**Estudio de la cinética enzimática de la α – amilasa**

José Manuel Parra Claros†, Camilos Vásquez Rodríguez†, Juan Sebastián Barbosa†

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

|  |
| --- |
| **RESUMEN:**  El resumen debe contar con 5 componentes principales: Introducción, objetivo principal, resumen de metodología, resultados principales y las conclusiones más relevantes. Se recomienda no extenderse más 300 palabras. Recuerden que este siempre será en inglés |

La α – amilasa es una enzima encargada de catalizador la hidrólisis de los enlaces alfa glucosídicos, presentes en los polisacáridos alfa glucosídicos de alto peso molecular, tales como el almidón y glucógeno, liberando así glucosa y maltosa.1,2 El mecanismo de dicha enzima es un tema de estudio aún, sin embargo se conoce que se encarga de romper los enlaces 1,6 α – glucosídicos, presentes en diferentes matrices de estudio, tales como la saliva humana. Sin embargo, este tipo de enzima se encuentra en otros diferentes compuestos tales como semillas, las cuales contienen almidón como reserva alimenticia, además de ser secretada por muchos hongos.

introducción debe tener los objetivos del laboratorio.

|  |
| --- |
| ***Figura x*.** Descripción de figura |

**■**SECCIÓN EXPERIMENTAL

**Escritura de procedimiento experimental escrito tipo artículo**

**Materiales:** Una solución de buffer de fosfato pH 6.9 fue preparada disolviendo 240 mg de fosfato de sodio y 39 mg de cloruro de sodio en 100 mL de agua tipo 1. El pH fue ajustado usando hidróxido de sodio y ácido clorhídrico 1 M. Posteriormente fue realizada una solución acuosa de NaOH 2 M. Usando 60 mg de tartrato de potasio y sodio y 40 mL de la solución de hidróxido de sodio se preparó una solución de la sal de tartrato 5.3 mM. Para el reactivo colorimétrico fueron adicionados 24 mL de agua tipo 1 en el rango de 50 a 70 °C, en un erlenmeyer cubierto con papel aluminio, 16 mL de la solución de tartrato de potasio y sodio, y 40 mL de una solución 96 mM de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Finalmente, se preparó una solución de almidón al 1 % con pH 6.9, usando el 100 mL del buffer previamente preparado y 1.0 g de almidón.

**Efecto de la concentración de la enzima:** Con el objetivo de determinar el efecto sobre la velocidad de la reacción que tiene la concentración de la enzima, se usaron 7 soluciones con volúmenes distintos de enzima. Estas soluciones se prepararon de la siguiente manera. En 7 tubos de ensayo se adicionaron 2.5 mL de la solución de almidón previamente preparada, los cuales fueron llevados por equilibrio térmico con un contenedor de agua a 35 °C, sobre estos, se adicionaron: 0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.8 y 1.0 mL de saliva y fueron llevados nuevamente a 35 °C por 10 minutos. Una vez agotado este tiempo, fueron retirados del baño y se adicionaron 1.5 mL del reactivo colorimétrico, seguidos de un periodo de ebullición constante por 15 minutos. Posteriormente los tubos fueron enfriados en un baño de hielo, y se adicionaron 1.0, 0.9, 0.7, 0.5, 0.3, 0.2 y 0.0 mL de agua tipo 1 correspondientemente, en cada tubo. Finalmente se tomaron alícuotas de 2.5 mL de agua, a las cuales se adicionaron 10 uL de las soluciones en los tubos.

**Efecto de la concentración del sustrato:** El estudio de la cantidad de sustrato, procede de manera análoga a la concentración de la enzima, salvo que se usan 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mL de la solución de almidón, en 7 tubos de ensayo. Luego del proceso de equilibrio térmico, fueron adicionados 0.5 mL de saliva. El resto del procedimiento, se realizó de la misma manera que en la sección anterior.

**Espectroscopía UV-vis:** Usando el blanco del estudio de la concentración de la enzima se tomó un espectro en el rango de 700 a 200 nm, usando celdas de plástico con una longitud del camino óptico de 1 cm. La longitud de onda de máxima absorbancia fue XXX nm. Usando esta longitud se midió la absorbancia de cada uno de los 14 tubos de ensayo mencionados anteriormente.

**■**RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de las posibles explicaciones a la variabilidad de los resultados observados, se encuentran aquellas asociadas a la complejidad química de la matriz en la que se encuentra la amilasa, así como las propiedades físicas de la saliva. En el caso de estas últimas, se debe tener en cuenta que la viscosidad de este fluido es relativamente alta comparada con el agua pura, puesto que a 20 °C esta última tiene un valor de viscosidad de 1.0016 mPa s, mientras que la saliva humana por su lado, tiene valores cercanos a 1.5 mPa s, lo cual implica aumento de cerca de 50 % respecto al agua. La viscosidad se encuentra relacionada con la difusión como un fenómeno de transporte, la difusión, a su vez depende de la geometría del espacio en la que esta tiene lugar. En el caso de los experimentos realizados, la sección transversal de los tubos de ensayos usados, puede jugar en contra de la difusión, dificultando en algunos casos el acceso del sustrato a la enzima, sumada a una posible deposición por la ausencia de agitación.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la saliva no es translúcida, por lo cual la ley de Beer se puede ver afectada al considerar que la absorbancia depende de la absortividad molar y concentración de todas las especies absorbentes en la solución. En general, dado que en las soluciones a estudiar en espectroscopía UV-VIS mantienen una concentración constante de todos los componentes, salvo por uno, el blanco de la solución neutraliza el efecto del resto de las especies adsorbentes. Sin embargo, en el caso de la concentración de la enzima, las soluciones con mayor concentración de saliva son más opacas debido a la dispersión de la luz con la saliva y no sólo por una mayor cantidad de producto. Si bien no necesariamente la luz es absorbida por la saliva, sí puede ser dispersada (de ahí el color grisáceo de la misma) siendo registrada por el detector como luz absorbida por la muestra, aumentando la concentración aparente en la gráfica 1. Lo anterior también está soportado por la gráfica 2, en la cual la variación de la absorbancia es mínima salvo por un dato, resultados que coinciden con la adición del mismo volumen de saliva en todos los tubos, salvo en uno, el cual pudo haber quedado mal rotulado y registrado como volumen 2.5 mL, de tal forma que al no tener saliva, la dispersión de la luz es considerablemente menor, dando lugar a una absorbancia fuera de la tendencia observada en la misma.

**■**CONCLUSIONES

Reflexiones de los resultados obtenidos sintetizando lo discutido en el texto. Las conclusiones deben ir en línea con los objetivos de la práctica planteados en el informe.

**■**REFERENCIAS

Referencias tipo ACS.

John R. Rumble, ed. (2018). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (99th ed.). Boca Raton, FL: CRC Pres

Flink, Håkan. *Unstimulated human whole saliva flow rate in relation to hyposalivation and dental caries*. Institutionen för odontologi/Department of Odontology, 2005.