

# ANÁLISES BIOQUÍMICAS

## Atividade Enzimática - Peroxidase (POD)

### Para Sucos de Fruta



Espectrofotometro + Cubeta de Acrílico  
Vortex (Agitador de Tubos)



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 0,05 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  $\text{H}_2\text{O}_2$

**Cada amostra requer 0,1 mL de solução**

Para 10 mL de solução → 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

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)*



**Preparação**

Medir 2 mL de suco de fruta

Adicionar 10 mL de tampão fosfato pH 7.0 com PVP

Homogeneizar usando vortex

Transferir para tubo de centrifuga





## Leitura

Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico  
Branco (Referência) = Água  
Amostra = mistura de suco de fruta e tampão com PVP (fase líquida)

Para cada leitura use um tubo de ensaio  
Adicionar 0,60 mL de amostra (ou água para o branco)  
Adicionar 1,00 mL de tampão fosfato-citrato pH 5.0 com guaiacol  
Adicionar 0,10 mL de  $H_2O_2$  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



## 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

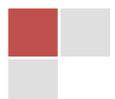
Caso a leitura seja menor que 0,050 ou não haja variação na leitura

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.

