



Enzimas Digestivas

Objetivos: Determinar a existência de proteases, lipase e amilase na saliva humana e no extrato de estilete cristalino de bivalve ou no suco digestivo de crustáceo.

Material biológico: *Mesodesma mactroides* (ou outro bivalve); ou o caranguejo *Neohelice granulata*.

Material procedimental:

Água do mar filtrada	Solução de benedict
Solução de amido a 1%	Bico de Bunsen
Óleo de oliva	Material de dissecação
Chapas veladas de filme fotográfico	Vidraria comum de laboratório
Solução fenolftaleína	Solução lipase pancreática
Solução de NaOH 0,5 g/1000 ml H ₂ O	Solução tripsina

Procedimentos:

A) Preparo de extratos.

- Estilete cristalino: Retire 4 estiletos cristalinos de bivalves e, após cortá-los em pequenos pedaços, macere-os em um gral resfriado com 1,0 ml de água do mar. Após macerado adicione mais 1ml de água do mar.
- Solução amilase: Após lavar bem a boca com água destilada cuspir em tubo de ensaio . Diluir na proporção de 3:1 com água destilada.
- Retirar com o auxílio de uma seringa, introduzida entre as peças bucais de *N. granulata*, uma amostra do suco digestivo.
- Bile - utilizar bile de cão.

B) Teste de amilase.

Monte e rotule 3 tubos de ensaio com as seguintes substâncias:

- Tubo 1: 1 ml de solução de amido.
- Tubo 2: 1 ml da solução de amido mais 1 ml de amilase.
- Tubo 3: 1 ml de solução de amido mais 1 ml de extrato de estilete cristalino ou de suco digestivo de crustáceo.

Após uma hora verificar a presença de açúcar (neste caso maltose) com reativo de Benedict. Para tanto, colocar em um pequeno tubo de ensaio 2 gotas de substância ou mistura a ser testada , 8 gotas de água e 4 gotas de reativo de benedict. Aqueça por 10 minutos em banho-maria . A formação de um precipitado vermelho indica resultado positivo.

C) Teste de Lipase.

Monte e rotule 3 tubos de ensaio com as seguintes substâncias:

- Tubo 1 - 1 ml de óleo de oliva mais 2 gotas de bile, 4 gotas de fenolftaleína
- Tubo2 - 1 ml de óleo de oliva mais 2 gotas de bile, 1 ml de solução lipase pancreática mais 4 gotas de fenolftaleína.
- Tubo 3 - 1 ml de óleo de oliva mais 2 gotas de bile, 1 ml de extrato de estilete cristalino/ ou suco digestivo de crustáceo, mais 4 gotas de fenolftleína.

O pH das misturas deve ser básico, para tanto verifique se a fenolftaleína deu a solução uma coloração rósea. Atenção, pois a cor fica um tanto mascarada pelo verde da bile. Caso negativo adicione solução de NaOH, gota a gota, até que a mistura adquira uma tonalidade rósea. Verifique se o tom róseo se mantém após 1 ou 2 horas, resultado negativo indica a presença de lipase.

D) Teste de protease.

Goteje sobre a superfície gelatinosa de um filme fotográfico velado e seco algumas gotas das seguintes misturas:

- Solução de tripsina
- Extrato de estilete cristalino ou suco digestivo de crustáceo
- Água do mar.

Coloque os filmes em uma placa de petry com papel de filtro umedecido e deixe numa estufa a 37°C por 1 ou 2 horas .Lave o filme se a gelatina tiver sido digerida, as partículas de prata do filme sairão e deixarão uma mancha clara.