

# DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

## • OBJETIVOS

- Descomponer el agua oxigenada por acción de la peroxidasa.
- Poner de manifiesto la presencia en la saliva de la enzima amilasa, demostrando su actividad: la hidrólisis del almidón para dar glucosa y maltosa.

## • FUNDAMENTO TEÓRICO

### a) Enzima Peroxidasa

Entre las enzimas que poseen las células, se puede poner fácilmente de manifiesto la denominada peroxidasa, que se halla siempre presente, tanto en las células vegetales como en las animales. Esta enzima actúa sobre el agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) descomponiéndola en agua y oxígeno molecular que se desprende en burbujas. La reacción es la siguiente:  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \uparrow$

La peroxidasa como la mayor parte de las enzimas, es muy sensible al calor, destruyéndose cuando los tejidos que lo contienen son sometidos a calentamiento.

### b) Amilasa de la saliva

La amilasa o ptilina actuando sobre el almidón, desdobra por hidrólisis la molécula liberando azúcares reductores. La presencia de amilasa se puede demostrar poniendo de manifiesto su actividad de estas dos formas:

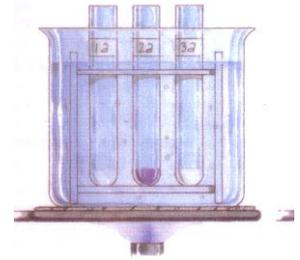
1. Por la **aparición** de los **productos finales** de la hidrólisis del almidón (moléculas de glucosa y de maltosa). Se tratan de azúcares reductores y se puede detectar su presencia con el reactivo de Fehling A y B (prueba realizada en la práctica de glúcidos). Además, se puede detectar su presencia mediante la reacción de Benedict, que es exclusiva de los azúcares reductores (como la glucosa y la maltosa) y que da como resultado una coloración característica. Así pues, en esta ocasión vamos a determinar la presencia de glúcidos mediante este ensayo.
2. Por la **desaparición** o descomposición del **almidón**, que es el sustrato inicial de la reacción enzimática, ya que el almidón inicialmente reaccionará con el Lugol (solución iodo-iodurada) mostrando la característica coloración azul violeta intensa, que irá desapareciendo conforme el almidón se vaya descomponiendo.

### c) Reacción De Benedict

La reacción o prueba de Benedict identifica azúcares reductores (aquellos que tienen su OH anomérico libre), como la lactosa, la glucosa, la maltosa, y celobiosa. En soluciones alcalinas, puede reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  que tiene color azul a  $\text{Cu}^+$ , que precipita de la solución alcalina como  $\text{Cu}_2\text{O}$  de color rojo-naranja. El reactivo de Benedict consta de: sulfato cúprico, citrate de sodio, carbonato anhidro de sodio. Además se emplea NaOH para alcalinizar el medio.

El fundamento de esta reacción radica en que en un medio alcalino, el ion cúprico (otorgado por el sulfato cúprico) es capaz de reducirse por efecto del grupo aldehído del azúcar (CHO) a su forma de  $\text{Cu}^+$ . Este nuevo ion se observa como un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ).

El medio alcalino facilita que el azúcar esté de forma lineal, puesto que el azúcar en solución forma un anillo de piranósico o furanósico. Una vez que el azúcar está lineal, su grupo aldehído puede reaccionar con el ion cúprico en solución.



Los disacáridos como la sacarosa (enlace  $\alpha(1 \rightarrow 2)O$ ) y la trehalosa (enlace  $\alpha(1 \rightarrow 1)O$ ), no dan positivo puesto que sus OH anoméricos están siendo utilizados en el enlace glucosídico.

• **MATERIAL**

<b>Material de Laboratorio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recipiente para baño María</li> <li>• Gradilla con 6 tubos de ensayo</li> <li>• Termómetro.</li> <li>• Mechero y soporte</li> <li>• Pinzas de madera</li> <li>• Pipeta de 10 ml</li> <li>• Aspirador de pipetas</li> </ul>
<b>Reactivos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reactivo de Benedict (también se puede usar Fehling A y B)</li> <li>• Lugol (una parte de Lugol y dos de agua)</li> <li>• Solución de almidón al 0,5 %</li> <li>• Agua oxigenada</li> </ul>
<b>Material biológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Saliva</li> <li>• Una patata fresca y otra hervida</li> </ul>

• **MÉTODO**

**A) Demostración de la acción hidrolítica de la amilasa de la saliva.**

- 1- Disponer en una gradilla cuatro tubos de ensayo numerados I, II, III, y IV colocando en cada uno de ellos 2 ml de solución de almidón al 0,5 %.
- 2- Añadir al tubo I, una gota de solución diluida de Lugol. Anotar el resultado.
- 3- Añadir al tubo II, 2 ml de reactivo de Benedict, agitar e introducir al baño María unos minutos.
- 4- Dejar escurrir en los tubos III y IV una pequeña cantidad de saliva. Para ello rebatir hacia abajo con los dedos el labio inferior, inclinando hacia adelante la cabeza, logrando así que fluya un pequeño chorro de saliva. Llevar los tubos al baño María manteniendo éste entre 35-40°. Sacarlos a los 15-20 minutos, dejándolos enfriar.
- 5- Añadir al tubo III, 3-4 gotas de solución diluida de Lugol y observar el resultado.
- 6- Añadir al tubo IV, 2 ml de reactivo de Benedict, agitar e introducir al baño María unos minutos. Observar el resultado.

**B) Demostración de la enzima peroxidasa de los tejidos.**

- 1- Preparar dos tubos de ensayo, colocando en uno de ellos con ayuda de unas pinzas, un cubito de patata fresca (puede utilizarse cualquier otro órgano vegetal o animal), y en el otro, un cubito semejante de patata (u otro órgano) hervida.
- 2- Añadir a cada uno de los tubos, 2-3 cc de agua oxigenada. Observar lo que ocurre en cada uno de ellos y sacar conclusiones.

**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

- ¿Por qué no se forman burbujas cuando la patata está hervida?
- ¿Qué conclusiones puedes sacar sobre la composición de la saliva?
- Comparando el tiempo que los alimentos permanecen en la boca con el empleado en el desarrollo de la experiencia ¿crees que la amilasa de la saliva termina la digestión del almidón en una comida normal o existen otras enzimas capaces de hacerlo?
- ¿Qué proceso ha sucedido en los tubos III y IV?
- ¿Por qué empleamos saliva para hidrolizar el almidón?
- ¿Qué sucedería si hubiésemos añadido un ácido a la saliva antes de añadirla al tubo?
- ¿Para qué se necesitan los tubos I y II? ¿Son imprescindibles?
- ¿Por qué mantenemos la temperatura constante en torno a los 37-38 °C y no a otra cualquiera?.