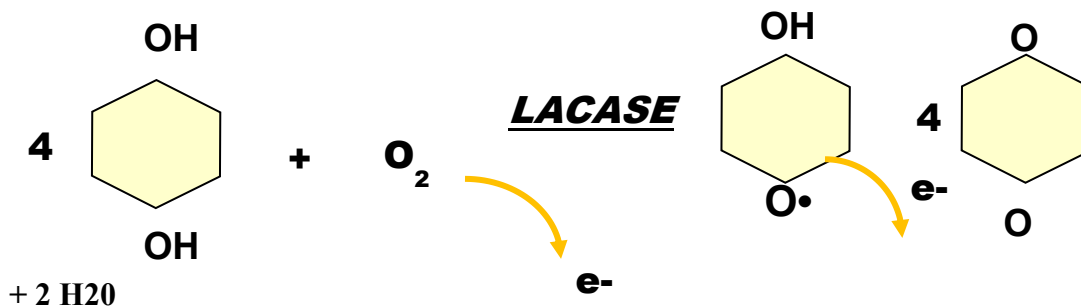


Cinética Enzimática e Atividade da Lacase

OBJETIVOS:

- Compreender o conceito de atividade enzimática.
- Medir a velocidade inicial de uma reação catalisada por lacase.
- Avaliar o efeito da concentração enzimática na velocidade de reação.



MÉTODOS

a) Determinação da atividade de Lacase

A atividade oxidativa fenoloxidase tipo lacase será determinada utilizando uma solução de **ABTS** (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) (Sigma – St. Louis, USA) 1,0 mM ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como substrato. A reação de oxidação é conduzida em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,8, e o aumento da absorbância, devido à oxidação do substrato, acompanhado durante 10 min no espectrofotômetro (SZKLARZ et al., 1989 - modificado).

- Ligue o espectrofotômetro segundo as instruções constantes do aparelho.
- Ajuste o aparelho para o comprimento de onda de 420 nm
- Precisamos fazer a cinética da reação (análise de absorbância no tempo) – ajustar o aparelho para essa função
- Ajuste o aparelho para A=0 (zero) com o volume do tubo branco (BA).

Soluções de ensaio	MR	BA
Tampão Citrato-fosfato (μl) (50mM, pH=4,8)	600	600
Solução ABTS (1 mM)	200	200
Água destilada	A definir	1200
Extrato enzimático (μl)	A definir	-

O volume final da reação (Vf) deve ser de 2 ml.

Testar dois volumes de extrato: 25 µl e 50 µl

Leitura espectrofotométrica:

- Espectrofotômetro ajustado para 420 nm.
- Registrar a variação da absorbância a cada 30 segundos por 5-10 minutos.

3. Análise de dados (1h)

- Plotar: Abs₄₂₀ x Tempo (min).
- Calcular a velocidade inicial (ΔAbs/min).
- Utilizar a **equação 1** para calcular a atividade em UI/L:

A atividade é expressa em unidades internacionais por litro (UI/l) de extrato fúngico e calculada pela equação 1.

$$\text{Atividade (UI/ l)} = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6 \times V_f}{\epsilon \times V_e \times 1\text{cm}} \quad (\text{equação 1})$$

○ Onde:

- $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ABTS)
- Vf = volume total (2 mL)
- Ve = volume de extrato enzimático (25 ou 50 µL)

Perguntas para responder:

- 1) Traçar o gráfico: tempo (min) x absorbância (ordenada)
- 2) Interpretar o resultado
- 3) calcular a atividade de lacase em UI/L.