

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Atividade Enzimática – Ascorbato Oxidase (PAX)



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



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 500 mL de solução → 6,80 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 500 mL de solução → 8,70 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 500 mL de solução → 500 mL da solução de fosfato dibásico

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

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 500 mL de solução → 500 mL da solução tampão fosfato pH 7.0
14,60 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.



Leitura

Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico

Branco = Água

Amostra = Fase sobrenadante (fase líquida)

Para cada leitura use um tubo de ensaio

Adicionar 0,30 mL de amostra (ou água para a referência)

Adicionar 1,10 mL de tampão fosfato pH 7.0

Adicionar 0,05 mL de solução de H₂O₂

Adicionar 0,05 mL de solução de ácido ascórbico

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

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 265 nm a cada 30 s por 5 min





Calculos

Fazer gráfico Abs x tempo
Ajustar uma reta aos pontos

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 pode ser guardado por longos períodos de tempo em geladeira.



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

Reação:

