

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

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

**Superóxido Dismutase (SOD)**

**1. INTRODUÇÃO**

A enzima superóxido dismutase (SOD – EC 1.11.1.6) converte o oxigênio prejudicial em peróxido de hidrogênio menos reativo, catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio, ou seja, onipresente em todos os organismos aeróbicos e compartimentos celulares propensos ao estresse oxidativo. Entretanto, o aumento da sua atividade está sempre relacionado a defesa das plantas, sendo relatado em aplicações de reguladores vegetais, estresses (seca, adubação, agroquímicos, etc.), entre outros. A enzima aumenta a tolerância ao estresse e provavelmente é uma das principais enzimas que regulam as 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 fosfato de potássio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5

- Pesar 17,41 g para 1000 mL (1 L) de água destilada de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dibásico).
- Pesar 13,60 g para 1000 mL (1L) de água destilada de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> para 500 mL).

B) Solução de determinação: tampão fosfato de sódio pH 7,8 (NaP)

- Pesar 10,053 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dibásico) para diluir em 500 mL de água destilada;
- Pesar 5,1746 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Monobásico) para diluir em 500 mL de água destilada;

- ✓ Após pesar e dissolver, passa-se para acertar o pH da solução para 7,8, onde, coloca-se a solução Monobásica sobre a Dibásica até chegar ao pH desejado (7,8).

C) Solução NBT

- Pesar 0,0081 g de NBT (Cloro de Azul Nitrotetrazólio) e diluir em 25 mL de água destilada.

Obs: Este reagente somente se faz no momento do uso, pois sua reação diminui ao longo do tempo.

D) Solução EDTA

- Pesar 3,684 g de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético) e diluir em 1000 mL de água destilada, após armazenar em geladeira.

E) Solução de Riboflavina

- Pesar 0,0074 g de Riboflavina e diluir em 1000 mL de água destilada.

Obs: Este reagente somente se faz no momento do uso, pois sua reação diminui ao longo do tempo.

F) Solução Metionina

- Pesar 0,2238 g de metionina e diluir em 25 mL de água destilada.

Obs: Este reagente somente se faz no momento do uso, pois sua reação diminui ao longo do tempo.

## 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;
- Utilizar para cada amostra dois tubos de ensaio, sendo um identificado como amostra e o outro como branco da amostra, além do terceiro tubo que será o controle.
- Recomenda-se fazer todo processo da metodologia no escuro ou com luzes especiais, para que não aja perda de atividade enzimática.
- Antes de iniciar a pipetagem, cobrir todos os tubos com papel alumínio, no momento de serem colocados sob a ação da luz retira-se dos tubos controle e amostra o papel alumínio (os tubos do branco da amostra continuaram cobertos por alumínio para não haver ação da luz sobre eles, pois os mesmos apresentam o mesmo conteúdo para reação do tubo da amostra “exceto a luz”) e coloca-se sobre ação da luz por 10 minutos (temperatura ambiente).

Obs: O mesmo extrato pode ser usado para analisar a atividade enzimática da Catalase (PPO) 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:



<b>Branco da solução</b>	<b>Branco da Amostra</b>	<b>Amostra</b>
- 2050 µL de tampão de determinação	- 2000 µL de tampão de determinação	- 2000 µL de tampão de determinação
- 250 µL de NBT	- 50 µL de extrato	- 50 µL de extrato
- 200 µL de EDTA	- 250 µL de NBT	- 250 µL de NBT
- 250 µL de Metionina	- 200 µL de EDTA	- 200 µL de EDTA
- 250 µL de Riboflavina	- 250 µL de Metionina	- 250 µL de Metionina
	- 250 µL de Riboflavina	- 250 µL de Riboflavina

- Após esperar por 10 minutos.
  - Leitura a 560 nm (Espectrofotômetro).
  - Zerar o espectrofotômetro com água antes de iniciar.
  - Se a leitura for negativa no Branco da Amostra não é necessário fazer o mesmo.
- Obs: Leitura em cubetas de quartzo (Q).

### 2.3. Cálculo

1° Passo

Leitura da amostra = Leitura amostra – Leitura branco da amostra

2° Passo – Calcular a percentagem de inibição

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Leitura branco da solução} - \text{Leitura da amostra})}{\text{Leitura branco da solução}}$$

3° Passo – Cálculo da unidade da SOD

- SOD é medida como quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT, portanto por regra de 3:

$$\begin{array}{l} 50\% \rightarrow 1 \text{ unidade} \\ \% \rightarrow X \end{array}$$

$$X =$$

4° Passo – Cálculo da atividade específica (AT) da SOD

$$AT = \% \text{ de inibição} * \text{volume da amostra (}\mu\text{L)} / U (50\%) * \text{proteína (}\mu\text{g)} \text{ prot. G. MF}^{-1}$$

Bibliografia

SUN, Y. I.; OBERLEY, Larry W.; LI, Ying. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.