

ACTIVIDADE LABORATORIAL – BIOLOGIA 12º Ano



Estudo de uma Enzima

O que se pretende

- 1 **Elaborar um protocolo experimental** adequado ao assunto em estudo – estudo de uma enzima.
- 2 **Seleccionar material adequado** ao estudo de uma enzima.
- 3 **Descrever o procedimento** necessário ao estudo de uma enzima.
- 4 **Observar a acção de uma enzima** sobre um substrato.
- 5 **Verificar a influência de vários tipos de factores** sobre a sua actividade enzimática.

Verificar significados...

- 6 Escrever **breves descrições** dos seguintes termos:

Termo	Breve descrição
Catalisador	Substância que facilita a interacção entre os reagentes de uma reacção química.
Biocatalisador	Catalisador biológico, também designado por enzima, que diminui a energia de activação da reacção química.
Enzima	Catalisadores biológicos, proteínas que actuam, fazendo diminuir a energia de activação necessária, aumentando a taxa da reacção.
Centro activo	Local de uma enzima onde se ligam os substratos de uma reacção química.
Substrato	Reagente de uma reacção química catalisada por uma enzima.
Complexo enzima-substrato	Conjunto formado entre a enzima e o(s) substrato(s), mantido temporariamente por ligações químicas fracas.
Especificidade absoluta	Quando as enzimas que só catalisam um único tipo de reacção se ligam apenas a um único substrato.

Termo	Breve descrição
Especificidade relativa	Quando as enzimas se conseguem ligar a grupos de substratos quimicamente semelhantes.
Cofactor	Molécula não-proteica que se liga a uma enzima, activando-a.
Coenzima	Cofactor de natureza orgânica necessário para funcionamento de uma enzima.
Apoenzima	Enzima não ligada ao cofactor e, como tal, não funcional.
Holoenzima	Enzima activa ligada ao cofactor.
Via metabólica	Conjunto de reacções químicas de uma célula que funcionam em cadeia.
Inibidor	Molécula que se liga a uma enzima e a impede de funcionar.
Inibição competitiva	Quando o inibidor se liga ao centro activo da enzima, competindo com o substrato.
Inibição alostérica	Quando o inibidor não se liga ao centro activo da enzima mas a outro local (centro alostérico).

Procedimento

7 Elaborar um **protocolo experimental** que contribua para o estudo laboratorial das enzimas.

7.1 Após uma pesquisa bibliográfica, **selecione uma determinada enzima** e **um factor** da mesma que queira estudar.

7.2 O protocolo experimental será para executar futuramente, pelo que deve ter em conta se o material que necessita existe na escola ou é de fácil aquisição.

7.3 Na construção do protocolo experimental, tenha em atenção:

- ➔ a selecção de uma determinada enzima, para a qual, teoricamente, deve conhecer as condições óptimas de actuação;
- ➔ a utilização do substrato;
- ➔ a utilização de um dispositivo de controlo;
- ➔ a manipulação de variáveis;
- ➔ um processo para evidenciar os resultados obtidos.

7.4.

7.4.1. No seu protocolo experimental, siga a seguinte estrutura:

- I Objectivo da actividade prática.
- II Listagem de procedimentos a efectuar.
- III Lista de material necessário para a execução da actividade prática.
- IV Sugestão de registo de resultados.
- V Sugestão de tópicos de discussão.

7.4.2. Execute o seu protocolo experimental.

7.4.

Protocolo Experimental

Estudo de uma Enzima: A POLIFENOLOXIDASE

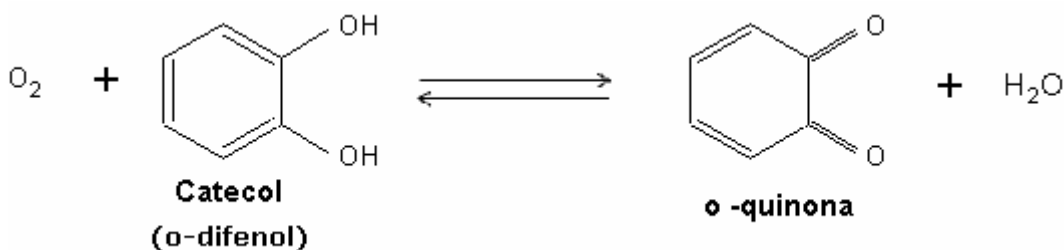
I Objectivos

- . Observação da acção da enzima polifenoloxidase sobre o catecol;
- . Análise da sua actividade por influência do pH.

Introdução

A enzima **polifenoloxidase** está presente quer nas células das plantas quer nas células dos animais. A batata, possui a enzima **polifenoloxidase**, responsável pelo escurecimento de frutos e vegetais depois de cortado e expostos ao ar. A esse processo dá-se o nome de *escurecimento enzimático*.

O mecanismo através do qual essa enzima actua baseia-se na oxidação de compostos difenólicos (que possuem dois radicais hidroxilo, -OH, ligado ao anel benzénico) e monofenólicos (que possuem um único radical hidroxilo, -OH, ligado ao anel benzénico) presentes nas frutas e nos vegetais. A acção mais comum é sobre os difenóis, de entre os quais destaca-se o **catecol**, cuja oxidação está representada na figura abaixo:



O escurecimento de frutos e vegetais é devido à formação de quinonas e à reacção que estas sofrem posteriormente.

A enzima **polifenoloxidase** das plantas e dos animais, contém cobre que pode ser complexado com vários quelantes, tornando a enzima inactiva. Alguns inibidores da enzima são a feniltiureia, o cianeto ou a cisteína.

Neste trabalho vamos observar a acção da enzima sobre o catecol (um difenol) e verificar um factor que influencia a sua actividade, o pH.

II Procedimento

A - Preparação do Extracto Enzimático

- 1 Coloque num homogeneizador uma batata média descascada e cortada em bocados.
- 2 Junte 50 ml da solução de fluoreto de sódio (que deverá estar no frio).
- 3 Homogenize durante 1 a 2 minutos.
- 4 Filtre num funil de Buchner. O filtrado obtido é o extracto enzimático.
- 5 Guarde o extracto enzimático num erlenmeyer coberto com papel de alumínio e coloque-o num banho de gelo, onde deve ser mantido durante toda a sessão.

B – Acção da Polifenoloxidase

- 1 Prepare 3 tubos de ensaio como se indica a seguir:
 - Tubo B1 – 15 gotas de extracto + 15 gotas de solução de catecol.
 - Tubo B2 – 15 gotas de extracto + 15 gotas de solução de água.
 - Tubo B3 – 15 gotas de água + 15 gotas de solução de catecol.
- 2 Agite os tubos e coloque-os no termóstato a 37 °C durante 10 minutos, agitando de vez em quando. Registe o que observa após a incubação.

C – Natureza Química da Polifenoloxidase

- 1 Prepare 3 tubos de ensaio como se indica a seguir:
 Tubo C1 – 15 gotas de extracto + 15 gotas de solução de catecol. Agite. Coloque 10 minutos no termóstato (tubo de controle).
 Tubo C2 – 15 gotas de extracto + 15 gotas de TCA (solução de ácido tricloroacético a 10%). Agite. Espere 5 minutos. Junte 15 gotas de solução de catecol e incube 10 minutos a 37°C. Compare com C1.
 Tubo C3 – 15 gotas de extracto + alguns cristais de feniltioureia.
- 2 Agite durante 5 minutos. Junte 15 gotas de solução de catecol e incube 10 minutos a 37°C. Compare com C1.

D – Especificidade para o Substrato

- 1 Prepare 3 tubos de ensaio como se indica a seguir:
 Tubo D1 – 15 gotas de extracto + 15 gotas de solução de catecol.
 Tubo D2 – 15 gotas de extracto + 15 gotas de fenol.
 Tubo D3 – 15 gotas de extracto + 15 gotas de hidroquinona.
- 2 Agite os tubos e incube 10 minutos a 37°C. Observe e registre as alterações que sofrem os respectivos conteúdos.

E – Efeito do pH

- 1 Prepare 4 tubos de ensaio como se indica a seguir:
 Tubo E1 – 2ml de solução de HCl.
 Tubo E2 – 2ml de tampão acetato.
 Tubo E3 – 2 ml de tampão de fosfatos.
 Tubo E4 – 2ml de tampão Tris.
- 2 Junte 15 gotas de solução de catecol e 15 gotas de extracto a cada tubo.
- 3 Agite os tubos e incube-os 10 minutos a 37°C. Observe cada tubo e registre as alterações.

III Lista de material:

Descrição	Quantidade
Homogeneizador	1
Gelo	q.b.
Batatas	q.b.
Pipetas graduadas	6
Conta gotas	6
Funil de Buchner	1
Faca	1
Erlenmeyer	1
Papel de alumínio	q.b.
Papel de filtro	q.b.
Termóstato	1
Pipetador	6
cronómetro	1
Tubos de ensaio	13
Suporte de tubos de ensaio	4
Água	q.b.
Solução de fluoreto de sódio 0,1 mol L ⁻¹	100 ml
Solução de ácido tricloroacético a 10%	100 ml

Descrição	Quantidade
Solução de HCl 0,1 mol L ⁻¹	250 ml
Tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH5)	5 ml
Tampão de fosfatos 0,1 mol L ⁻¹ (pH7)	5 ml
Tampão Tris 0,1 mol L ⁻¹ (pH9)	5 ml
Feniltiourea	q.b.
Fenol	100 ml
Hidroquinina	100 ml
Solução de catecol 0,1 mol L ⁻¹	250 ml

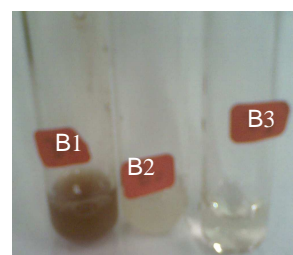
IV Registo de resultados

Tratamento dos resultados

. Interprete e discuta os resultados obtidos relativamente a cada um dos efeitos estudados.

B – Acção da Polifenoloxidase

TUBO	OBSERVAÇÕES	
	Início	Após 10 min a 37°C
B1 (tubo controle)	Solução acastanhada	Solução castanho rosado
B2	Solução opaca, praticamente incolor	Solução opaca, praticamente incolor
B3	Solução transparente, praticamente incolor	Solução transparente, praticamente incolor

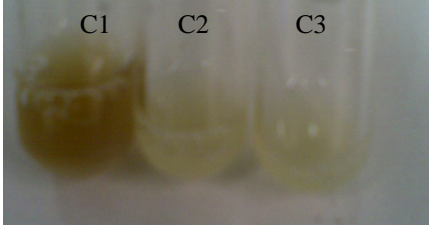


Tratamento dos Resultados B

Após termos colocado os tubos a 37°C apenas o tubo B1 revelou alteração de cor. A enzima oxidou os grupos OH do catecol, sendo esta reacção mais rápida à temperatura de 37°C.

Nos outros tubos não ocorreu reacção pois não estavam presentes em simultâneo, o extracto e o substrato e logo não se formou o complexo enzimático.

C – Natureza Química da Polifenoloxidase

TUBO	OBSERVAÇÕES	
C1 (tubo controle)	Solução opaca de cor castanha	
C2	Solução opaca creme	
C3	Solução opaca creme	

Tratamento dos Resultados C

O tubo C1 serviu de controle, no tubo C2 não ocorreu reacção pois o ácido desnatura as enzimas, provocando a destruição da sua estrutura tridimensional. No tubo C3, também não ocorre reacção porque a feniltioureia funciona como inibidor não permitindo a oxidação do substrato.

D – Especificidade para o Substrato

TUBO	OBSERVAÇÕES	
	Início	Após 10 min a 37°C
D1	Solução opaca de cor castanha escura	Solução opaca de cor castanho muito escuro (escureceu)
D2	Solução opaca de cor castanha clara	Solução opaca de cor castanho claro (mantém coloração)
D3	Solução opaca de cor castanha	Solução opaca de cor castanha Um pouco mais escura que o inicial.

Tratamento dos Resultados D

Após a adição dos três substratos verificou-se actividade enzimática, no entanto no tubo D1 a reacção foi mais extensa do que nos outros dois tubos. O aumento da temperatura provocou um aumento da actividade nos tubos D1 e D3, não se tendo verificado qualquer alteração no tubo D2.

Os diferentes substratos usados apresentam o grupo OH em quantidade e posições distintas, sendo estes factores responsáveis pelas diferenças observadas.

No fenol a existência de apenas um grupo OH determina a pouca extensão da catálise. No catecol e na hidroquinona, os dois grupos OH que possuem, estão em posições diferentes, este factor determina a diferente actividade da enzima.

E – Efeito do pH

TUBO	OBSERVAÇÕES	
	Início	Após 10 min a 37° C
H1 (pH = 2)	Solução de cor creme	 Solução de cor creme (mantém a coloração)
H2 (pH = 5)	Solução opaca de cor castanho claro	 Solução opaca de cor castanha amarelada
H3 (pH = 7)	Solução opaca de cor castanha	 Solução opaca de cor castanha rosada
H4 (pH = 8)	Solução opaca de cor castanha esverdeada	 Solução opaca de cor castanha rosada

Tratamento dos Resultados E

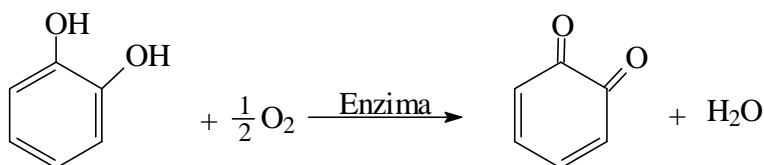
Os resultados obtidos permitem concluir que o pH do meio é também, um factor que interfere na rapidez com que ocorre a formação do complexo.

Nesta catálise verifica-se que o pH ideal será por volta de 7, de acordo com os resultados obtidos. Para valores de pH muito baixos verifica-se a inactividade da enzima, devido à destruição da sua estrutura tridimensional. Para valores de pH mais elevados prevê-se uma diminuição da catálise enzimática, embora não confirmada pelos resultados, pois o aumento de iões OH⁻ em solução irá promover uma “competição” aos centros activos da enzima o que diminuirá a possibilidade de formação do complexo.

V Conclusões

Nesta experiência utilizamos a enzima polifenoloxidase extraída da batata com a ajuda do fluoreto de sódio, que funcionou como quelante do cobre.

Polifenoloxidase é uma enzima que pertence ao grupo das hidroxilases. Esta enzima catalisa a remoção do hidrogénio (oxidação) do catecol passando-o para o oxigénio molecular formando água e a O-quinona correspondente, de acordo com a reacção descrita abaixo:



Os resultados obtidos permitiram concluir que a acção enzimática sobre o substrato depende de vários factores, neste caso específico do pH.