

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Atividade Enzimática – Pectinmethylesterase (PME)

Para Frutas



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



O procedimento necessita de três soluções:

- Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com NaCl (10 % w/v),
- Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com Azul de Bromotimol e
- Solução de Pectina (0.5%).

Para produzir a Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 deve-se produzir antes as soluções: Solução 0,05 M de Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e Solução 0,05 M de Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4).

A Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 servirá de base para produzir as Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com NaCl (10 % w/v) e a Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com Azul de Bromotimol

Solução 0,05 M de Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)

Cada amostra requer mais ou menos 5 mL de solução

Para 100 mL de solução → 0,68 g Fosfato de Potássio Monobásico

Para 250 mL de solução → 1,70 g Fosfato de Potássio Monobásico

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.5

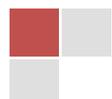
Solução 0,05 M de Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)

Cada amostra requer 11 mL de solução

Para 100 mL de solução → 0,87 g Fosfato de Potássio Dibásico

Para 250 mL de solução → 2,18 g Fosfato de Potássio Dibásico

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.5



Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5

Cada amostra requer 10 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 7.5 adicionando pouco a pouco a solução 0,05 M de fosfato monobásico (aproximadamente 50 mL de fosfato monobásico para cada 100 mL do fosfato dibásico)

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.5 com NaCl e a solução tampão fosfato pH 7.5 com azul de bromotimol

Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com NaCl (10 % w/v)

Cada amostra requer 10 mL de solução

Para 100 mL de solução → 100 mL da solução de tampão fosfato pH 7.5
10 g de NaCl

Para 200 mL de solução → 200 mL da solução de tampão fosfato pH 7.5
20 g de NaCl

Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com Azul de Bromotimol

Cada amostra requer 1,0 mL de solução

Para 50 mL de solução → 50 mL da solução tampão fosfato pH 7.5
0.004 g de bromotimol

Obs: A solução tampão com bromotimol deve ter uma leitura no espectrofotômetro entre 1,6 a 1,4 (preferencialmente próxima de 1,5). Para chegar neste valor recomenda-se fazer a solução e acertar a coloração diluindo a solução com bromotimol com a solução tampão sem bromotimol.

Obs: Esta solução deve ser preparada no dia do uso.

Solução de Pectina (0.5%)

Cada amostra requer 0,5 mL de solução

Para 10 mL de solução → 0.05 g de pectina

Para 50 mL de solução → 0.25 g de pectina



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 7.5 com NaCl

Homogeneizar usando um Turrax até formar uma pasta ou suco

Obs: ver observações no final

Transferir para tubo de centrifuga





Extração

Corrigir o pH da amostra para 7.5 com NaOH (caso necessário)

Obs: ver observações no final

Manter em geladeira (4 °C) por 30 min



Centrifugação

Centrifugar a amostra em centrífuga refrigerada

Condições: 4 °C, 10000 rpm, 20 min

Manter em geladeira ou em bolsa de gelo após centrifugação.



Leitura

Prepare a referência 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.

Atenção: Neste procedimento há o branco, a referência e a amostra. Uma cubeta de água pura é usada para o branco da absorbância; uma cubeta com água no lugar de amostra é usada para a referência das medidas; e uma cubeta com a amostra é usada para medir a atividade enzimática. Desta forma no mínimo três posições no espectro são necessárias:

Posição 1 – Água pura (será usada como branco – zero de Absorção)

Posição 2 – Água + Tampão com Bromotimol + Pectina (Referência para cálculos)

Posição 3 – Amostra + Tampão com Bromotimol + Pectina

Branco

Adicionar água destilada à cubeta

Referência

Adicionar 0,25 mL de água destilada

Adicionar 1,00 mL de tampão fosfato pH 7.5 com bromotimol

Adicionar 0,50 mL de pectina

Amostras (Fase sobrenadante do centrifugado)

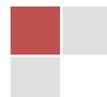
Adicionar 0,25 mL de amostra

Adicionar 1,00 mL de tampão fosfato pH 7.5 com bromotimol

Adicionar 0,50 mL de pectina

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.



Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico ou quartzo

Leitura a 620 nm a cada 1 min por 10 min



Cálculos

Usar planilha de cálculo para realizar os cálculos.

Como a referência (Água + Tampão com Bromotimol + Pectina) tem decaimento com o tempo, esta variação deve ser descontada.

Abs corrigida da amostra = Abs amostra – (Abs referência – Abs inicial da referência)

Fazer gráfico Abs x tempo

Ajustar uma reta aos pontos

Obs: A coloração do bromotimol está relacionada com o pH da amostra. Ao se colocar o extrato enzimático (amostra) o pH da solução se ajusta e a primeira leitura pode ocorrer durante a fase de ajuste. Neste caso se a segunda leitura for muito menor do que a primeira, esta primeira leitura deve ser desconsiderada ao se fazer o ajuste da reta.

A atividade será proporcional ao coeficiente angular da reta



Observações

O ideal é que o pH da amostra após o preparo esteja entre 7.0 e 8.0

Caso o pH seja menor que 7.0

Testar, na etapa de preparação, substituir o tampão fosfato pH 7.5 por fosfato de potássio dibásico (pH 8.5). Esta substituição pode corrigir facilmente o pH de algumas amostras ácidas.

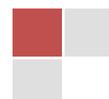
Se a substituição por fosfato de potássio dibásico não corrigir o pH, então o pH deve ser ajustado com solução de hidróxido de sódio 0.5 mol/L.

Ajustar até que o pH fique próximo de 7.5

Leituras iniciais de absorbância entre 0,800 a 1,500 são desejáveis.

Caso a primeira leitura seja menor que 0,800

Verifique o pH da amostra (extrato enzimático). Ele pode estar muito baixo (< 6.0). Neste caso deve ser ajustado com solução de hidróxido de sódio 0.5 mol/L.



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 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 pode ser guardado por longos períodos de tempo em geladeira.



A pectina serve como substrato para a enzima.

A leitura de absorbância varia com a mudança no pH da amostra durante o tempo de leitura.



Referência

(Hagerman & Austin, 1986)

Hagerman, A. E., & Austin, P. J. (1986). Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3, 440–444.

