

PRACTICA 1

MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA DE ERITROCITOS HUMANOS

INTRODUCCIÓN

La actividad de una enzima puede expresarse, a sugerencia de la comisión de enzimas de la unión internacional de bioquímica, como actividad molecular (número de recambio), y como actividad específica.

La actividad molecular es el número de moléculas de sustrato transformadas por minuto por una sola molécula de enzima(o por un solo centro activo), cuando la enzima es el factor limitante de la velocidad, se basa en la **V_{max}** y tiene unidades de recíproco de tiempo (min.⁻¹).

La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que origina la transformación de un micromol de sustrato por minuto a 25°C en condiciones óptimas de medida). La actividad específica constituye una medida de la pureza de la enzima, aumenta durante el proceso de su purificación y llega a ser máxima y constante cuando ésta se halla en estado puro. La forma más usada de expresión de la actividad específica es la de micromoles de producto formado por minuto por miligramo de proteína.

Aunque estas definiciones son sugeridas por la Comisión de Enzimas, no siempre seguidas, como en el caso de preparaciones crudas. Cada investigador aplica su propia definición de unidad de enzima y es necesaria una interconversión cuidadosa para comparar diferentes preparaciones de la misma enzima. En esta práctica la actividad de la catalasa se expresará como el número de micromoles de peróxido de hidrógeno transformado por minuto a 0 °C, por ml de sangre.

La actividad de los preparados de catalasa se mide de diversas formas, casi siempre sujetas a errores. Un método conveniente consiste en medir el peróxido de Hidrógeno no atacado por la enzima, mediante titulación con Permanganato de Potasio, después de incubar la enzima (por cinco minutos) sobre una solución diluida de peróxido de Hidrógeno, (la reacción se detiene añadiendo ácido sulfúrico que destruye a la enzima).

PRODUCTO BIOLÓGICO:

Sangre humana completa obtenida al momento de realizar la práctica.

MATERIAL Y EQUIPO:

- 5 Matraces Erlenmeyer de 50 ml.
- 1 Matraz de Aforación de 100 ml.
- Pipetas Serológicas de 0.1 ml , 1 ml, 5ml y 10 ml.
- 1 Bureta
- 1 Soporte y pinzas para bureta.
- Tubos de 13 x 100 mm con tapón
- Baño de temperatura constante (100 °C)
- 1 Baño con hielo.

REACTIVOS:

- Ácido sulfúrico, 6 N
- Amortiguador de fosfatos, 0.02 M (pH= 7.0)

- Permanganato de potasio, 0.005M
- Peróxido de Hidrógeno, 0.05M; en amortiguador de fosfato 0.02M, (pH=7.0)
- Sal di sódica de EDTA, al 1%

TÉCNICA:

A.-OBTENCION Y MANEJO DE LA MUESTRA DE SANGRE.

Extraer 2 ml de sangre venosa y mezclarla con EDTA al 1 % (en tubo de 13x100) y colocarla inmediatamente sobre hielo. La muestra debe ser utilizada lo más rápidamente posible.

B.- MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA

- Colocar sobre hielo picado (antes de extraer la muestra), un matraz de aforación de 100 ml conteniendo 25 ml de agua destilada fría.
- Pipetear exactamente 0.1 ml de la sangre recién extraída. Limpiar con algodón al exterior de la pipeta y dejar caer la sangre en el agua fría contenida en el matraz de 100 ml.
- Enjuagar la pipeta varias veces (con el agua del matraz), hasta asegurarse de que toda la sangre paso al agua. Agitar el matraz durante un minuto para homogenizarla y aforar a 100 ml con agua destilada fría.
- Mantener esta solución a 0oc durante todo el experimento para evitar inactivación de la enzima por calor.
- Preparar cinco matraces de 50 ml según indica la tabla I. Todos los matraces deben estar a 0oc pues la reacción se lleva a cabo a esa temperatura. Después de añadir cada reactivo mezclar con movimientos de rotación.

M A T R A Z N U M E R O					
REACTIVO (ml)	1	2	3	4	5
AMORTIGUADOR DE FOSFATO 0.02	10	10	10	10	10
H2O2 0.05 M	2	2	2	2	2
CATALASA A 0OC	0.5	0.5	–	0.5	0.5
CATALASA INACTIVADA POR CALOR	–	–	0.5	–	–
H2SO4 6 N	2 ANTES DE AÑADIR LA ENZIMA	2	2	2	2
			CINCO MINUTOS DESPUÉS DE AÑADIR LA CATALASA		

- titular el H2O2 restante en cada uno de los matraces con KMNO4 0.005 M (notas 1–4).

NOTAS

- El matraz uno es el blanco de reactivos y representa la actividad total de H2O2 añadido a cada matraz. En este caso se añaden 2 ml de H2SO4 6N antes de añadir la enzima y antes de iniciar las reacciones en los demás matraces. Previamente se debe calcular la cantidad de KMNO4 0.005 M que se necesita para que reaccione todo el H2O2 contenido en los 2 ml de H2O2 0.005 M si el matraz uno no da el valor calculado significa que se descompuso la solución de peroxido de hidrógeno y se deber preparar otra nueva.
- En los matraces 2–5 la reacción se detiene exactamente cinco minutos después de iniciada la reacción añadiendo 2 ml de H2SO4 6 N
- El matraz tres es un blanco utilizado para detectar la presencia de alguna otra sustancia que catalice la misma reacción, ya que la catalasa se inactiva al calentarla por siete minutos a 100oc.

- es conveniente realizar la titulación del H₂O₂ (que no fue atacado por la catalasa), con KMNO₄ 0.005 M durante la siguiente media hora después de terminada la reacción pues el H₂O₂ permanece estable en la solución ácida aproximadamente por ese tiempo.

CALCULOS

- **mol de H₂O₂ = ml de kmno₄ x 2.5 x 1000**
 - Para calcular los **mol de H₂O₂ iniciales** sustituir en la formula uno los **ml de Kmno₄** utilizados para titular el H₂O₂ del matraz uno.
 - Para calcular los **mol de H₂O₂ restantes** sustituir en la formula uno los **ml de Kmno₄** utilizados para titular el H₂O₂ de los matraces el 2 al 5.
- **mol de H₂O₂ descompuesto = mol de H₂O₂ iniciales – mol de H₂O₂ restantes. (En 5 minutos por 5x10⁻⁴ ml de sangre).**
- **Actividad enzimático = mol de H₂O₂ descompuesto/4x10²**

(mol de H₂O₂ descompuesto en un min./ml de sangre)

(En 5 minutos por 5x10⁻⁴ ml de sangre)

REFERENCIAS

- Bohinski, Robert C. bioquímica Fondo educativo Interamericano S.A. México (1978) pp.72
- Rendina, George Dr. Técnicas de Bioquímica Aplicada Editorial Interamericana; S.A., México (1974) pp.84-86

REPORTE

- Investigar en bibliografía las características químicas, el nombre sistemático y el número asignado por la comisión de enzimas para la catalasa.
- Escribir dos reacciones donde haya formación de peroxido de hidrógeno.
- Escriba la reacción catalizada por la catalasa.
- Escribir en la siguiente tabla los datos y resultados que se indican.

MATRAZ NÚMERO					
	1	2	3	4	5
ml de Kmno ₄ 0.005 M utilizado					
mol de H ₂ SO ₄ iniciales					
mol de H ₂ O ₂ descompuestos (en 5 min./5x10 ⁻⁴ ml de sangre)					

Actividad Enzimática

- **Investigúe en bibliografía la Actividad Enzimática de la catalasa**
-