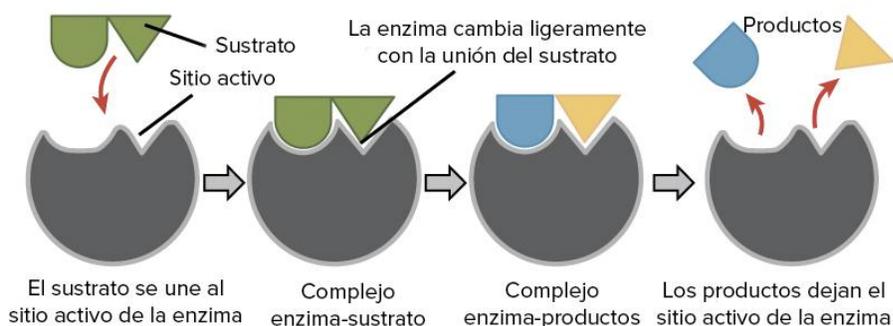


## TRABAJO PRÁCTICO N°1 BIOQUÍMICA

### *Evaluación cualitativa de la actividad enzimática en diferentes muestras biológicas*

#### **Introducción:**

Las enzimas son moléculas biológicas de naturaleza proteica que catalizan (aceleran la velocidad de reacción) reacciones químicas que sean termodinámicamente posibles. Una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible, pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, es decir, transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la enzima. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos (Figura 1). A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas.



**Figura 1:** Esquema representativo del mecanismo de acción de una enzima sobre un sustrato para convertirlo en producto (Reacción enzimática).

Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, por lo que no son consumidas por las reacciones que catalizan y por ello no modifican el equilibrio químico de la reacción ( $K_{eq}$ ). Una reacción que se produce bajo el control de una enzima (o de un catalizador en general) alcanza el equilibrio químico mucho más rápido que la correspondiente reacción no catalizada.

La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, mientras que los activadores enzimáticos son moléculas que incrementan dicha actividad. Asimismo, gran cantidad de enzimas requieren de cofactores para su actividad. Muchas drogas o fármacos son moléculas inhibidoras.

Igualmente, la actividad de las enzimas es afectada por factores físico-químicos. Dentro de los factores físico-químicos que pueden modificar la actividad enzimática encontramos a:

➤ **Temperatura:** las enzimas son sensibles a la temperatura pudiendo verse modificada su actividad por este factor. Los rangos de temperaturas óptimas de actividad pueden llegar a variar sustancialmente de unas enzimas a otras. Normalmente, a medida que aumente la temperatura, una enzima verá incrementada su actividad hasta el momento en que comience la desnaturalización de la misma, que dará lugar a una reducción progresiva de dicha actividad.

- **pH:** el rango de pH óptimo también es muy variable entre diferentes enzimas. Si el pH del medio se aleja del óptimo de la enzima, esta verá modificada su carga eléctrica (al aceptar o donar protones), lo que modificará la estructura de los aminoácidos y por tanto la actividad enzimática (Figura 3).
- **Concentración salina (fuerza iónica):** al igual que en los casos anteriormente mencionados, la concentración de sales del medio es crucial para una óptima actividad enzimática. Una elevada concentración o la ausencia de sales en el medio pueden impedir la actividad enzimática, ya que las enzimas precisan de una adecuada concentración de iones para mantener su carga y su estructura.

La mayoría de las enzimas tienen la particularidad de tener una alta actividad catalítica a condiciones ambientales “suaves” (por ejemplo, en el caso del ser humano, a 37 °C), pH neutro (7,4) y es por ello que en muchos casos son muy poco activas a (muy) bajas temperaturas o valores de pH extremos (dependiendo de la enzima).

El empleo de métodos de enfriamiento o de congelación para conservar alimentos se basa en el hecho de que a bajas temperaturas se reduce notablemente la actividad enzimática y esto previene la descomposición. Algunas enzimas son usadas comercialmente, por ejemplo, en la síntesis de antibióticos y productos domésticos de limpieza. Además, son ampliamente utilizadas en diversos procesos industriales, como son la fabricación de alimentos, industria textil o producción de biocombustibles.

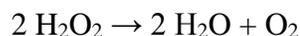
### **Objetivo:**

El objetivo de este trabajo práctico es poner en evidencia la presencia de enzimas en diferentes muestras biológicas. Además, evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de las enzimas.

### **Técnica operatoria:**

#### **✓ CATALASA**

La catalasa es una enzima (hemoproteína) que está presente en casi todos organismos. Actúa sobre el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, agua oxigenada) descomponiéndolo en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> (a pH 7,0), a través de la siguiente reacción:



La presencia de catalasa en diferentes muestras biológicas se pone de manifiesto por el desprendimiento de burbujas de O<sub>2</sub>.

#### **Materiales necesarios:**

Solución de peróxido de hidrógeno 10 vol

Muestras biológicas diversas, por ejemplo: trozos de frutas, vegetales, carne cruda y muestra de sangre.

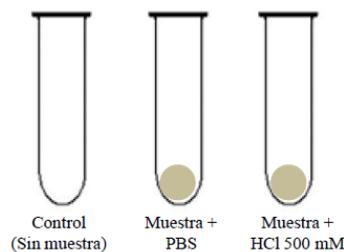
*Buffer* fosfato salino pH 7,4 (PBS)

Solución de HCl 500 mM

Procedimiento:

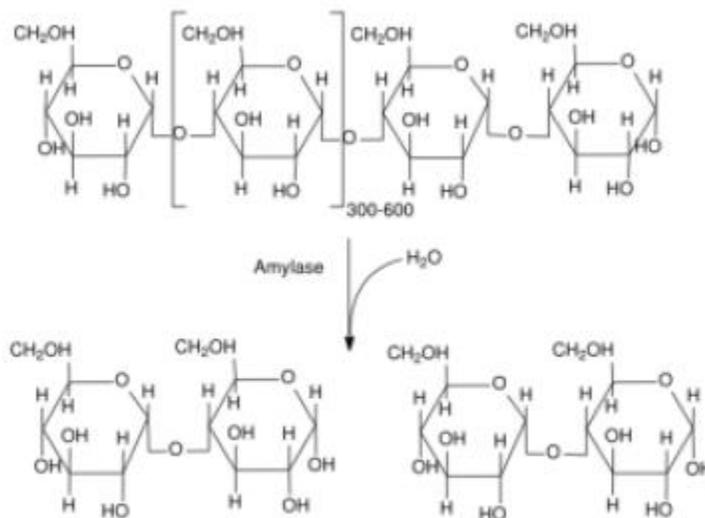
1. Introducir cada muestra biológica (las que disponga en el día del práctico) en dos tubos de ensayo (es decir, por duplicado).
2. A uno de los tubos con muestra agregar 2 ml de PBS, y al otro (duplicado) en lugar de PBS adicionarle 2 ml de HCl 500 mM.
3. Realizar un tubo control que carece de muestra y adicionarle sólo 2 ml de PBS.
4. Adicionar la solución de peróxido de hidrógeno (de a gotas) en todos los tubos.
5. Observar los resultados y clasificar qué muestra presenta reacción positiva (+) o negativa (-).

**Analizar preguntas guía.**



✓  **$\alpha$ -amilasa**

Esta enzima hidroliza el almidón, produciendo oligosacáridos de glucosa a pH 7,0. Se va a comprobar la presencia de esta enzima detectando su actividad hidrolítica determinando el consumo del sustrato (almidón) mediante tinción con triyoduro de potasio ( $KI_3$ ). El almidón y el  $I_3^-$  forman un complejo coloreado. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de almidón.



Materiales necesarios:

Solución de almidón

Muestra de saliva fresca

Buffer fosfato salino pH 7,4 (PBS)

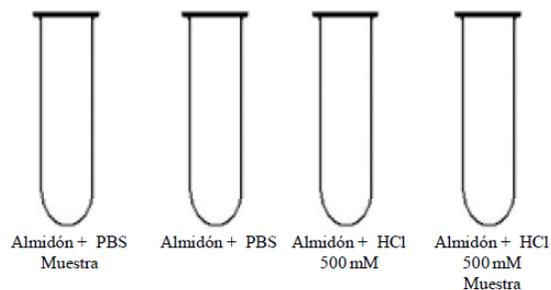
Solución de HCl 500 mM

Solución de triyoduro de potasio (o tintura de yodo)

Procedimiento:

1. Preparar cuatro tubos que contengan 2 ml de solución de almidón.
2. A dos de ellos adicionarle 2 ml de PBS ya a los otros dos adicionarle 2 ml de HCl 500 mM.
3. A uno de los tubos que contiene las soluciones de almidón más PBS, y a uno que contiene HCl, agregarles 1 ml de muestra de saliva fresca a cada uno.
4. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
5. Adicionar 0,25 ml de la solución de triyoduro de potasio en todos los tubos.
6. Observar los resultados y clasificar qué muestra presenta reacción positiva (+) o negativa (-).

**Analizar preguntas guía.**



**Preguntas guía:**

- ¿Cuál fue la muestra utilizada?
- ¿Qué observó en los diferentes tubos?. Si hubo diferencias entre los tubos, ¿a qué se deben las mismas?
- ¿Cómo puso en evidencia la actividad de esta enzima? ¿Aparece producto o desaparece sustrato?
- Analice: ¿En qué condiciones reaccionó la enzima? ¿Cuánto demoró en reaccionar?
- ¿Por qué piensa que esta enzima estaría presente en las muestras analizadas? ¿Qué función tiene?