

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Atividade Enzimática - Polifenoloxidase (PPO)

Para Frutas



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



O procedimento necessita de duas soluções:

- Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.0 com PVP (1% w/v),
- Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 6.0 com Catecol,

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 pH 6.0 com Catecol 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).

A Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 6.0 (*sem Catecol*) 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 Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) com KCl

Cada amostra requer 2 mL de solução

Para 50 mL de solução → 0,68 g Fosfato de Potássio Monobásico
0,37 g KCl

Para 100 mL de solução → 1,36 g Fosfato de Potássio Monobásico
0,75 g KCl

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 6.0

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

Cada amostra requer mais ou menos 1,2 mL de solução

Para 50 mL de solução → 0,87 g Fosfato de Potássio Dibásico
0,37 g KCl

Para 100 mL de solução → 1,74 g Fosfato de Potássio Dibásico
0,75 g KCl

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 6.0

Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 6.0

Cada amostra requer 1,85 mL de solução

Para 50 mL de solução → 50 mL da solução 0,10 M de fosfato monobásico

Para 100 mL de solução → 100 mL da solução 0,10 M de fosfato monobásico

Ajustar o pH para 6.0 usando a solução 0,10 M de fosfato dibásico

Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 6.0 com catecol



Solução 0,10 M de Tampão Fosfato pH 6.0 com Catecol (0,02 mol/L)

Cada amostra requer 1,85 mL de solução

Para 20 mL de solução → 20 mL da solução tampão fosfato pH 6.0
0,14 g de catecol

Para 50 mL de solução → 50 mL da solução tampão fosfato pH 6.0
0,35 g de catecol

Obs: Esta solução de degrada rapidamente e deve ser preparada pouco antes de fazer as leituras no espectrofotômetro. Deixar a solução tampão fosfato pH 6.0 preparada e deixe para adicionar o catecol 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 0,30 mL de água destilada

Adicionar 1,85 mL de tampão fosfato pH 6.0 com catecol

Amostras (Fase sobrenadante do centrifugado)

Adicionar 0,30 mL de amostra

Adicionar 1,85 mL de tampão fosfato pH 6.0 com catecol

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 395 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



Observações

Leituras entre 0,050 a 1,500 são desejáveis

Caso a mistura para as cubetas fique turva:

Há excesso de catecol. Diminuir a quantidade usada. Testar fazer uma solução tampão com catecol 0,015 mol/L ou 0,010 mol/L

Não fazer leituras caso a mistura fique turva. Deu errado.

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, 3 g e 5 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 pH 6.0 (sem catecol) 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.

Catechol serve como substrato para a enzima.





Referência

(Wissemann & Lee, 1980)

Wissemann, K. W., & Lee, C. Y. (1980). Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31, 206–211.

