



## METODOLOGIAS DE ANÁLISE DA ATIVIDADE DE DUAS ENZIMAS COM POTENCIAL USO EM BÍOSENSORES

Claudio M. Jonsson\*, Vera L.S. de Castro, Christina M. Tessari, Gustavo Granero

Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP

\*jonsson@cnpmma.embrapa.br

Projeto Componente: PC2 Plano de Ação: 01.05.1.01.02.02

### Resumo

As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) fazem parte dos sistemas antioxidantes nos seres vivos. A alteração da atividade da CAT e SOD extraídas de organismos expostos a poluentes químicos tem sido estudada na avaliação ecotoxicológica. São apresentados os resultados preliminares referentes à implementação de metodologias para avaliar as atividades de SOD e CAT frente à possível ação de diversos poluentes de origem agrícola. As metodologias empregadas demonstraram ser satisfatórias para estudos do potencial das enzimas no desenvolvimento de biossensores. Entretanto, alguns ajustes metodológicos poderão ser realizados com relação a uma melhor adaptação às condições laboratoriais.

**Palavras-chave:** biossensor, catalase, superóxido dismutase

### Introdução

As enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) fazem parte dos sistemas antioxidantes nos seres vivos pela sua capacidade de neutralizar a ação de espécies reativas de oxigênio como a do anion superóxido e do peróxido de hidrogênio. Estas moléculas altamente reativas fazem parte de subprodutos do metabolismo normal e desempenham papel importante nos processos de sinalização celular. Entretanto, em situações de estresse celular, as espécies reativas de oxigênio podem aumentar significativamente levando a danos celulares como alteração do DNA, peroxidação de lipídeos e oxidação de aminoácidos nas proteínas<sup>1</sup>. Portanto, a alteração da atividade da CAT e SOD extraídas de organismos expostos a poluentes químicos de diversas origens tem sido alvo de

estudo na análise de risco e monitoramento de áreas degradadas<sup>2</sup>.

Nesse sentido, Farines e colaboradores<sup>3</sup> testaram "in vitro" a capacidade de estrógenos fenólicos naturais e sintéticos em modular a SOD bovina; constatando que para alguns compostos a inibição da atividade era superior ou equivalente a ~90% na concentração de 100µM dos compostos. A mesma enzima, mas originária de eritrócitos, é inibida "in vitro" pela hidrazida maleica na concentração de ~40 µM<sup>4</sup>.

Alguns compostos tipicamente inibidores da CAT, entre estes, metais pesados como os sais de cianeto, tem a capacidade de inibir a enzima de origem microbiana em níveis menores de 10 µM. Para alguns desses compostos, como por exemplo, a azida sódica; têm sido propostos biossensores a base de CAT<sup>5</sup>.

Do mesmo modo biossensores a base de SOD tem sido propostos onde a atividade enzimática é

modulada pela presença de radicais superóxido<sup>6</sup>. Apesar de um significativo volume de dados da literatura a respeito de alteração das atividades de SOD e CAT em organismos expostos ao estresse de agroquímicos e outros poluentes de origem agrícola (estudos "in vivo"), existe uma carência de resultados de testes "in vitro". Entretanto, tanto para os estudos "in vivo" como "in vitro", os dados ainda são escassos frente ao grande número de princípios ativos existentes.

Os resultados destes estudos "in vitro", nos quais se mede a modulação da atividade enzimática pela adição do xenobiótico em um sistema de reação contendo a enzima e seu substrato, proporcionariam bases para o desenvolvimento de biossensores cujo funcionamento se fundamente na alteração da atividade de SOD e CAT.

No presente trabalho são apresentados os resultados preliminares realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança no que se refere à implementação de metodologias para avaliar as atividades de SOD e CAT, enzimas que serão testadas frente à possível ação de diversos poluentes de origem agrícola.

## Materiais e métodos

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Ukeda e colaboradores<sup>7</sup>, em meio contendo 50 mM de tampão fosfato pH 8,0 juntamente com solução 3mM de xantina; solução 3mM de EDTA, solução 0,75mM de XTT e SOD (de leite bovino) em diferentes concentrações. A reação foi iniciada pela adição de xantina oxidase. A absorvância da cor púrpura desenvolvida foi medida em um espectrofotômetro Beckman DU-8B no comprimento de onda de 470 nm. A velocidade da reação em termos de mudança de absorvância em função do tempo ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) foi calculada por regressão linear simples.

A atividade da CAT foi medida segundo a metodologia descrita por Aebi<sup>8</sup>, utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio como substrato em solução de tampão fosfato 50 mM pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição da CAT de fígado bovino sendo que a absorvância foi monitorada em vários intervalos no comprimento de onda de 240 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV 1605 PC. A adição do inibidor de CAT, a azida sódica, nas suas concentrações finais de 100, 10 e 1 mM foi avaliada. A velocidade da reação foi calculada como descrito anteriormente.

## Resultados e discussão

A metodologia de análise de SOD se fundamenta em que a enzima xantina oxidase, tendo como seu substrato a xantina e na presença de  $\text{O}_2$ , forma um sistema gerador de anions superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Estas espécies reativas de oxigênio, na presença de um cromóforo como o XTT (sal de tetrazólio), reduzem este composto para formar um derivado de formazano que absorve luz no comprimento de onda de 470 nm. Entretanto esta redução é inibida na presença de SOD pelo fato de requerer  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para formar peróxido de hidrogênio na presença de cátions  $\text{H}^+$ .

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de um teste onde se avaliou a viabilidade da metodologia a ser adotada na análise da atividade de SOD nos futuros estudos a serem realizados com diferentes substâncias poluentes de origem agrícola.

Analogamente, na Figura 1 estão apresentados os resultados de um teste de avaliação de uso da metodologia proposta para os futuros ensaios com CAT em presença dos xenobióticos.

Tabela 1: Velocidade de redução de XTT na ausência e na presença de diferentes concentrações de SOD.

Concentração de SOD (U/mL)	Velocidade da reação ( $\Delta\text{Abs}_{470\text{nm}}/\text{min}$ )
0,00	0,0075
0,45	0,0029
0,90	0,0016
2,26	0,0015

Os resultados da Tabela 1 demonstraram a diminuição da redução do XTT em função da concentração de SOD, sugerindo-se que exista uma concentração em que esse fenômeno se mantenha estável, mesmo aumentando-se a concentração desta enzima. O aumento da absorvância nos 20 min iniciais da reação na ausência de SOD foi equivalente a aproximadamente 0,12; estando de acordo com os resultados de Ukeda e colaboradores<sup>7</sup>.

Os resultados da Figura 1 mostraram a diminuição da absorvância do peróxido de hidrogênio em aproximadamente 60%, para o tempo de reação de 130 segundos, evidenciando assim o consumo do substrato pela CAT. A absorvância inicial da reação foi de aproximadamente 0,2, ou seja dentro da faixa de análise. Entretanto, a ação desta

enzima foi inibida na presença da azida sódica nas três concentrações testadas.

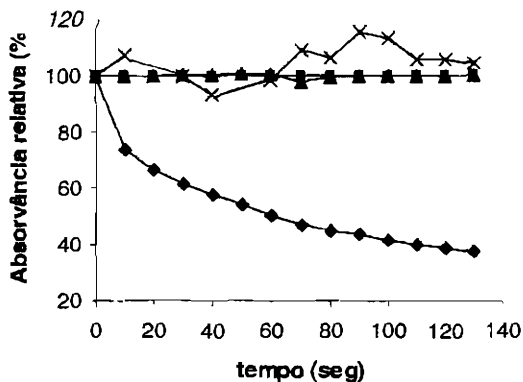


Figura 1: Absorvância (240 nm) do peróxido de hidrogênio em função do tempo de reação com CAT, na ausência (♦) e na presença de azida sódica nas concentrações de 100 (■); 10 (▲) e 1 (x) mM. Os valores são relativos a absorvância inicial, que foi tomada como 100%.

## Conclusões

Com base nos dados obtidos até o momento, as metodologias aqui propostas para a avaliação da atividade de SOD e CAT demonstraram ser satisfatórias para o uso em estudos com agentes poluentes de origem agrícola. Entretanto, alguns testes poderão ser realizados com relação a uma melhor adaptação às nossas condições laboratoriais.

## Referências

1 WORTH, A. C.; BAILEY, B. (Ed). **The Handbook of Oxidative Metabolism**. Chelmsford: ESA Inc, 1995.

2 PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ. B.; RAISUDDIN, S. **Markers of oxidative stress: a comparative**

study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Sci Total Environ**. [S. l.], v. 309, p. 105-115, 2003.

3 FARINES, V.; MONJE, M. C.; TELO, J. P.; HNAWIA, E.; SAUVAIN, M.; NEPVEU, F. Polyphenols as superoxide dismutase modulators and ligands for estrogen receptors. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 513, p. 103-111, 2004.

4 DOWLA, H. A.; PANEMANGALORE, M.; BYERS, M. E. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma in vitro by agricultural chemicals. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, [S. l.], v. 31, p. 107-114, 1996.

5 SEZGINTURK, M. K.; GOKTUG, T.; DINÇKAYA, E. A biosensor based on catalase for determination of highly toxic chemical azide in fruit juices. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 21, p. 684-688, 2005.

6 CAMPANELLA, L.; PERSI, L.; TOMASSETTI, M. Superoxide and nitric oxide radicals as modulating agents of enzymatic sensor responses. In : **WORKSHOP ON CHEMICAL SENSORS AND BIOSENSORS, 2**. [Anais...]. Rome: University of Rome "La Sapienza", Chemistry Department, 1999.

7 UKEDA, H.; MAEDA, S.; ISHII, T.; SAWAMURA, M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. **Anal. Biochem.**, [S. l.], v. 251, p. 251, 206-209, 1997.

8 AEBI, H. E. Catalase. In: BERGMAYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3<sup>th</sup> ed. Weinheim: Verlagchemie GmbH, 1983. v. 3.