

	Governo do Estado do Rio Grande do Norte Secretaria de Estado da Educação, da Cultura e dos Desportos - SECD UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN Faculdade de Ciências da Saúde - FACS Disciplina: Citologia e Organização Biomolecular 12 Créditos – 180h e-mail: wogel.uern@gmail.com fone: (84) 3318-3708 Mossoró –RN	
	ROTEIRO PARA AULA PRÁTICA Aula 4: Atividade Enzimática da Fosfatase Total	

I. Introdução

As fosfatases são hidrolases que agem sobre compostos de fósforo, e encontra-se em diversas formas moleculares, podendo ser classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, dependendo do pH necessário para o desenvolvimento de sua atividade ótima. A catálise enzimática, em geral, é caracterizada pela interação entre o substrato e o sítio ativo. A atividade das enzimas depende de uma série de fatores, como a concentração de substrato e da enzima, a composição do meio de reação, temperatura, pH, íons, inibidores, entre outros.

II. Efeito da Concentração do Substrato:

1. Preparar 4 soluções de *p*-nitrofenilfosfato (1mM, 2mM, 5mM e 10mM) a partir da solução estoque de *p*-nitrofenilfosfato a 50mM;
2. Em 4 tubos de ensaio acrescentar, separadamente:
 - A. 100uL de solução de *p*-nitrofenilfosfato nas concentrações já preparadas;
 - B. 50uL de Soro;
 - C. 850uL de Tampão Acetato de Sódio a 100mM;
3. Branco (4 tubos):
 - A. 100uL de *p*-nitrofenilfosfato (1mM, 2mM, 5mM e 10mM);
 - B. 50uL de Água Destilada;
 - C. 850uL de Tampão Acetato de Sódio a 100mM.
4. Incubar a 37°C em banho-maria por 30 minutos;
5. Frear a reação com 1000uL da solução de NaOH a 0,5M;
6. Efetuar a leitura no espectrofotômetro a 405 nm.

III. Efeito da Diferença de Temperatura:

1. Preparar 1000uL de *p*-nitrofenilfosfato a 5mM a partir da solução estoque de *p*-nitrofenilfosfato a 50mM;
2. Em 3 tubos de ensaio, acrescentar:
 - A. 100uL de *p*-nitrofenilfosfato a 5mM;
 - B. 50uL de Soro;

	Governo do Estado do Rio Grande do Norte Secretaria de Estado da Educação, da Cultura e dos Desportos - SECD UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN Faculdade de Ciências da Saúde - FACS Disciplina: Citologia e Organização Biomolecular 12 Créditos – 180h e-mail: wogel.uern@gmail.com fone: (84) 3318-3708 Mossoró –RN	
	ROTEIRO PARA AULA PRÁTICA Aula 4: Atividade Enzimática da Fosfatase Total	

- C. 850uL de Tampão Acetato de Sódio a 100mM.
3. Branco (3 tubos):
 - A. 100uL de *p*-nitrofenilfosfato a 5mM;
 - B. 50uL de Água Destilada;
 - C. 850uL de Tampão Acetato de Sódio a 100mM
4. Incubar a 37°C, 45°C e 60°C em banho-maria por 30 minutos;
5. Frear a reação com 1000uL da solução de NaOH a 0,5M;
6. Efetuar a leitura no espectrofotômetro a 405 nm.

IV. Efeito do pH:

1. Em 3 tubos de ensaio, acrescentar:
 - A. 100uL de *p*-nitrofenilfosfato a 5mM;
 - B. 50uL de Soro;
 - C. 850uL de Tampão Acetato de Sódio a 100mM.
2. Branco (3 tubos):
 - A. 100uL de *p*-nitrofenilfosfato a 5mM;
 - B. 50uL de Água Destilada;
 - C. 850uL de Tampão Acetato de Sódio a 100mM.
3. Aferir o pH para 4,0 – 5,0 e 8,0;
4. Incubar a 37°C em banho-maria por 30 minutos;
5. Frear a reação com 1000uL da solução de NaOH a 0,5M;
6. Efetuar a leitura no espectrofotômetro a 405 nm.

V. Questão Clínica Aplicada:

Em indivíduos do sexo masculino, a fração prostática representa em torno de 50% da fosfatase ácida total, sendo o restante proveniente do fígado e de desintegração das plaquetas e eritrócitos. Para o sexo feminino é proveniente do fígado, eritrócitos e plaquetas. Os níveis de fosfatase ácida no soro apresentam importância clínica no diagnóstico e monitorização do câncer prostático, em especial pelo emprego da fração prostática da fosfatase (FACP). Dessa forma, levando em consideração os resultados dessa prática realizada hoje, nos seus valores observados com base na atividade enzimática PH se tratou de qual tipo de fosfatase? Por quê? Essa prática pode ser um teste diagnóstico para o emprego da fração prostática da fosfatase nos indivíduos do sexo masculino e consequentemente monetarização do câncer prostático?