

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Atividade Enzimática - Peroxidase (POD)

Para Frutas



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



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 0,3% de H_2O_2

Cada amostra requer 0,1 mL de solução

Para 10 mL de solução → 0,1 mL de H_2O_2 30%

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 de degrada rapidamente e deve ser preparada pouco antes de fazer as leituras no espectrofotômetro. Deixar a solução tampão fosfato-citrato pH5.0 preparada e deixe para adicionar o guaiacol logo que a etapa de centrifugação terminar (Etapa 2)



Extração

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 PVP

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.



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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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.

Leitura a 470 nm a cada 1 min por 10 min



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 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 método de extração da enzima (Etapas 1 e 2) é igual ao da peroxidase (POD), 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.



(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.

