

UNIVERSIDADE FEDERAL SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Responsável: msc. Daniel Alexandre

**PRÁTICA: METODOLOGIAS DE ESTUDOS DAS AMILASES.**

As reações químicas celulares são catalisadas por determinado tipo de proteína denominadas enzimas. Estes compostos são catalisadores muito mais eficientes que qualquer catalisador inorgânico e são sintetizados pela própria célula. A atividade enzimática pode ser avaliada medindo-se a velocidade de desaparecimento do substrato ou a velocidade de aparecimento do produto. A eficiência com que uma enzima catalisa uma reação química (ou atividade enzimática) depende de vários fatores, tais como tempo de reação, concentração de enzima, concentração de substrato, temperatura, pH do meio e presença de substâncias inibidoras e/ou cofator. Para exemplificar os conceitos acima, consideraremos o grupo das amilases. Na natureza são encontrados basicamente três grupos de amilase: a-amilase, b-amilase e glicoamilase.

1 - A beta amilase (1,4 glicano-maltohidrolase, E.C.3.2.1.2) encontrada nas plantas (malte), hidrolisa ligações glicosídicas de polissacarídeos, removendo sucessivas unidades de maltose. Ataca o amido, glicogênio, poli e oligossacarídeos nas extremidades terminais não redutoras do polissacarídeo. É uma exoamilase.

2 - A glicoamilase (1,4 glicano-glico hidrolase, E.C.3.2.1.3) encontrada no sangue, fungos, bactérias e tecidos animais, atua sobre o amido, glicogênio, poli e oligossacarídeo, removendo sucessivas unidades de glicose. É uma exo-amilase.

3 - A a-amilase (1,4 glicano 4 glicano hidrolase, E.C.3.2.1.1) é encontrada na saliva e suco pancreático (amilase salivar = ptialina e pancreática), nos animais, plantas, fungos e bactérias. Esta enzima hidrolisa as ligações glicosídicas do amido, glicogênio, poli e oligossacarídeos (substratos polissacarídeos) ao acaso. É uma endo-amilase.

Como resultado da ação não ordenada da amilase salivar sobre os polissacarídeos, obtém-se rapidamente uma mistura muito complexa de produtos de hidrólise que incluem: amido solúvel, eritrodextrina, acrodextrina, maltodextrina, maltose e glicose, que com a solução de lugol podem ser diferenciadas de acordo com a coloração apresentada, azul intenso-púrpura, vermelho-castanho e incolor. Portanto para o reconhecimento da atividade amilásica, tem-se usado, tradicionalmente, 2 critérios:

- a reatividade com iodo, para as dextrinas (avaliação do desaparecimento do substrato).

- a reatividade com soluções ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS) para produtos indicada para açúcares redutores. Baseia-se na redução do ácido 3,5- dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico resultando em um complexo de coloração laranja. A lise do amido resulta em malto-dextrinas, que possui uma ponta redutora. Quanto mais produto é formado, mais pontas redutoras ficarão

disponíveis no meio de reação intensificando a mudança de coloração do DNS.com poder redutor: a maltose e glicose.

Nos experimentos abaixo, o procedimento usado para verificar a ação da amilase salivar e de intestinos de insetos (*Tenebrio molitor*) sobre o substrato amido, em função da reatividade com solução de iodo ou DNS.

### Prática 01: Separação por Eletroforese.

Para esta pratica será utilizado uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na concentração de 12% contendo um agente sem desnaturante o Docetil Sulfato de Sódio (SDS). O SDS-PAGE 12%, já polimerizado receberá 25 µL da mistura de amostra enzimática com o tampão de amostra (3:1). A corrida ocorrerá sob refrigeração à voltagem constante de 200 V.

Após a corrida as enzimas serão renaturadas em Triton X-100, por 15 minutos, seguido de incubação no substrato tampão por 30 minutos. A revelação da atividade será com o lugol 0,2%.

#### Esquema de incubação:

Poço1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	Poço 10

### Pratica 02: Identificação do Aparecimento de Compostos Redutores (DNS)

Para está prática será utilizado o reagente DNS para identificar os produtos formados a partir da hidrolise do amido. Será realizado uma curva de aumento na quantidade de produto formado.

#### Esquema de Incubação:

Tubo	Amostra (µL)	Substrato tampão (µL)	Δt (min)	DNS (µL)	Aquecimento (min)
	50	50		200	5
	50	50		200	5
	50	50		200	5
	50	50		200	5
	50	50		200	5
	50	50		200	5
	50	50		200	5
	50	50		200	5

A reação com o DNS é catalisada pela fervura, sendo que após a revelação devem ser acrescentados 200 µL de água destilada em todos os tudo, seguido de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm.

## Resultados:

Tubo	$\Delta t$ (min)	Absorbância

### Prática 03: Identificação do Desaparecimento do Amido (Lugol)

Preparar 10 tubos, gotear em cada um dos tubos 2 gotas (com conta-gotas) de solução de lugol e 1 mL de água destilada (bateria de tubos para reação de coloração com iodo).

- Colocar em um Becker pequeno (capacidade de 50 ou 100 mL) bem limpo e seco: 5 mL de SOLUÇÃO DE AMIDO + 2 mL de SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO + 2 mL de SOLUÇÃO de NaCl a 1% + 1 mL de água destilada = **SISTEMA DE INCUBAÇÃO sem a amilase**. Homogeneizar bem.

- Retirar 2 gotas (com conta-gotas) do sistema de incubação acima preparado, que deverão ser transferidas para o primeiro tubo contendo lugol diluído. Homogeneizar.

- Adicionar saliva diluída ou homogeneizado de intestino de inseto, 1 mL, e começar a marcar o tempo neste instante ao copo Becker contendo o sistema de incubação sem a enzima. Homogeneizar sem agitação.

Após 1 minuto, retirar 2 gotas deste sistema de incubação para o tubo 2 da bateria de reação com iodo.

- Repetir o procedimento a cada 1 minuto (ou seja, coletar 2 gotas (com conta-gotas) do sistema de incubação de amilase para cada um dos outros 8 tubos da bateria), ou em intervalos menores se a atividade for muito alta, anotando sempre o tempo.

- Adicionar 5 ml de água destilada em cada um destes tubos contendo lugol e homogeneizar. Caso a coloração dos primeiros tubos for muito intensa (leitura não permitida no aparelho), adicionar mais 7 mL de água destilada em cada com coloração muito intensa.

- Ler as densidades óticas (ou absorbâncias) das amostras contendo lugol em filtro vermelho ou à 680nm

**Resultados:**

<b>Tubo</b>	<b><math>\Delta t</math> (min)</b>	<b>Absorbância</b>

**BIBLIOGRAFIA:**

- DIXON, M. & WEBB, E.C. Enzymes. 2nd ed. Longmans, 1966.
- VILLELA, G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. Técnicas e experimentos de bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1973. p.241-245.
- OSER, B.L. (ed.). Hawk's Physiological Chemistry. 14th . New York: McGraw-Hill, 1995.
- KING, J. Practical Clinical Enzymology. van Nostrand Co., 1965.
- ZHANG, J. & KASHKET, S. Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. *Caries Res.*, v. 32: 233-238, 1998. p-amilase-