

Otimização de método para obtenção de um extrato bruto de enzimas que atuam na parede celular de polpa de maçã

Tatiane Storch¹, Mariana Faber², Renata Moura¹, Norma Machado da Silva³,
Wandersom Ferreira⁴, César Luis Girardi⁵

O presente trabalho tem como objetivo aperfeiçoar o método de obtenção de extrato enzimático bruto de polpa de maçã para posterior análise de atividade enzimática a fim de avaliar o envolvimento de enzimas nos eventos que resultam em alterações na textura de frutos. Para tal, utilizou-se polpa pulverizada de maçã 'Gala Real' armazenada 6 meses em câmara fria sob temperatura de 0°C e umidade relativa de $\pm 95\%$. O método de extração testado foi baseado em Wei et al. (2010), porém algumas modificações fizeram-se necessárias. A extração consistiu em três fases principais: homogeneização, lavagem e extração. Utilizou-se 3 g de amostra pulverizada distribuída em 6 tubos eppendorf (0,5 g por tubo). Imediatamente após a pesagem da amostra, adicionou-se 1 mL de solução de homogeneização (polietilenoglicol 12% e bissulfito de sódio 0,2%) em cada tubo, agitou-se em vórtex e foi feita centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado através da adição de 1 mL de solução de lavagem (bisulfito de sódio 0,2%), seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e essa etapa de lavagem repetida por duas vezes, sendo que na última as condições de centrifugação foram 13.000 rpm por 20 minutos. Por fim, adicionou-se ao precipitado 1 mL de tampão de extração (0,1M acetato de sódio pH 5,2; 0,1M NaCl; 2% v/v de β -mercaptoetanol e 5% m/v de PVP), agitou-se e as amostras foram mantidas *overnight* sob refrigeração. Todas as centrifugações foram feitas a 4°C e as soluções utilizadas em baixas temperaturas. No dia seguinte, o sobrenadante foi recolhido, consistindo assim, no extrato bruto, o qual foi quantificado com o reagente de Bradford contra uma curva padrão de BSA (soroalbumina bovina) para, posteriormente ser utilizado para testes de atividade enzimática. Foram feitas três extrações da amostra indicada acima, obtendo-se os seguintes resultados: 0,058 mg/mL; 0,058 mg/mL e 0,046 mg/mL. Assim, considerando que os resultados foram próximos pode-se concluir que o método tem repetibilidade, podendo-se utilizar o extrato obtido para avaliar a atividade das enzimas de interesse.

¹ Mestranda do programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, UFPEl, Caixa Postal 354, 96010-900 Pelotas, RS. tatistorch86@hotmail.com

² Graduanda do curso de Agronomia UFPR, Pato Branco, PR

³ Pós-doutoranda Embrapa Uva e Vinho. Bolsista PNPd. normamsilva@yahoo.com.br

⁴ Assistente laboratório de Pós-colheita Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento 515, Caixa Postal 130 95700-000 Bento Gonçalves, RS. wferreira@cnpuv.embrapa.br

⁵ Pesquisador Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento 515, Caixa Postal 130 95700-000 Bento Gonçalves, RS. girardi@cnpuv.embrapa.br