

Aula 8

ENZIMAS, COENZIMAS E VITAMINAS EXPERIMENTAL

META

Apresentar ao aluno as enzimas e sua atividade catalítica no laboratório. Ensinar o aluno a extrair carotenóides de plantas (pró-vitamina A).

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá: saber identificar uma enzima em laboratório e avaliar a sua atividade catalítica. Deverá saber extrair o licopeno (pró-vitamina A) do extrato de tomate.

PRÉ-REQUISITOS

Aula 06 de enzimas e aula 07 de coenzimas e vitaminas, mecanismo da reação de formação do acetal, hidrólise de amidas. Química orgânica experimental: extração com solvente inerte.

André Luís Bacelar Silva Barreiros
Marizeth Libório Barreiros

INTRODUÇÃO

Olá aluno, nas duas aulas anteriores você foi apresentado às enzimas, coenzimas e vitaminas. Você aprendeu sobre as suas estruturas e propriedades catalíticas. Nesta aula vamos aprender a trabalhar com elas no laboratório. Aprender a identificar a atividade enzimática da amilase na quebra do amido, e da urease na quebra da uréia. E por fim aprender a extrair o licopeno que é a pró-vitamina A partindo do extrato de tomate.

Vamos começar então? Mãos a obra!

AMILASE SALIVAR

O amido é uma mistura dos polissacarídeos amilose e amilopectina. A amilose é um polímero da glicose de cadeia linear e ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, já a amilopectina possui unidades de glicose com ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, mas apresenta ramificações com ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ a cada 24 a 30 unidades de glicose na cadeia principal. Ambas podem ser hidrolisadas em meio ácido ou pelas enzimas amilases. A α -amilase salivar e a α -amilase pancreática catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ seja da amilose, da amilopectina ou do glicogênio, produzindo na clivagem inicial oligossacarídeos de 6 a 7 unidades de glicose, que em seguida são degradados a maltotriose e maltose (Figura 1). A maltose não é substrato para essa enzima, mas tempos maiores de reação levam a formação de glicose como produto minoritário.

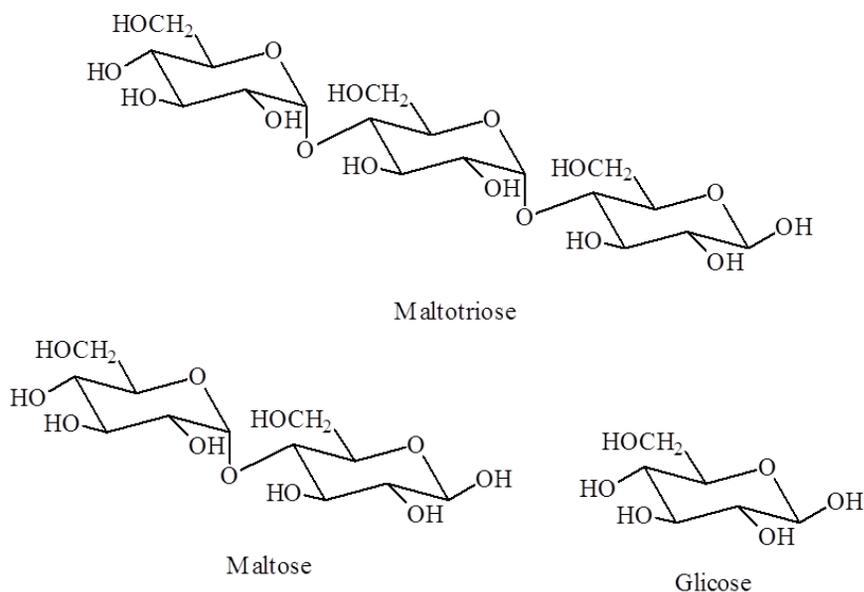


Figura 01 - Maltose, maltotriose e glicose.
Fonte: Desenhado pelo autor com o programa ChemWindows.

Como já estudamos nas reações de carboidratos, nas aulas 01 e 02, o amido dá reação de Benedict negativa devido a baixa concentração de extremidades redutoras, entretanto a maltotriose, maltose e glicose dão reação positiva, sendo que a coloração varia de azul para negativa, passando para verde, amarelo, laranja ou vermelho de acordo com a concentração de açúcares redutores. Por outro lado o amido dá reação de Lugol positiva com coloração azul-escura da amilose e marrom da amilopectina. Quebra em cadeias menores podem fazer a cor mudar para marrom, vermelho nas dextrinas até amarelo quando negativa. A medida em que a reação vai transcorrendo, o teste de Benedict vai se tornando positivo indicando um aumento na concentração dos açúcares redutores maltose, maltotriose e glicose, enquanto que a reação de Lugol vai se tornando menos intensa indicando a queda na concentração de amido.



ATIVIDADES

Avaliação da atividade catalítica da α -amilase salivar

Materiais:

- Béquero de 250 mL
- Proveta de 100 mL
- Chapa de aquecimento
- 12 Tubos de ensaio
- Suporte para tubos de ensaio
- Pipeta graduada 10 mL
- Balança analítica
- Conta-gotas
- Banho termostatizado

Reagentes:

- Amido
- Água destilada
- Saliva
- Reagente de Benedict
- Reagente de Lugol
- Reagente de Biureto

Procedimento

Num béquer de 250 mL pese 1,0g de amido e adicione 20 mL de água destilada fria. Adicione com agitação 70 mL de água destilada fervente, deixe esfriar e complete o volume para 100 mL. Separe 12 tubos de ensaio. Numere de 1 a 6 e adicione 3,0 mL de reagente de Benedict nesses 6 primeiros. Nos outros 6 tubos numere de 1 a 6 e adicione 5 gotas de Lugol e 1,0 mL de água. Colete 10,0 mL de saliva num béquer e adicione ao béquer da solução de amido, misturando bem com o bastão de vidro. Transfira 5 gotas para o tubo 1 de Benedict e 5 gotas para o tubo 1 de Lugol. Leve o

béquer contendo saliva e amido ao banho-maria a 32°C e a cada 5 minutos colete e transfira as 5 gotas da solução para os tubos correspondentes. A cada coleta realize o *teste de Benedict* aquecendo o tubo em banho-maria fervente por 2 min. Anote os resultados. Realize o teste do Biureto com 1,0 mL de saliva pura.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

O teste do Biureto comprova a natureza protéica da α -amilase. O *teste do Lugol* pode dar azul ou marrom dependendo da origem do amido e se este é mais rico em amilose (resultado azul) ou amilopectina (resultado marrom). A medida que a α -amilase vai quebrando a molécula de amido a coloração do teste de Lugol vai se tornando mais clara, sendo que a quebra completa dá coloração amarela. Por outro lado o *teste de Benedict* inicialmente dá coloração azul-claro transparente indicando ausência de açúcar redutor. A medida que a reação transcorre o *teste de Benedict* passa a azul turvo, verde, amarelo, podendo chegar à laranja ou vermelho dependendo da concentração da enzima presente na saliva. Isso indica que estão se formando os açúcares redutores maltose e maltotriose (Figura 2).

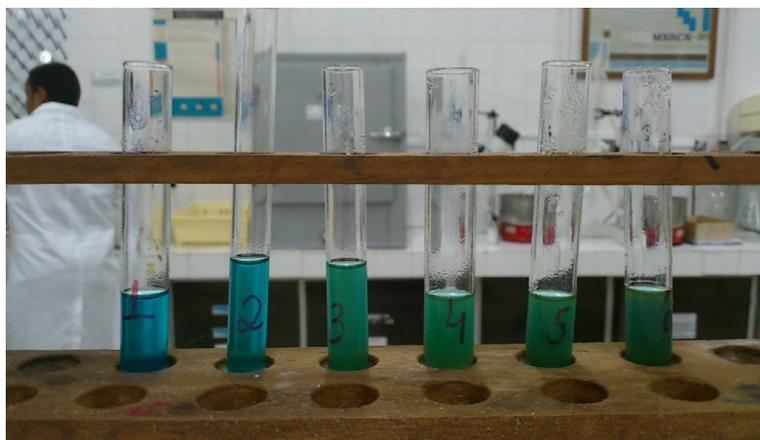


Figura 02 - Resultado do teste da amilase.
Fonte: Foto tirada pelo autor.

UREASE DE SOJA

A urease é uma enzima que ocorre em algumas bactérias e plantas, sendo facilmente extraída da soja (*Glycine max*). Ela catalisa a reação de hidrólise da uréia convertendo esta em amônia e dióxido de carbono. A amônia e o dióxido de carbono em meio aquoso reagem entre si formando carbonato de amônio, que é um sal de caráter básico, podendo ser detectada a sua presença pelo uso de um indicador ácido-base como fenolftaleína

que muda de incolor para rosa em meio básico, ou o vermelho de fenol que passa de amarelo para vermelho. Como a urease contém resíduos de cisteína em seu sítio ativo, o uso de sais de metais pesados como o mercúrio em concentrações reduzidas inibe a sua atividade.

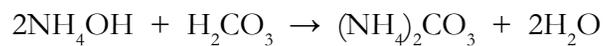
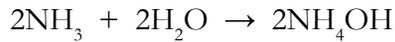


Figura 03 - Soja

Fonte: http://3.bp.blogspot.com/_21TUEvSQHMk/S_KZ-pLI1KI/AAAAAAAAAG0/WN-MG8RJsYG4/s1600/soja2.jpg

A urease de soja apresenta um mecanismo de catálise por metal de transição, com participação do níquel (Ni) em seu sítio ativo (Figura 4).

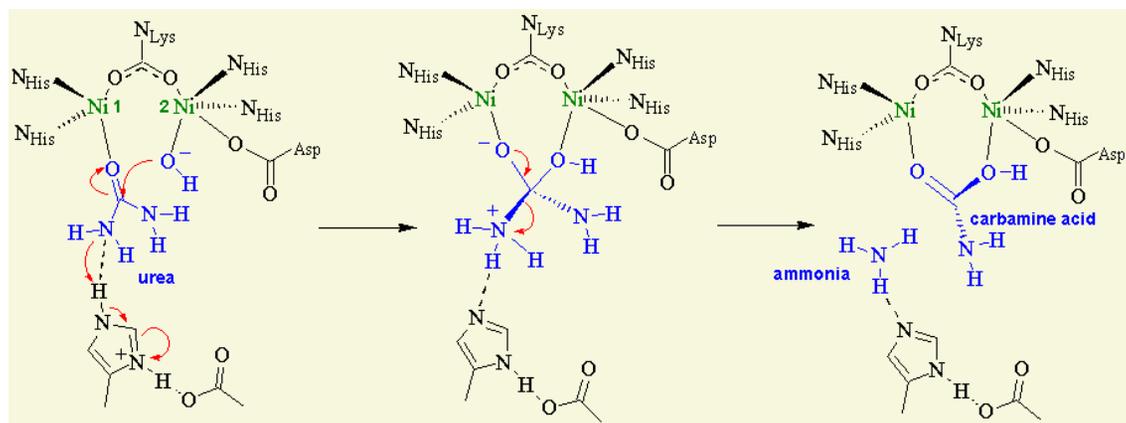


Figura 04 - Mecanismo catalítico da urease.

Fonte: <http://www.demochem.de/Grafik/urease2e.gif>



ATIVIDADES

Avaliação da atividade catalítica da urease de soja

Materiais:

- Balança semi-analítica
- Erlenmeyer 250 mL
- Espátula
- Rolha
- Refrigerador
- Gaze

- Funil
- Espátulas
- Tubos de ensaio
- Pipetas graduadas de 10,0 mL
- Suporte para tubos de ensaio
- Banho termostático
- Pêra

Reagentes:

- Farinha de soja
- Glicerol
- Água destilada
- Reagente de Biureto
- Ácido nítrico concentrado
- Solução de uréia 1% em tampão fosfato
- Solução de Fenolftaleína
- Cloreto de mercúrio II 0,01%

Procedimento

Pese 15g de farinha de soja em um erlenmeyer de 250 mL. Adicione 100 mL de glicerol a 75% em água. Tampe com uma rolha e agite a suspensão

vigorosamente por 15 min. Coloque no refrigerador até o dia seguinte. Filtre com gase, espremendo com um bastão de vidro. A solução obtida é estável por 6 anos no refrigerador. Realize o teste do biureto com duas gotas da solução de urease em 2,0 mL de água e 2,0 ml do reagente do biureto. Realize o *teste de Heller* com quatro gotas da solução de urease em 2,0 mL de água e escorrendo pelas paredes 1,0 mL de HNO_3 concentrado sem agitar.

Teste a atividade enzimática. Tome dois tubos de ensaio e marque com os números 1 e 2. Ao tubo 1 adicione 3,0 mL de solução de uréia a 1% (em tampão fosfato 1mmol/L) e 2 gotas de urease. Ao tubo 2 adicione 3,0 mL de solução de uréia 1% (em tampão fosfato 1mmol/L). Nos dois tubos adicione 1 gota do indicador ácido/base (fenolftaleína ou vermelho de fenol). Agitar os tubos e colocar em banho-maria a 37°C por 5 min. Observar a mudança de cor. Num tubo 3 adicionar 2,0 mL de água destilada e 2 gotas de urease. Agitar e ferver por 2 min. Num tubo 4 adicionar 3,0 mL de solução de uréia 1% (em tampão fosfato 1mmol/L), 1,0 mL da solução de urease fervida e 1 gota de indicador. Agitar o tubo e colocar em banho-maria a 37°C por 5 min. Observar a mudança de cor. Comparar com os tubos 1 e 2. Num tubo 5 adicionar 2,0 mL de água destilada e 2 gotas de urease. Agitar e adicionar 1 gota de solução de cloreto de mercúrio 0,01%. Agitar e adicionar 3,0 mL da solução de uréia 1% (em tampão fosfato 1mmol/L). Agitar o tubo e colocar em banho-maria a 37°C por 5 min. Observar a mudança de cor. Compare todos os resultados.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

Os testes do *Biureto de Heller* confirmam a natureza protéica da urease. A fenolftaleína com a solução de uréia apresenta coloração rosa. Ao adicionar a urease a uréia é decomposta se tornando incolor. A desativação da urease pelo calor ou pelo uso de sais de mercúrio fazem com que a solução de uréia com fenolftaleína não perca a cor caso a desnaturação seja total, ou perca parte da cor se a desnaturação for parcial (Figura 5).

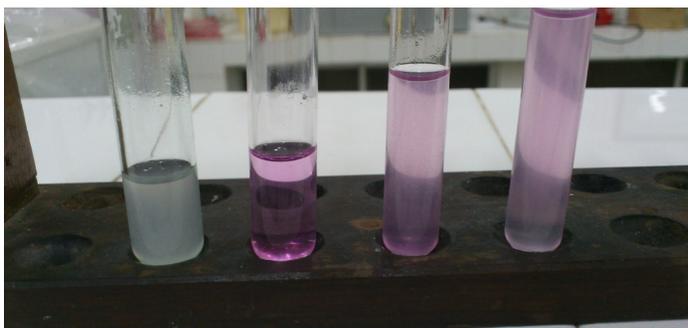


Figura 05 - Resultado do teste da urease.
Fonte: Foto tirada pelo autor.

LICOPENO DO TOMATE

O licopeno (Figura 6) foi primeiramente isolado de *Tamun communis* em 1873. Mais conhecido como pigmento do tomate, este carotenóide é amplamente distribuído na natureza. 75kg de tomate maduro apresentam cerca de 11g de licopeno, entretanto, apesar de ser o principal carotenóide presente no tomate, não é o único, sendo encontrados fitoeno, fitoflueno, beta-caroteno, zeta-caroteno e gama-caroteno.

Para obter o licopeno o extrato de tomate é desidratado com metanol, o resíduo é particionado entre metanol e tetracloreto de carbono. O produto cru é cristalizado duas vezes com benzeno e adição de metanol.

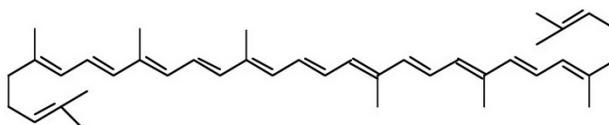


Figura 06 - Licopeno do Tomate (*Tamun communis*).

Fonte: <http://www.buscasaude.com.br/wp-content/uploads/2011/08/tomate-licopene.jpg>
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/it/c/ce/Licopene.jpg>



ATIVIDADES

Extração do licopeno do tomate

Materiais:

- Balança semi-analítica
- Erlenmeyer de 500 mL
- Espátula

Reagentes:

- Extrato de tomate
- Metanol
- Tetracloreto de carbono

- Rolha
- Funil de Buchner
- Kitassato
- Adaptador de borracha
- Bomba de vácuo
- Papel de filtro
- Funil de separação de 250 mL
- Suporte universal
- Aro
- Erlenmeyeres de 125 mL
- Funil de colo curto
- Balão de fundo redondo 100 mL
- Rota-evaporador
- Chapa de aquecimento
- Frasco de penicilina
- Pipeta Pasteur
- Sulfato de sódio anidro
- Benzeno
- Água destilada

Procedimento

Pese 50g de extrato de tomate e transfira para um erlenmeyer de 500 mL de boca larga com tampa ou rolha. Adicione 65 mL de metanol e agite vigorosamente. Se a suspensão ficar com uma consistência aglutinante adicione mais metanol e agite novamente. Deixe a mistura em repouso por 10 min, e então filtre a vácuo com funil de Buchner. Descarte o filtrado amarelo. Retorne a pasta vermelho-escura para o erlenmeyer, adicione 35 mL de metanol e 35 mL de tetracloreto de carbono. Agite vigorosamente durante 15 min, aliviando a pressão da rolha de vez em quando. Filtre a vácuo com funil de Buchner, o filtrado apresentará duas fases, a inferior em CCl_4 vermelho escura, e a superior em MeOH laranja. Retorne o sólido para o *erlenmeyer* e repita a extração com mais 35 mL de metanol e 35 mL de tetracloreto. Filtre novamente a vácuo e descarte o resíduo sólido. Transfira os filtrados para funil de separação e separe a fase CCl_4 . Retorne o CCl_4 para o funil e lave com água destilada por 3 vezes. Recolha a fase CCl_4 em um erlenmeyer seco e seque com sulfato de sódio anidro. Filtre com papel de filtro para um balão de fundo redondo e evapore o CCl_4 a vácuo a 60°C até restar apenas 5 mL de solvente. Transfira o resíduo para um balão menor, usando pipeta Pasteur e alguns mL de CCl_4 para lavar as paredes. Remova então o CCl_4 completamente a vácuo, restando um óleo escuro, que é dissolvido com 1 mL de benzeno e evaporado novamente para eliminar qualquer vestígio do tetracloreto. Transfira o resíduo parcialmente cristalino para um *erlenmeyer* de 25 mL, usando cerca de 1 mL de benzeno para auxiliar. Uma solução límpida deve ser obtida ao mergulhar o *erlenmeyer* em banho de água quente. Adicione metanol fervente, aos poucos, com auxílio de uma pipeta Pasteur. Os cristais de licopeno devem começar a

aparecer imediatamente. Deixe o líquido esfriar a temperatura ambiente e depois coloque em banho de gelo. Colete os cristais filtrando a vácuo em pequeno funil de Buchner, lavando com 2 mL de metanol fervente.

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

O licopeno é uma substância apolar, sendo melhor extraído por solventes orgânicos apolares. O uso do metanol remove a água e as substâncias polares, o que é reforçado nas lavagens com água. Para remover vestígios de água na fase em tetracloreto de carbono, utilizamos o sal sulfato de sódio anidro, que é higroscópico. O tetracloreto não evapora bem no rota-evaporador, sendo necessário o uso de benzeno para formar um azeótropo que evapora por completo. A recristalização é conseguida com sistema de dois solventes, onde o metanol quente adicionado reduz a solubilidade do licopeno no benzeno, forçando a sua cristalização.



Figura 07 - Etapas da extração do licopeno.
Fonte: Fotos tiradas pelo autor.

CONCLUSÃO

Como vimos, é possível observar a atividade enzimática no laboratório detectando os produtos da reação. Vimos também que o licopeno pode ser facilmente extraído do tomate ou do extrato de tomate onde ele se encontra em maior concentração.



RESUMO

Nesta aula aprendemos sobre atividade enzimática. Estudamos duas enzimas: α -amilase salivar e urease de soja. Vimos que ambas possuem caráter protéico e testamos suas atividades monitorando os produtos formados em suas reações. Também extraímos o licopeno (pró-vitamina A) do extrato de tomate.



AUTO-AVALIAÇÃO

- 1- Proponha um mecanismo de ação para a α -amilase salivar.
- 2- Desenhe as estruturas do amido, maltose e glicose.
- 3- Por que o *teste de lugol* dá coloração azul para a amilose e marrom para a amilopectina.
- 4- Pesquise sobre a maltodextrina e proponha porque o *teste de Lugol* dá resultado vermelho para ela:
- 5- Qual a reação que ocorre no *teste de Benedict*? Escreva:
- 6- Que tipo de catálise a urease utiliza em sua reação?
- 7- Por que a urease perde atividade ao ser fervida ou ao adicionarmos um sal de metal pesado?
- 8- Pesquise quais as estruturas dos outros carotenóides presentes no tomate:
- 9- Que tipo de extração foi utilizada para isolar o licopeno?
- 10- Classifique a extração do licopeno com base na reatividade do solvente e no estado físico das fases.
- 11- Qual a estrutura da vitamina A?
- 12- Quantas moléculas de vitamina A podem ser obtidas partindo de uma molécula de licopeno?



PRÓXIMA AULA

Na próxima aula vamos aprender sobre uma nova classe de biomoléculas, os lípidios.

REFERÊNCIAS

- BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª. Ed. Pearson Prentice e Hall, São Paulo – SP, 2006. Vol. 2.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 4ª. Ed, Editora Sarvier, 2006, capítulo 7.
- MASTROENI, M. F., GERN, R. M. M. **Bioquímica: Práticas Adaptadas**. Atheneu, São Paulo – SP, 2008.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., ENGEL, R. G. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena**. 2ª. Ed., Bookman, Porto Alegre - RS, 2009.
- PETKOWICZ et. al. **Bioquímica: Aulas Práticas**. 7ª. Ed. Editora UFPR, Curitiba – PR, 2007.
- dos SANTOS, P. C., BOCK, P. M. **Manual Prático de Bioquímica**. Ed. Universitária Metodista IPA, Porto Alegre – RS, 2008.
- VOGUEL, A.I. **Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa**, Ed. Ao Livro Técnico S.A., Vol. 1, 2 e 3, 1971.