

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Atividade Enzimática – Ascorbato Oxidase (PAX) Para Frutas



Espectrofotometro + Cubeta de Quartzo
Vortex (Agitador de Tubos)
Centrífuga Refrigerada



O procedimento necessita de três soluções: Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com EDTA (0.1 mol/L), Solução de Ácido Ascórbico (0,015 M) e Solução de H_2O_2 (0,03%).

Para produzir a Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com EDTA (0.1 mol/L) deve-se produzir antes as soluções: Solução 0,10 M de Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e Solução 0,10 M de Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4).

Solução 0,10 M de Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)

Cada amostra requer mais ou menos 6 mL de solução

Para 100 mL de solução → 1,36 g Fosfato de Potássio Monobásico

Para 250 mL de solução → 3,40 g Fosfato de Potássio Monobásico

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.0

Solução 0,10 M de Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)

Cada amostra requer 11 mL de solução

Para 100 mL de solução → 1,74 g Fosfato de Potássio Dibásico

Para 250 mL de solução → 4,35 g Fosfato de Potássio Dibásico

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.0

Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 7.0

Cada amostra requer 12 mL de solução

Para 100 mL de solução → 100 mL da solução de fosfato dibásico

Para 250 mL de solução → 250 mL da solução de fosfato dibásico

Ajustar o pH para 7.0 adicionando pouco a pouco a solução 0,10 M de fosfato monobásico (aproximadamente 60 mL de fosfato monobásico para cada 100 mL do fosfato dibásico)

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.0 com EDTA



Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com EDTA (0.1 mol/L)

Cada amostra requer 10 mL de solução

Para 100 mL de solução → 100 mL da solução tampão fosfato pH 7.0
2,92 g de EDTA

Para 250 mL de solução → 250 mL da solução tampão fosfato pH 7.0
7,30 g de EDTA

Solução de Ácido Ascórbico (0,015 M)

Cada amostra requer 0,05 mL de solução

Para 50 mL de solução → 50 mL de água
0,13 g de ácido ascórbico

Solução de H₂O₂ (0,03%)

Cada amostra requer 0,05 mL de solução

Para 100 mL de solução → 0,1 mL de H₂O₂ 30%



Preparo

Pesar 2 g de Fruta *in Natura*

ou o equivalente de fruta seca a 2 g da fruta *in natura*

Macerar ou cortar a fruta em pedaços bem pequenos
Colocar a amostra em Becker pequeno

Adicionar 10 mL de tampão fosfato pH 7.0 com EDTA
Homogeneizar usando um Turrax até formar uma pasta ou suco

Transferir para tubo de centrifuga



Centrifugação

Centrifugar a amostra em centrífuga refrigerada

Condições: 4 °C, 14000 rpm, 20 min

Manter em geladeira ou em bolsa de gelo após centrifugação.



Preparação

Prepare a referência (branco) e todas as amostras ao mesmo tempo. Prepare cada uma em um tubo de ensaio e ao final transfira rapidamente para as cubetas de acrílico ou quartzo.



Referência (Branco)

Adicionar 0,30 mL de água destilada

Adicionar 1,10 mL de tampão fosfato pH 7.0 com EDTA

Adicionar 0,05 mL de solução de H_2O_2

Adicionar 0,05 mL de solução de ácido ascórbico

Obs: Esta sequência é extremamente importante. Siga a sequência.

Amostras (Fase sobrenadante do centrifugado)

Adicionar 0,30 mL de amostra

Adicionar 1,10 mL de tampão fosfato pH 7.0 com EDTA

Adicionar 0,05 mL de solução de H_2O_2

Adicionar 0,05 mL de solução de ácido ascórbico

Obs: Esta sequência é extremamente importante. Siga a sequência.

Agitar rapidamente e transferir para cubeta

Obs: Esta é uma reação química rápida. Se demorar demais entre preparar as amostras e fazer as leituras, todo o procedimento poderá não dar certo.



Leitura

Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico ou quartzo

Leitura a 265 nm a cada 30 s por 5 min

Fazer gráfico Abs x tempo

Ajustar uma reta aos pontos – usar somente os pontos que estiverem na faixa linear do gráfico

A atividade será proporcional ao coeficiente angular da reta



Observações

Caso não haja variação na leitura

Pode ser necessário aumentar a quantidade de amostra inicial (pouca enzima na fruta) – o ideal é fazer testes iniciais com 1 g, 2 g e 4 g de amostra e verificar a melhor opção para a quantidade de amostra a ser utilizada.

Pode ser que a fruta não tenha quantidade significativa da enzima – verificar dados de literatura

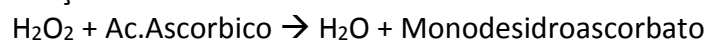
O tampão 0,10 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com EDTA pode ser guardado por longos períodos de tempo em geladeira.





O ácido ascórbico e a água oxigenada servem como substrato para a enzima.

Reação:



Referência

(Nakano & Asada, 1980)

Nakano, Y., & Asada, K. (1980). Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiology*, 21, 1295–1307.

