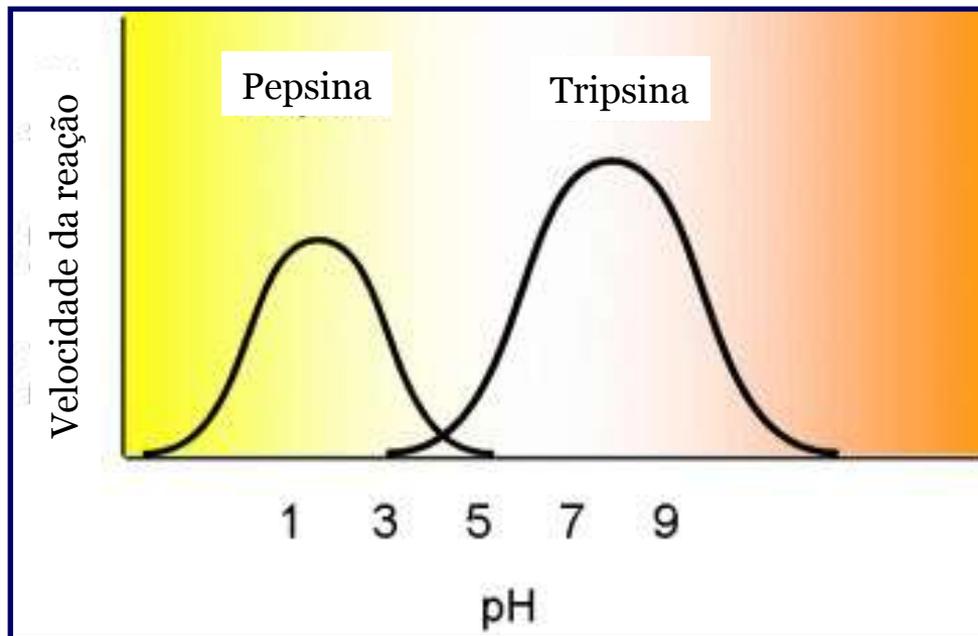
- Temperatura

Efeito do pH

Enzimas apresentam um intervalo de pH ótimo para a catálise

- Conformação do sítio catalítico;
- Ligação do substrato no ativo;
- Transformação de substrato em produto.

- Desnaturação;
- pH ótimo;



Reflete o ambiente onde a enzima normalmente é encontrada

- Pepsina: estômago (acidez)
- Tripsina: intestino (alcalinidade)

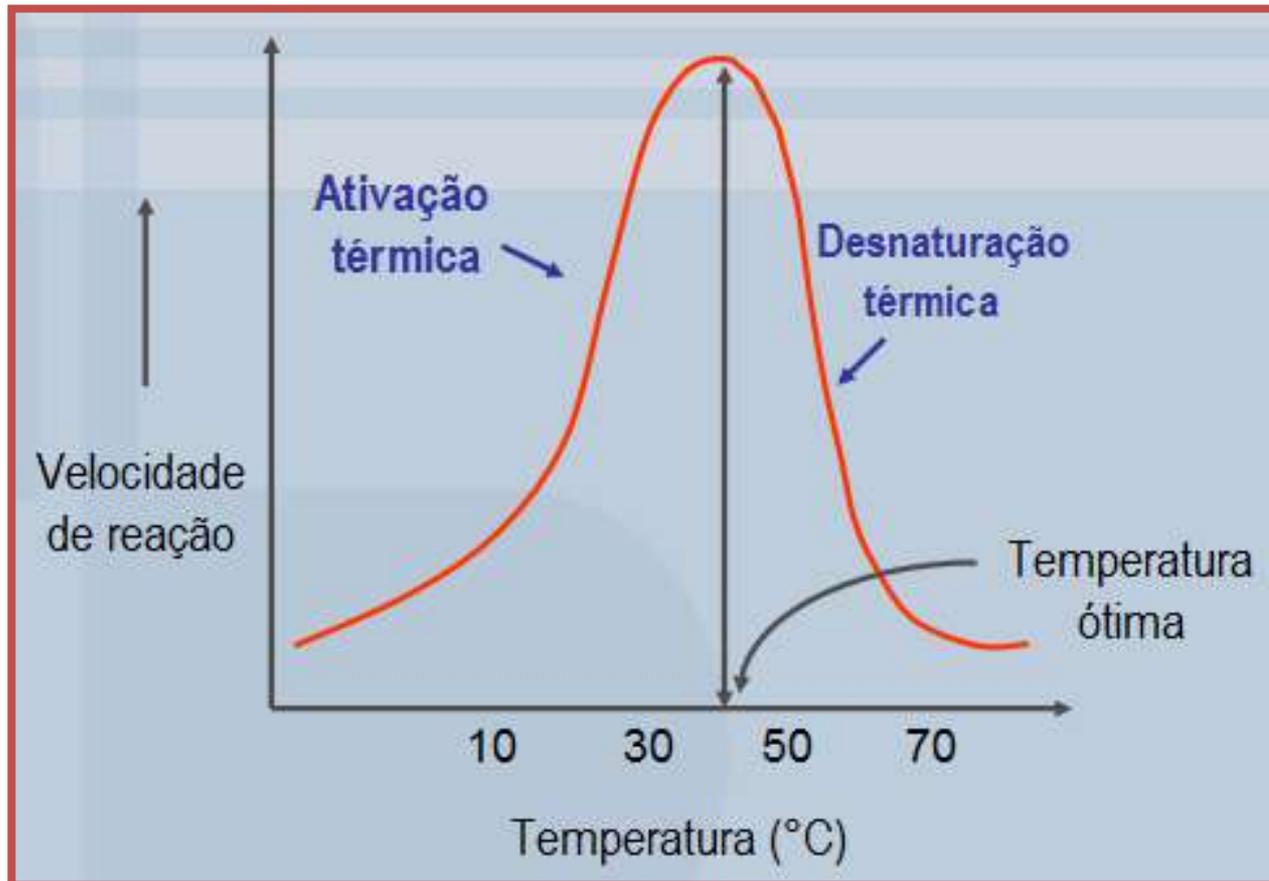
pH ótimo para cada enzima de acordo com o ambiente em que é encontrada:

Enzima	pH ótimo
Pepsina (estômago)	1,5 a 1,6
Tripsina (intestino)	7.8 a 8,7
Amilase (pâncreas)	6,7 a 7,0
<u>Catalase (sangue, fígado, rins)</u>	<u>7,0</u>
Amilase (boca)	4,6 a 5,2

Efeito da Temperatura

• Temperatura ótima: teoria de Arrhenius;

- **Ativação térmica**: a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas;
- **Desnaturação térmica**: a estabilidade da proteína decresce devido a desativação térmica.



A variação da energia livre de Gibbs (G) é bom parâmetro para prever a espontaneidade das reações

Lembram da equação?

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

onde: **H** é a ENTALPIA, **T** a temperatura absoluta (em K^o) e **S** é a ENTROPIA

A variação de energia livre de Gibbs de quaisquer concentrações iniciais dos reagentes é dada por:

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \left(\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \right) \quad \left\{ \begin{array}{l} R = \text{constante dos gases} \\ T = \text{temperatura absoluta} \\ \text{(em K)} \end{array} \right.$$

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln K_{eq}$$

$\Delta G^{\circ'}$ \Rightarrow **variação de energia livre padrão**, é uma constante física específica de cada reação; concentração de 1M de todos os reagentes, 25 °C e pH 7).

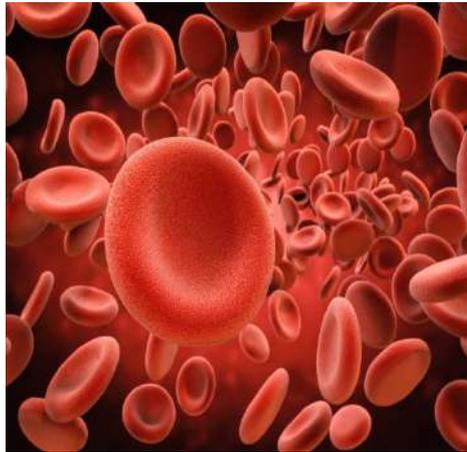
$\Delta G'$ \Rightarrow **variação de energia livre da reação** em energia/ mol

$\Delta G'$ real é muito diferente da $\Delta G^{\circ'}$ em condições padrão

A nossa prática pretende mostrar a influência da temperatura na atividade enzimática em condições celulares, que são diferentes da padrão.

Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Objetivo: Observar o efeito da **TEMPERATURA** na atividade da enzima CATALASE.



Catalase



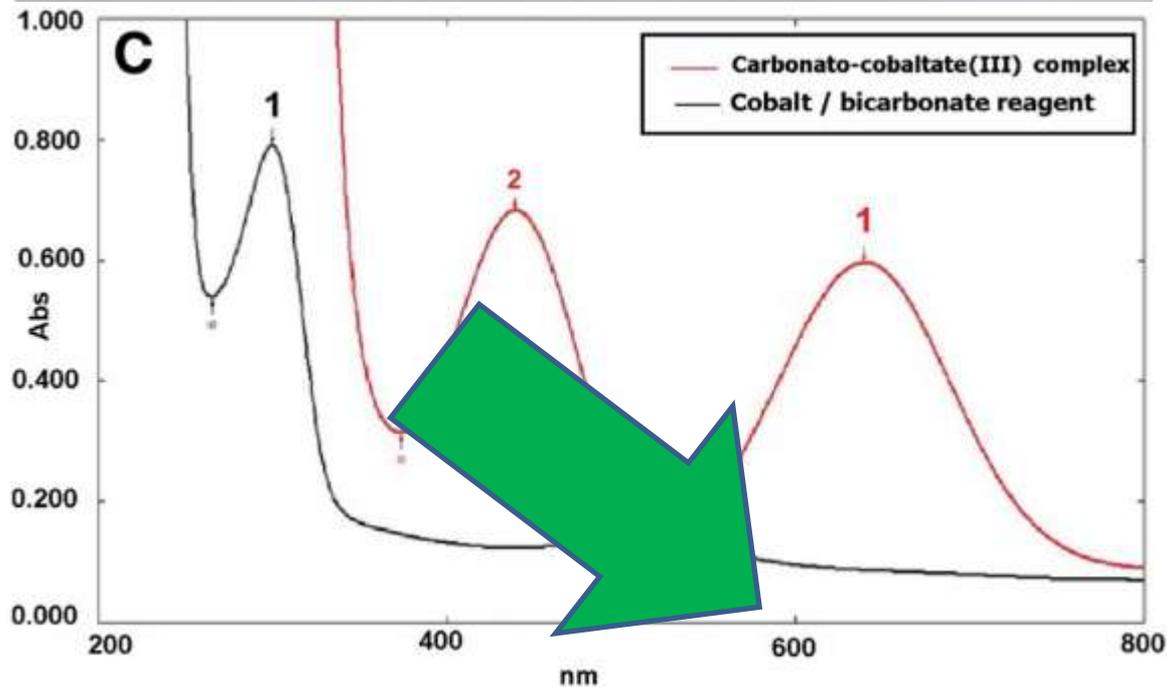
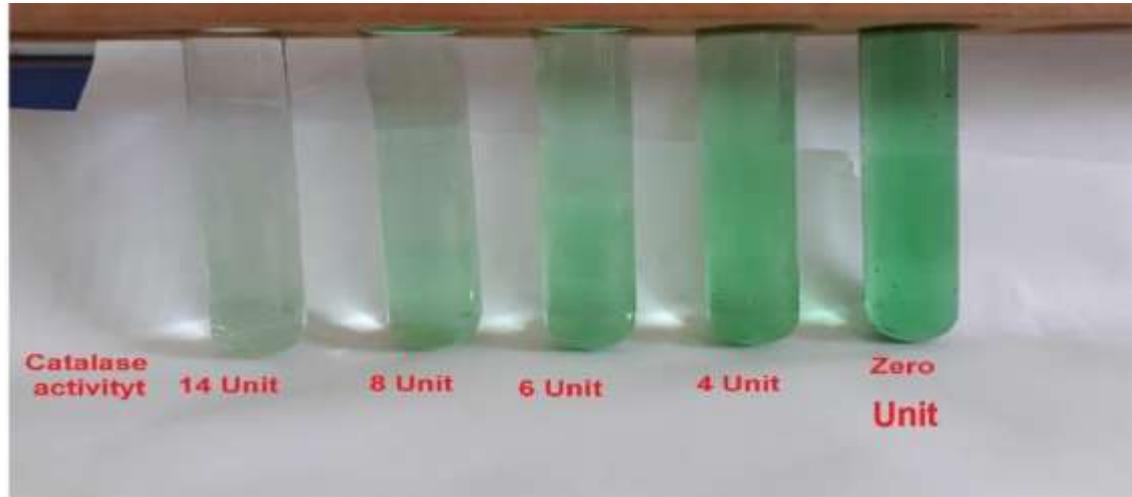


Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Método:

- Fundamento: o princípio do método é avaliar a cinética da enzima de acordo com a quantidade de substrato consumido, frente às alterações de temperatura.
- Utilizaremos neste experimento o H_2O_2 como substrato para a enzima catalase (*E. coli*), cuja Temperatura ótima de catálise é $37^{\circ}C$.
- Amostras contendo H_2O_2 serão adicionadas com catalase (*E.coli*) e incubadas a diferentes temperaturas ($0^{\circ}C$ / $25^{\circ}C$ / $37^{\circ}C$ / $45^{\circ}C$ / $80^{\circ}C$), depois serão misturadas com a solução STOP (bicarbonato-cobalto II) o qual avaliará a **NÃO** reação do H_2O_2 com a catalase, uma vez que o H_2O_2 quando presente na amostra (sinal de que a catalase não o quebrou formando $H_2O + O_2$), reagirá com o Cobalto II na presença de íons bicarbonato, formando o produto cromógeno Cobalto complexo III (de cor verde oliva) e com um máximo de absorção a 600nm.
- Atividade da catalase é diretamente proporcional à dissociação do peróxido de hidrogênio, logo indiretamente proporcional à formação do cromóforo Cobalto complexo III.

Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática



Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Materiais:

- tubos de 2mL, previamente identificados;
- soluções;
- pipetas de 1000uL;
- ponteiras de 1000uL;
- gelo (para experimento à 0°C);
- 3 Blocos de banho seco (para experimento a 37°C / 45°C / 80°C);
- 25°C será à temperatura ambiente;
- cubeta para medição espectofotométrica;
- espectrofotômetro
- centrífuga para tubos.

Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Reagentes:

- solução de Cobalto II ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- solução de hexametáfosfato de sódio (Graham salt);
- solução de bicarbonato de sódio;
- solução H_2O_2 30%;
- água destilada;
- fonte de catalase (E. coli)

Solução
STOP

Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Procedimento:

- Ligar os blocos nas temperaturas desejadas (37°C / 45°C / 80°C) e a caixa de isopor com gelo (0 °C);
- OBS: o experimento à temperatura de 25 °C será feito no ambiente;
- Verificar a identificação dos tubos de 2mL: CONTROLE NEGATIVO/ TESTE
- Preencher os tubos de 2mL conforme a tabela a seguir e deixar que as misturas incubem por 10 minutos (para atingir as temperaturas desejadas);
- Prosseguir com a adição da fonte de catalase;
- Incubar por 15 minutos nas temperaturas desejadas;
- Adicionar a solução STOP (bicarbonato-cobalto II) que deve ser preparada na durante este período de 15' de espera, onde: **1,25mL de Cobalto II + 1,25mL de Hexametafosfo de sódio + 22,5mL de Bicarbonato de Sódio (necessariamente nesta ordem de adição dos componentes)**
- Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente;
- Centrifugar todas as amostras a 13000rpm/ 1';
- Prosseguir com a leitura no espectrofotômetro, inserindo 1000µL de cada solução na cubeta/vez. inicie pelo branco (água destilada) para “tarar” a leitura e prossiga com o teste e controle negativo até que todas temperaturas tenham sido medidas.

Reagentes	0 °C		25 °C		37 °C		45 °C		80 °C	
	Ctrl -	Teste								
Água	130	∅	130		130		130		130	
Fonte de H2O2	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260
Incubação por 10' para que os tubos atinjam as temperaturas desejadas										
Fonte de CATALASE	∅	130	∅	130	∅	130	∅	130	∅	130
Incubação de 15', nas temperaturas programadas, para as reações acontecerem										
Solução STOP	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1600
Incubação de 10', em temperatura ambiente, para posterior leitura do resultado										

* todas as medidas em microlitros.

Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Resultados e Conclusão:

- Preencher a tabela com os resultados do espectrofotômetro;

	<u>0°C</u>		<u>25°C</u>		<u>37°C</u>		<u>45°C</u>		<u>80°C</u>	
	Ctrl -	Teste	Ctrl -	Teste	Ctrl -	Teste	Ctrl -	Teste	Ctrl -	Teste
Leitura a 600nM										

Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Resultados e Conclusão:

- cálculo da atividade RELATIVA (%) da enzima:

Leitura CTRL- a 0°C + Leitura CTRL- a 25°C + Leitura CTRL- a 37°C
+ Leitura CTRL- a 45°C + Leitura CTRL- a 80°C

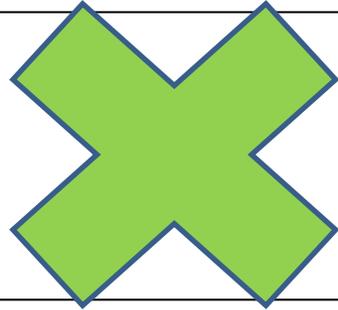
5 (número total de amostras)

- Resultado deste cálculo:

100% INATIVIDADE da enzima

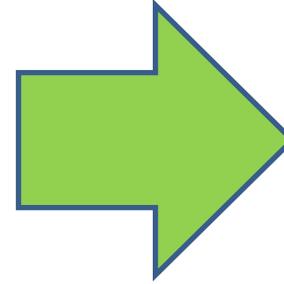
Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Média aritmética dos λ CTRL-



100% inatividade da catalase

X% inatividade da catalase



% de INATIVIDADE da enzima a 0 °C

λ TESTE a 0 °C

100%



% de INATIVIDADE da enzima a 0 °C



% de ATIVIDADE da enzima a 0 °C

Este cálculo deverá ser repetido com todas as temperaturas testadas

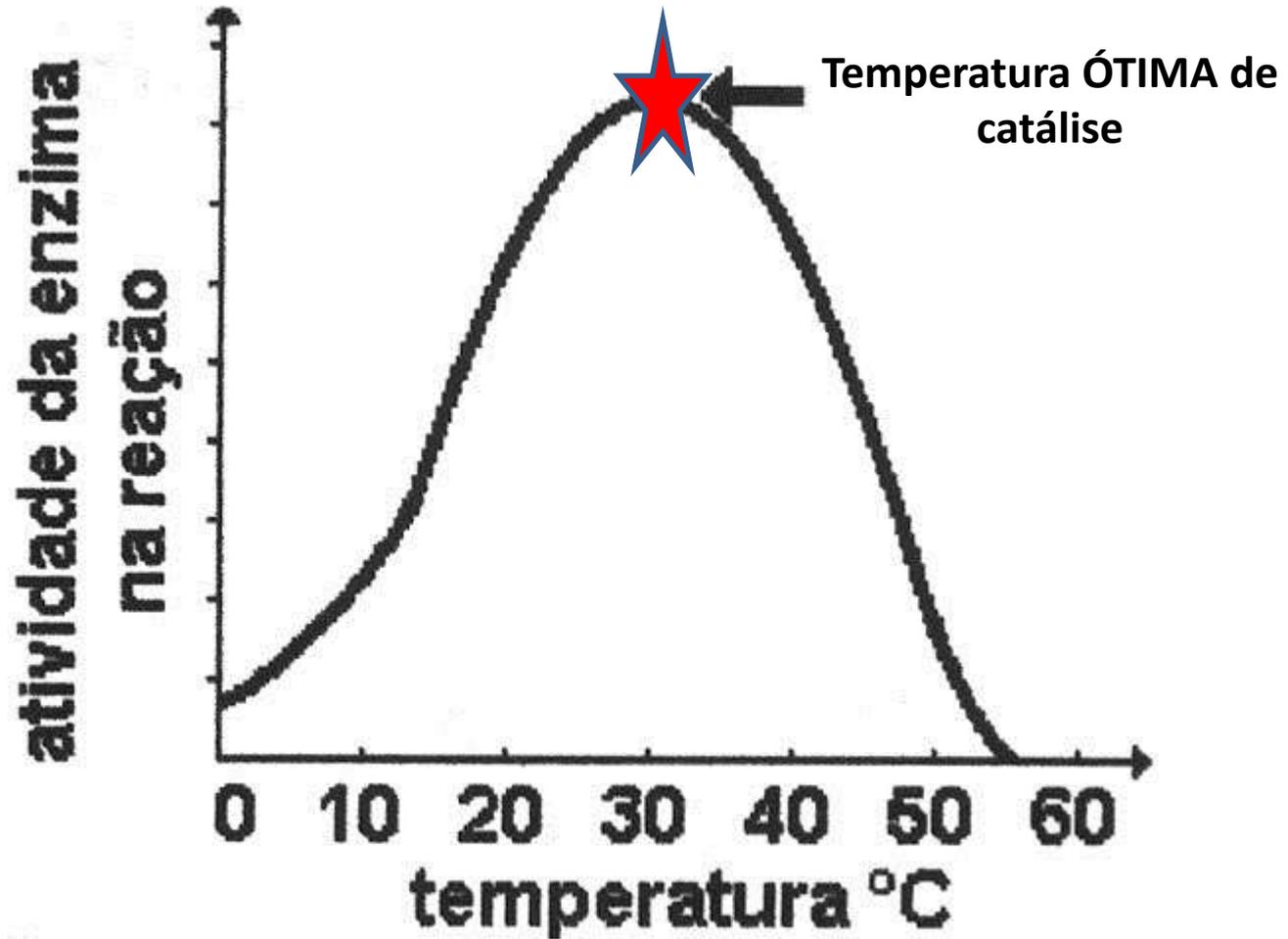
Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

Resultados e Conclusão:

- Preencher a tabela com os resultados dos cálculos da Atividade Relativa;

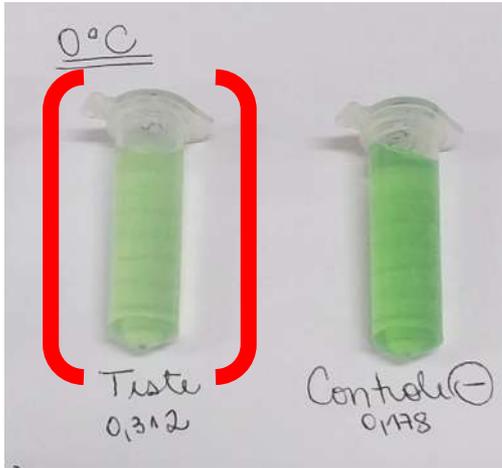
	<u>0°C</u>	<u>25°C</u>	<u>37°C</u>	<u>45°C</u>	<u>80°C</u>
% ATIVIDADE da enzima (Atividade Relativa)					

Atividade Prática: efeito da temperatura na atividade enzimática

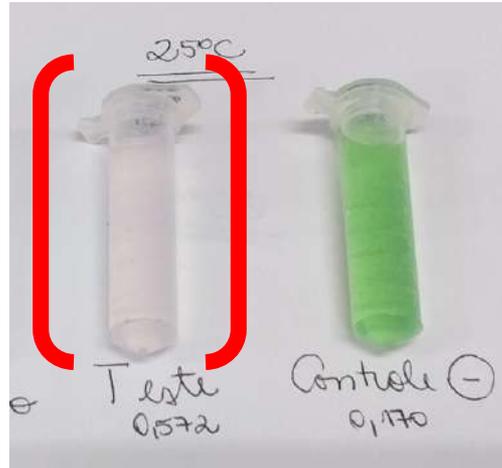


Atividade Prática:

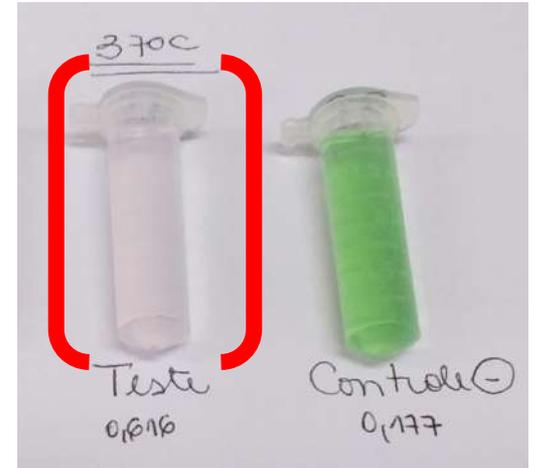
0°C



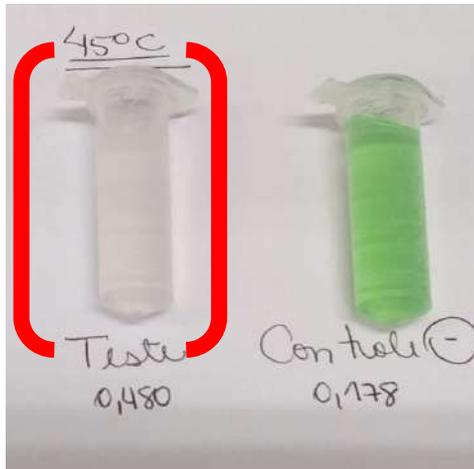
25°C



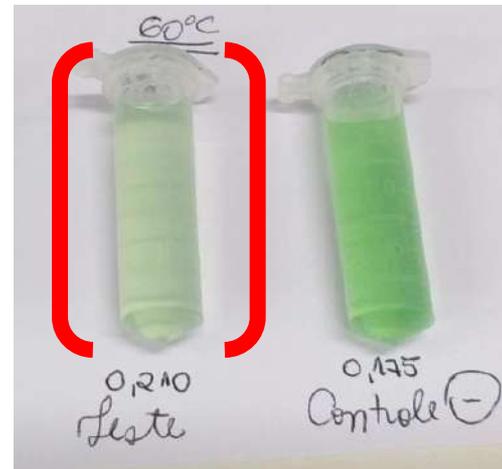
37°C



45°C



80°C



- Temperatura ótima: teoria de Arrhenius;

