

# ANÁLISES BIOQUÍMICAS

## Atividade Enzimática - Polifenoloxidase (PPO)

### Para Frutas



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



Solução 0,05 M de Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 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 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 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 0,10 M de Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 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 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 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 0,05 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 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 5 g de Fruta *in Natura*

ou o equivalente de fruta seca a 5 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

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 o branco)  
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.*

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 2 g, 5 g e 10 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.

