

# ANÁLISES BIOQUÍMICAS

## Atividade Enzimática - Peroxidase (POD)

### Para Sucos de Fruta



Espectrofotometro + Cubeta de Acrílico (ou quartzo)  
Vortex (Agitador de Tubos)



O procedimento necessita de três soluções:

- Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com PVP (1% w/v),
- Solução 0,10 M de Tampão Fosfato-Citrato pH 5.0 com Guaiacol,
- Solução 0,3% de  $H_2O_2$ ,

Para produzir a Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com PVP (1% w/v) deve-se produzir antes as soluções: Solução 0,05 M de Fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) com KCl e Solução 0,05 M de Fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) com KCl.

Para produzir a Solução 0,10 M de Tampão Fosfato-Citrato pH 5.0 com Guaiacol deve-se produzir antes as soluções: Solução 0,10 M de Ácido cítrico e Solução 0,10 M de Fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ ). A Solução 0,10 M de Tampão Fosfato-Citrato pH 5.0 (*sem Guaiacol*) pode ser guardada em geladeira por longos períodos.

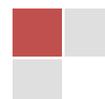
Solução 0,05 M de Fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) com KCl

**Cada amostra requer mais ou menos 6 mL de solução**

Para 100 mL de solução → 0,68 g Fosfato de Potássio Monobásico  
0,75 g KCl

Para 500 mL de solução → 3,40 g Fosfato de Potássio Monobásico  
3,72 g KCl

**Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.0**



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

Cada amostra requer 10 mL de solução

Para 100 mL de solução → 0,87 g Fosfato de Potássio Dibásico  
0,75 g KCl

Para 500 mL de solução → 4,35 g Fosfato de Potássio Dibásico  
3,72 g KCl

*Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.0*

Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com PVP (1% w/v)

Cada amostra requer 10 mL de solução

Para 100 mL de solução → 100 mL da solução 0,05 M de fosfato dibásico  
1 g de PVP

Para 500 mL de solução → 500 mL da solução de fosfato dibásico  
5 g de PVP

Ajustar o pH para 7.0 usando a solução 0,05 M de fosfato monobásico

Solução 0,10 M de Ácido cítrico

Cada amostra requer 1 mL de solução

Para 20 mL de solução → 0,38 g Ácido cítrico

Para 50 mL de solução → 0,95 g Ácido cítrico

*Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato-citrato pH 5.0*

Solução 0,10 M de Fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ )

Cada amostra requer mais ou menos 1 mL de solução

Para 20 mL de solução → 0,54 g Fosfato de sódio dibásico anidro

Para 50 mL de solução → 1,35 g Fosfato de sódio dibásico anidro

*Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato-citrato pH 5.0*

Solução 0,10 M de Tampão Fosfato-Citrato pH 5.0

Cada amostra requer 1,0 mL de solução

Para 20 mL de solução → 50 mL da solução 0,10 M de ácido cítrico

Para 50 mL de solução → 100 mL da solução 0,10 M de ácido cítrico

Ajustar o pH para 5.0 usando a solução 0,10 M de fosfato de sódio dibásico

*Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato-citrato pH 5.0 com guaiacol*

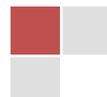
Solução 0,10 M de Tampão Fosfato-Citrato pH 5.0 com Guaiacol

Cada amostra requer 1,0 mL de solução

Para 20 mL de solução → 20 mL da solução tampão fosfato-citrato pH 5.0  
0,20 mL de guaiacol

Para 50 mL de solução → 50 mL da solução tampão fosfato-citrato pH 5.0  
0,50 mL de guaiacol

*Obs: Esta solução se degrada rapidamente e deve ser preparada pouco antes de fazer as leituras no espectrofotômetro. Deixar a solução tampão fosfato-citrato pH 5.0 preparada e deixar para adicionar o guaiacol logo que a etapa de centrifugação terminar (Etapa 2)*



Solução 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Cada amostra requer 0,1 mL de solução

Para 10 mL de solução → 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%



### Preparação

Em um tubo de ensaio:

Adicionar 2 mL de suco de fruta  
Adicionar 10 mL de tampão fosfato pH 7.0 com PVP  
Homogeneizar em agitador de tubos



### 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).

*Referência (Branco)*

Adicionar 0,60 mL de água destilada  
Adicionar 1,00 mL de tampão fosfato-citrato pH 5.0 com guaiacol  
Adicionar 0,10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%

*Amostras (Fase sobrenadante do centrifugado)*

Adicionar 0,60 mL de amostra  
Adicionar 1,00 mL de tampão fosfato-citrato pH 5.0 com guaiacol  
Adicionar 0,10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%

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 470 nm a cada 1 min por 10 min

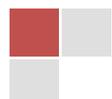


### Calculos

Fazer gráfico Abs x tempo  
Somente a seção linear da curva deve ser usada → Remover os pontos da seção não linear.

Ajustar uma reta aos pontos

A atividade será proporcional ao coeficiente angular da reta





Leituras entre 0,050 a 1,500 são desejáveis

Caso a leitura seja menor que 0,050 ou não haja variação na leitura

Pode ser necessário aumentar a quantidade de amostra inicial – o ideal é fazer testes iniciais com 1, 2 e 5 mL de suco 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 método de preparação (Etapa 1) é igual ao da polifenoloxidase (PPO), então a mesma amostra inicial pode ser usada para determinar a atividade da PPO e da POD.

Os tampões 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com PVP e Solução 0,10 M de Tampão Fosfato-Citrato pH 5.0 (sem guaiacol) podem ser guardados por longos períodos de tempo em geladeira.



O PVP serve para extrair os fenóis que podem interferir na determinação da atividade da enzima.

Guaiacol serve como substrato para a enzima.



Referência

(Matsuno & Uritani, 1972)

Matsuno, H., & Uritani, I. (1972). Physiological behavior of peroxidases isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. *Plant & Cell Physiology*, 13, 1091–1101.

