



Foto: Saulo de Tarso Aídar.

## Adaptação de Protocolo para a Extração de Enzimas Antioxidantes em Folhas de Plantas Lenhosas

Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves<sup>1</sup>  
Saulo de Tarso Aídar<sup>2</sup>

### Introdução

Em ecossistemas como o Semiárido, em que prevalece baixa precipitação, alta intensidade de irradiância e altas temperaturas na maioria dos meses do ano, as plantas estão submetidas a condições de estresse fisiológico (NOGUÉS; BAKER, 2000), cuja adaptação dependerá da resposta de cada espécie/cultivar, alterando sua capacidade produtiva.

Danos fotooxidativos promovidos pela alta irradiância, deficit hídrico e alta temperatura são causados pela síntese de espécies ativas de oxigênio (EAO's), entre elas, os radicais superóxidos ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), os radicais hidroxilas ( $OH^*$ ) e o oxigênio "singlet" ( $^1O_2$ ). A proteção contra estes danos pode ocorrer às expensas de um eficiente sistema enzimático antioxidativo, o qual compreende a ação das

chamadas "enzimas antioxidantes", entre elas a Dismutase do Superóxido (SOD), a Catalase (CAT) e a Peroxidase do Ascorbato (APX) (ASADA, 1999). Entretanto, em plantas lenhosas, a alta concentração de substâncias fenólicas no tecido vegetal, que são utilizadas na proteção contra agentes predadores (TAIZ; ZIEGER, 2009), pode comprometer a obtenção de um extrato vegetal para a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes descritas anteriormente.

Na literatura, são descritos poucos protocolos para a obtenção de extratos vegetais objetivando a quantificação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX em plantas lenhosas. Alguns deles utilizam protocolos de extração específicos para diferentes enzimas antioxidantes, o que dificulta e onera a realização de algumas pesquisas. Por exemplo, em Pinheiro et al. (2004) e Pompelli et al. (2010), o meio de extração para a análise de SOD foi constituído de 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de

<sup>1</sup>Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fisiologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, agnaldo.chaves@embrapa.br.

<sup>2</sup>Biólogo, D.Sc. em Fisiologia Bioquímica de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, saulo.aidar@embrapa.br.

potássio (pH 7,8), 0,1 mmol L<sup>-1</sup> ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 5 mmol L<sup>-1</sup> ditioneitol (DTT), 15 mmol L<sup>-1</sup> mercaptoetanol, 0,1% de Triton X-100 (v/v) e 100% (p/p) de polivinilpirrolidona (PVPP); enquanto para a análise de CAT e APX, o meio de extração foi constituído de 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 2 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 20 mmol L<sup>-1</sup> de ascorbato, 0,1% de Triton X-100 (v/v) e 100% (p/p) de PVPP.

Rolão (2010), por sua vez, propôs um único meio de extração para a quantificação da atividade das enzimas citadas, reduzindo assim os custos envolvidos na sua determinação. Neste meio, foram utilizados 100 mmol L<sup>-1</sup> de tris-HCl (pH 7,5), 14 mmol L<sup>-1</sup> de mercaptoetanol, 250 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 20 mmol L<sup>-1</sup> de DTT, 20 mmol L<sup>-1</sup> metabissulfito de sódio, 200 mmol L<sup>-1</sup> de tetraborato de sódio, 10 mmol L<sup>-1</sup> de KCl, 0,1% de Triton X-100 (v/v), 7% de sacarose, 1% de albumina bovina e 10% (p/p) de PVPP. No entanto, esse meio forneceu um extrato vegetal que apresentou problemas na quantificação da atividade das enzimas antioxidantes anteriormente citadas em folhas de plantas lenhosas. Sendo assim, foram realizadas algumas alterações no protocolo de Rolão (2010) com a adição de EDTA e modificação das concentrações de ácido ascórbico e de DTT. O EDTA é um composto orgânico que age como agente quelante e que contribui para a formação de complexos proteicos estáveis com seus íons metálicos, mantendo as enzimas ativas. As concentrações de ácido ascórbico e de DTT, por sua vez, foram reduzidas para 150 mmol L<sup>-1</sup> e 10 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto a concentração de PVPP foi aumentada para 50% (p/p) no meio de extração, visto que esse reagente aumenta a capacidade de retirada dos fenóis presentes no extrato vegetal de plantas lenhosas. A albumina bovina foi retirada, pois foi observado que a sua ausência não prejudica a atividade.

O objetivo deste trabalho foi adaptar, a partir das metodologias descritas, um protocolo para a obtenção de extrato vegetal de plantas lenhosas para a quantificação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX, para aumentar sua eficiência e diminuir a quantidade de reagentes e, conseqüentemente, reduzir os custos de análise.

Este protocolo destina-se à obtenção de um extrato vegetal que pode ser utilizado na quantificação da atividade das enzimas antioxidantes em espectrofotômetro e em gel de atividade, de acordo com as metodologias utilizadas por Pinheiro et al. (2004) e Gratão et al. (2008).

## **Procedimento para a Obtenção do Extrato Vegetal para a Quantificação da Atividade das Enzimas SOD, CAT e APX em Folhas de Plantas Lenhosas**

Primeiramente, deve-se coletar 0,500 g de tecido foliar fresco, oriundo de folhas sadias e adultas de ramos posicionados no terço superior da planta, o qual deverá ser congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80 °C até o uso.

O meio de extração utilizado é constituído de 100 mmol L<sup>-1</sup> de tris-HCl (pH 7,5), 2 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 14 mmol L<sup>-1</sup> de mercaptoetanol, 150 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 10 mmol L<sup>-1</sup> de DTT, 20 mmol L<sup>-1</sup> metabissulfito de sódio, 200 mmol L<sup>-1</sup> de tetraborato de sódio, 10 mmol L<sup>-1</sup> de KCl, 0,1% de Triton X-100 (v/v), 7% de sacarose e 50% (p/p) de PVPP. A quantidade do reagente deve ser 50% da massa de tecido vegetal utilizado, ou seja, utilizando-se 0,500 g de tecido vegetal, deve-se utilizar 0,250 g de PVPP. Como esse reagente é insolúvel, o mesmo deve ser colocado diretamente no almofariz no momento da maceração.

Na extração, 0,500 g do tecido foliar previamente coletado e congelado, deverá ser homogeneizado com 1,50 mL do meio de extração descrito anteriormente, em uma temperatura de 4 °C, utilizando para isso um pistilo e almofariz congelados também a 4 °C sobre um isopor com gelo. Após a obtenção do extrato homogeneizado, todo o conteúdo deve ser transferido para um microtubo de 2,00 mL e colocado em contato com gelo dentro de um recipiente de isopor, a fim de manter a baixa temperatura do material. Posteriormente, os microtubos deverão ser colocados em uma microcentrífuga refrigerada,

ajustada para a velocidade de 15.000 g durante 15 minutos, à temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante (extrato vegetal) de cada microtubo deverá ser coletado e dividido em alíquotas (0,20 mL) em diversos microtubos para posterior determinação da atividade das enzimas em espectrofotômetro e em gel de atividade. Os microtubos contendo as alíquotas do extrato vegetal poderão ser armazenados em freezer -80 °C por até 6 meses ou em freezer -20 °C por até 2 meses, sem que a atividade das enzimas seja reduzida.

## Referências

ASADA, K. The water: water cycle in chloroplasts scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

FONTES, E. P. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, [Philadelphia], v. 167, p. 1.307-1.314, 2004.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; PERES, L. E. P. AZEVEDO, R. A. The isolation of antioxidant enzymes from mature tomato (cv. Micro-Tom) plants. **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 1.608-1.610, 2008.

Para a quantificação da atividade das enzimas, os microtubos contendo a alíquota de extrato vegetal deverão ser retirados do freezer (-80 °C ou -20 °C) e acondicionados em uma caixa de isopor com gelo para que descongelem de forma lenta, afim de não alterar a atividade das enzimas, as quais devem ser quantificadas conforme Pinheiro et al. (2004) e Gratão et al. (2008).

NOGUÉS, S.; BAKER, N. R. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1.309- 1.317, 2000.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; POMPELLI, M. F.; MARTINS, S. C. V.; ANTUNES, W. C.; CHAVES, A. R. M.; DAMATTA, F. M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal of Plant Physiology**, [Philadelphia], v. 167, p. 1.052-1.060, 2010.

ROLÃO, M. B. **Respostas antioxidativas de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostas ao metal pesado cadmio**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2009. 820 p.

### Comunicado Técnico, 155

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Semiárido**  
**Endereço:** BR 428, km 152, Zona Rural, Cx. Postal 23, 56302-970 Petrolina, PE  
**Fone:** (87) 3866-3600  
**Fax:** (87) 3866-3815  
**E-mail:** cpatsa.sac@embrapa.br

1ª edição (2013): Formato digital

Ministério da Agricultura,  
 Pecuária e Abastecimento



### Comitê de publicações

**Presidente:** Maria Auxiliadora Coêlho de Lima.  
**Secretário-Executivo:** Sidinei Anunciação Silva.  
**Membros:** Aline Telles Biasoto Marques, Ana Cecília Poloni Rybka, Ana Valéria Vieira de Souza, Anderson Ramos de Oliveira, Fernanda Muniz Bez Birolo, Flávio de França Souza, Gislene Feitosa Brito Gama, José Mauro da Cunha e Castro, Juliana Martins Ribeiro, Mizaél Félix da Silva Neto, Welson Lima Simões.

### Expediente

**Supervisão editorial:** Sidinei Anunciação Silva.  
**Revisão de texto:** Sidinei Anunciação Silva.  
**Tratamento das ilustrações:** Bruno Willian Araújo.  
**Editoração eletrônica:** Bruno Willian Araújo.