

# ANÁLISES BIOQUÍMICAS

## Atividade Enzimática – Pectinmethylesterase (PME)



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



Solução 0,05 M de Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

**Cada amostra requer mais ou menos 5 mL de solução**

Para 100 mL de solução → 0,68 g Fosfato de Potássio Monobásico

Para 500 mL de solução → 3,40 g Fosfato de Potássio Monobásico

*Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.5*

Solução 0,05 M de Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

**Cada amostra requer 11 mL de solução**

Para 100 mL de solução → 0,87 g Fosfato de Potássio Dibásico

Para 500 mL de solução → 4,35 g Fosfato de Potássio Dibásico

*Obs: Usada para fazer a solução tampão fosfato pH 7.5*

Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5

**Cada amostra requer 10 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

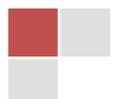
Ajustar o pH para 7.5 usando a solução 0,05 M de fosfato monobásico (aproximadamente 50 mL de fosfato monobásico para cada 100 mL do fosfato dibásico)

Solução de Pectina (0.5%)

**Cada amostra requer 0,5 mL de solução**

Para 10 mL de solução → 0.05 g de pectina

Para 50 mL de solução → 0.25 g de pectina



Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com NaCl (10 % w/v)

Cada amostra requer 10 mL de solução

Para 100 mL de solução → 100 mL da solução de tampão fosfato pH 7.5  
10 g de NaCl

Para 500 mL de solução → 500 mL da solução de tampão fosfato pH 7.5  
50 g de NaCl

Solução 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 com Azul de Bromotimol

Cada amostra requer 1,0 mL de solução

Para 50 mL de solução → 50 mL da solução tampão fosfato pH 7.5  
0.004 g de bromotimol

*Obs: A solução tampão com bromotimol deve ter uma leitura no espectrofotômetro entre 1,6 a 1,4 (preferencialmente próxima de 1,5). Para chegar neste valor recomenda-se fazer a solução e acertar a coloração diluindo a solução com bromotimol com a solução tampão sem bromotimol*



### 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 7.5 com NaCl

Homogeneizar usando um Turrax até formar uma pasta ou suco

*Obs: ver observações no final*

Transferir para tubo de centrifuga



### Extração

Corrigir o pH da amostra para 7.5 com NaOH (caso necessário)

*Obs: ver observações no final*

Manter em geladeira (4 °C) por 30 min



### 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 absorvância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico

Branco = Água

Referencia = Água

Amostra = Fase sobrenadante (fase líquida)

Para cada leitura use um tubo de ensaio

Adicionar 0,25 mL de amostra (ou água para a referência)

Adicionar 1,00 mL de tampão fosfato pH 7.5 com bromotimol

Adicionar 0,50 mL de pectina

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.*

Atenção: Uma cubeta de água pura é usada para o branco da absorvância; uma cubeta com água no lugar de amostra é usada para a referência das medidas; e uma cubeta com a amostra é usada para medir a atividade enzimática. Desta forma no mínimo três posições no espectro são necessárias:

Posição 1 – Água pura (será usada como branco – zero de Absorção)

Posição 2 – Água + Tampão com Bromotimol + Pectina (Referencia para calculos)

Posição 3 – Amostra + Tampão com Bromotimol + Pectina

Leitura a 620 nm a cada 1 min por 10 min



#### Calculos

Usar planilha de calculo para realizar os cálculos.

Como a referência (Água + Tampão com Bromotimol + Pectina) tem decaimento com o tempo, esta variação deve ser descontada.

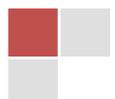
Abs da amostra corrigida = Abs amostra – (Abs referência – Abs inicial da referência)

Fazer gráfico Abs x tempo

Ajustar uma reta aos pontos

*Obs: A coloração do bromotimol está relacionada com o pH da amostra. Ao se colocar o extrato enzimático (amostra) o pH da solução se ajusta e a primeira leitura pode ocorrer durante a fase de ajuste. Neste caso se a segunda leitura for muito menor do que a primeira, esta primeira leitura deve ser desconsiderada ao se fazer o ajuste da reta.*

A atividade será proporcional ao coeficiente angular da reta





O ideal é que o pH da amostra após o preparo esteja entre 7.0 e 8.0

Caso o pH seja menor que 7.0

Testar, na etapa de preparação, substituir o tampão fosfato pH 7.5 por fosfato de potássio dibásico (pH 8.5). Esta substituição pode corrigir facilmente o pH de algumas amostras ácidas.

Se a substituição por fosfato de potássio dibásico não corrigir o pH, então o pH deve ser ajustado com solução de hidróxido de sódio 0.5 mol/L.

Ajustar até que o pH fique próximo de 7.5

Leituras iniciais de absorbancia entre 0,800 a 1,500 são desejáveis.

Caso a primeira leitura seja menor que 0,800

Verifique o pH da amostra (extrato enzimático). Ele pode estar muito baixo (< 6.0). Neste caso deve ser ajustado com solução de hidróxido de sódio 0.5 mol/L.

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 0,05 M de Tampão Fosfato pH 7.5 pode ser guardado por longos períodos de tempo em geladeira.



A pectina serve como substrato para a enzima.

A leitura de absorbância varia com a mudança no pH da amostra durante o tempo de leitura.

