

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Departamento de Química e Bioquímica
Análises Químicas e Bioquímicas em vegetais
Eng. Agrônomo Me. Gean Charles Monteiro
Prof^a. Dr^a. Giuseppina Pace Pereira Lima

Catalase (CAT)

1. INTRODUÇÃO

A enzima catalase (CAT – EC 1.11.1.6) está presente na maioria das células aeróbicas, são enzimas indispensáveis para desintoxicação das células das plantas em condições de stress (bióticos e/ou abióticos), são responsáveis pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , reduzindo o conteúdo de peróxido (H_2O_2). Entretanto, a enzima é a principal via de degradação H_2O_2 e, portanto, a inibição da atividade de catalase resulta na ativação da resistência sistêmica adquirida nas plantas. A enzima proporciona aumento na tolerância ao estresse, passando a ajudar na regulação das respostas e aclimação aos estresses ambientais.

2. MÉTODO

2.1. Reagentes e soluções

A) Solução extratora: Tampão fosfato de potássio + EDTA + DTT + PVPP

1º Passo - Tampão de potássio 100 mmol L⁻¹ pH 7,5

- Pesar 17,41 g para 1000 mL (1 L) de água destilada de K_2HPO_4 (Dibásico).
- Pesar 13,60 g para 1000 mL (1L) de água destilada de KH_2PO_4 (Monobásico).
 - ✓ Após pesar e dissolver, passa-se para acertar o pH da solução para 7,5, onde, coloca-se a solução Monobásica sobre a Dibásica até chegar ao pH desejado (7,5).
 - ✓ Seguidamente, mede-se em balão volumétrico essa solução ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) com pH 7,5 para 1 L (1000 mL), o restante armazene em outro recipiente.

2º Passo

- Pesar 0,372 g de EDTA;
- Pesar 0,462 g de DTT;
- Pesar 0,300 g de PVPP.
 - ✓ Pegue a solução anteriormente separada (1 L) e dilua todos, após misturar todos na mesma solução de pH 7,5 e pronto.

Obs: Na maioria das vezes a solução monobásica sobra, se quiser economizar em reagente diminua (ex: 6,8 g de KH_2PO_4 para 500 mL).

B) Solução de determinação - Tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ pH 7,5

PM $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 174,18 \text{ g mol}^{-1}$

PM $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136,09 \text{ g mol}^{-1}$

- Pesar 17,41 g para 1000 mL (1 L) de água destilada de K_2HPO_4 (Dibásico).

- Pesar 13,60 g para 1000 mL (1L) de água destilada de KH_2PO_4 (Monobásico).
- ✓ Após pesar e dissolver, passa-se para acertar o pH da solução para 7,5, onde, coloca-se a solução Monobásica sobre a Dibásica até chegar ao pH desejado (7,5).

C) Solução de peróxido de hidrogênio 50 mM

$$\text{PM H}_2\text{O}_2 = 34,01 \text{ g mol}^{-1}$$

- Pipetar 560 μL (0,56 mL) de peróxido e diluir em 100 mL de água destilada.
- Colocar em um recipiente e armazenar em temperatura ambiente.

2.2. Ensaio

Extração:

Para a extração recomenda-se a utilização de material fresco e congelado com nitrogênio líquido.

- Macerar a amostra em nitrogênio líquido;
- Pesar 200 mg da amostra e anotar o peso;
- Colocar em tubo de plástico para centrifugar e adicionar 5 mL da solução tampão de extração (Tampão fosfato de potássio + EDTA + DTT + PVPP);
- Centrifugar a 6.000 a 10.000 rpm por 20-25 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C;
- Serão duas cubetas, onde uma ficará com a solução do branco (zerar o aparelho) e a outra com a solução de determinação da CAT.
- Recomenda-se fazer todo processo da metodologia no escuro ou com luzes especiais, para que não aja perda de atividade enzimática.
- Primeiramente preparar o branco e zerar o equipamento até que se estabilize.
- Preparar a amostra e agitar levemente e colocar no espectrofotômetro (também é possível fazer a pipetagem diretamente nas cubetas).

Obs: O mesmo extrato pode ser usado para analisar a atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) e Ascorbato Peroxidase (APX), para isso aumente de 5 para 8 mL do extrator (Tampão fosfato de potássio + EDTA + DTT + PVPP) no momento da extração.

Reação:

Em tubos de ensaio pipetar da seguinte maneira:



Branco da solução

- 1950 μL tampão de determinação
- 300 μL tampão de extração
- 750 μL solução de H_2O_2



Amostra

- 1950 μL tampão de determinação
- 150 μL tampão de extração
- 750 μL solução de H_2O_2
- 150 μL de extrato enzimático

- A reação é instantânea, no momento que colocar o extrato começa a leitura.
- Leitura a 240 nm (Espectrofotômetro).

- A leitura é realizada no tempo, ou seja, durante um período aproximadamente a 2 minutos (o tempo é determinado de acordo com cada amostra)
- Anotar as leituras a cada 10 segundos.

Obs: Leitura em cubetas de quartzo (Q). Se a leitura somente decrescer, estabilize um tempo específico (tendo uma leitura inicial e outra final somente), já se a leitura subir e diminuir neste período de 2 minutos é necessário fazer anotação da leitura a cada 10 segundos para a realização do cálculo (sempre anote o tempo).

2.3. Cálculo

1º- Anotar os pesos utilizados (g), volume de extração e volume pipetado do extrato.

2º- Cálculo CAT

$$\text{CAT} = \text{leitura inicial} - \text{leitura final}$$

3º- Dividir valor CAT pelo tempo de decréscimo da absorbância

Exemplo:

$$\text{CAT} = 0,066$$

Tempo = 2 minutos

$$\text{CAT}/\text{min} = \frac{0,066}{2} = 0,033$$

4º- Dividir a CAT/min pelo coeficiente de extinção do peróxido de hidrogênio (39,4 mM cm⁻¹).

$$\text{CAT} = \frac{0,033}{2,8} = 8,37 \times 10^{-4} \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

5º- Identificar o tamanho da cubeta utilizada, que no nosso laboratório é uma de 3 mL.

6º- Multiplicar o valor encontrado pelo tamanho da cubeta (3 mL) e transformar as unidades antes (μmol).

$$8,37 \times 10^{-4} \text{ em mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$3 / 1000 = 3 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$8,37 \times 10^{-4} \times 3 \times 10^{-3} = 2,51 \times 10^{-6} \text{ mmol min}^{-1} / 1000$$

$$\underline{\underline{X = 2,51 \times 10^{-9} \mu\text{mol min}^{-1}}}$$

7º- Calcular a relação volume

- Volume pipetado do extrato = 150 μL

- Volume após a centrifugação = 3000 μL

$$\frac{2,51 \times 10^{-9} \mu\text{mol min}^{-1} * 150 \mu\text{L}}{3000 \mu\text{L}} = 1,25 \times 10^{-10} \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g massa fresca (MF)}$$

8º- Para determinar a atividade total de CAT μmol H₂O₂ min⁻¹ g MF⁻¹

$$\frac{1,25 \times 10^{-10} \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g MF}}{0,101 \text{ g}} = 1,26 \times 10^{-9} \text{ CAT } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g MF}^{-1}$$

Laboratório de Química e Bioquímica Vegetal - LQBV

9°- Para a atividade específica da CAT, dividir o valor encontrado acima pela quantidade de proteína.

- Se utilizar o mesmo extrato da determinação da CAT para a determinação da proteína, o valor a ser utilizado é o encontrado através do cálculo normal para proteína. Se o extrato for diferente, deve-se:

Peso amostra (g) = 0,101 g

Quantidade de proteína (μg): resultado baseado no cálculo normal de proteínas solúveis com o método de Bradford (1976).

$$\text{Proteína } (\mu\text{g}) = 10608 \mu\text{g} \rightarrow 1 \text{ g massa fresca}$$

$$X \rightarrow 0,101 \text{ g}$$

$$X = 1071,40 \mu\text{g proteína em } 0,101 \text{ g de amostra fresca}$$

10°- Dividir a atividade total pela quantidade de proteína em 0,101 g (neste exemplo)

$$\frac{1,25 \times 10^{-10} \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g MF}}{1071,40 \mu\text{g proteína}} = 1,16 \times 10^{-13} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g ptn}^{-1}$$

$$\text{Ou } 1,16 \times 10^{-10} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg ptn}^{-1}$$

$$\text{Ou } 1,16 \times 10^{-7} \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g ptn}^{-1}$$

Bibliografia

KAR, Manoranjan; MISHRA, Dinabandhu. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.