

**ÁREA TEMÁTICA:** (marque uma das opções)

- COMUNICAÇÃO
- CULTURA
- DIREITOS HUMANOS E JUSTIÇA
- EDUCAÇÃO
- MEIO AMBIENTE
- SAÚDE
- TRABALHO
- TECNOLOGIA

## **ADAPTAÇÃO DE UMA METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUCCINATO DESIDROGENASE DE ORIGEM VEGETAL: UMA AULA PRÁTICA DE BIOQUÍMICA**

**Naiara De Oliveira Pazian (naiarapazian@hotmail.com)**

**Fernanda Teleginski (ferteleginski@hotmail.com)**

RESUMO – A realização de aulas práticas é fundamental para facilitar o entendimento de disciplinas complexas, como a Bioquímica. As aulas práticas aplicam temas abordados em salas de aula, oferecendo outra forma de aprendizagem dos conteúdos. Ao avaliar a abordagem desta disciplina, percebeu-se que assuntos com alta complexidade eram pouco desenvolvidos em aulas práticas. Entre eles, o ciclo do ácido cítrico, uma via metabólica da degradação oxidativa de carboidratos, lipídeos e aminoácidos, ocorrendo na matriz mitocondrial. Os protocolos disponíveis envolvem o uso de mitocôndrias de fonte animal, o que requer biotérios e sacrifício do mesmo. Visando estabelecer roteiros para aplicação em aulas práticas de Bioquímica, métodos de extração de fração mitocondrial por fontes vegetais e de caracterização da atividade de enzimas foram selecionados e adaptados. A via selecionada foi a catalisada pela enzima succinato desidrogenase. Esse protocolo foi adaptado utilizando batata, couve-flor e brócolis como fontes de fração mitocondrial, onde se utilizava isolados de ratos. A metodologia foi eficiente para o couve flor e brócolis, detectando a atividade da enzima succinato desidrogenase. Desta forma, foi possível desenvolver um procedimento adequado para aplicação em aulas práticas. Espera-se que esse roteiro favoreça o aprendizado pelos alunos de graduação em conceitos considerados mais complexos.

**PALAVRAS-CHAVE** – Bioquímica. Aula prática. Succinato desidrogenase.

## Introdução

A realização de aulas práticas no ensino de uma disciplina é uma importante estratégia de ensino, já que auxiliam o aluno no processo de aprendizagem dos conteúdos já trabalhados em aulas teóricas.

A Bioquímica é considerada uma disciplina de nível complexo e de difícil assimilação (PINHEIRO, et al., 2009). Os professores reconhecem a dificuldade que os alunos apresentam, devido ao vasto e complexo conteúdo (YOKAICHIYA, et al., 2004).

Nas décadas de 50 e 60, percebeu-se a necessidade de modificar o sistema ensino-aprendizagem das ciências nos seus diversos campos, tendo o tema sido primeiramente discutido em 1979, na Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica – SBBq. Porém, foi somente na década de 90, que houve um consenso da necessidade de se buscar alternativas metodológicas a partir da sistemática aplicação de pesquisas, para que se qualificassem, tornasse acessível e/ou prazeroso o ensino de bioquímica. Além disso, foi incentivada a promoção de alternativas tecnológicas que possibilitassem o aprimoramento do trabalho de ensino-aprendizagem (LOGUERCIO, 2007)”.

Um dos assuntos mais relevantes e complexos trabalhados na disciplina é o ciclo do ácido cítrico (TCA), que ocorre na matriz mitocondrial. O TCA é uma via metabólica central do processo de degradação oxidativa de carboidratos, lipídeos e aminoácidos para obtenção de energia (LEHNINGER, 2011). A oitava etapa deste ciclo é uma reação que envolve a oxidação do succinato a fumarato, catalisada pela succinato desidrogenase (SDH), localizada na membrana mitocondrial interna, e que compõe a cadeia transportadora de elétrons. Essa reação de oxidação envolve a transferência dos elétrons do succinato para seu cofator e deste para os componentes da cadeia transportadora de elétrons, até o seu aceptor final, o O<sub>2</sub>. As metodologias existentes para aplicação de estudos desta via em aulas práticas envolvem o uso de homogenato de fígado de rato para isolamento da fração mitocondrial, fato este que exige a manutenção destes animais em biotério, o que acarreta em um elevado custo, além do sacrifício dos mesmos, necessitando de aprovação de seu uso pelos comitês de ética em pesquisa com animais. A fim de se estabelecer um roteiro de aula prática para avaliar a atividade da SDH e o estudo do TCA sem o uso de material de origem animal, neste trabalho foi estabelecida uma metodologia de extração de mitocôndrias a partir de fontes vegetais para sua aplicação em laboratórios de graduação.

## Objetivos

- Selecionar métodos de extração de fração mitocondrial a partir de fontes vegetais;
- Otimizar os protocolos existentes na literatura para extração de mitocôndrias vegetais.
- Detectar a atividade da succinato desidrogenase de origem vegetal;
- Desenvolver um protocolo adequado para ensaio da atividade da SDH para execução em aula prática.

## Referencial teórico-metodológico

Primeiramente foi realizado um levantamento bibliográfico, onde se procurou métodos para demonstrar a atividade da succinato desidrogenase. Porém, foram encontrados na literatura disponível apenas técnicas que utilizavam fígado de rato como fonte de mitocôndrias. Para evitar o uso do material de uso animal, buscaram-se técnicas que utilizassem mitocôndrias obtidas a partir de fontes vegetais e que fossem possíveis de serem executadas no laboratório de aula prática da disciplina de bioquímica do Departamento de Química da UEPG.

A técnica selecionada para extração das mitocôndrias foi a descrita por Maria do Carmo Barreto, que inclui a extração da fração mitocondrial a partir de couve-flor (GRAHAN, J.M. & RICKWOOD, D. 1997). Para ensaios da atividade da enzima SDH foi utilizada metodologia semelhante à descrita pelo livro Bioquímica: aulas práticas da UFPR (2001), porém substituindo o extrato do fígado de rato pelo extrato obtido dos vegetais.

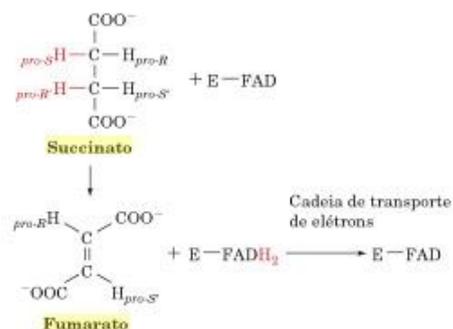
O isolamento das mitocôndrias se deu a partir de couve-flor (A), batatas (B) e brócolis (C) e a extração foi feita utilizando de 20g do tecido vegetal externo macerado em meio de extração (tampão Tris-HCl 10mmol.L<sup>-1</sup> em pH 7,4; sacarose 0,25mol.L<sup>-1</sup>; cisteína 4mmol.L<sup>-1</sup>; BSA 0,1%), em banho de gelo, seguido por filtração e centrifugação do extrato bruto a 1000xg, durante 5 minutos, a 4°C). A fração sobrenadante obtida foi recentrifugada a 10000xg, durante 30 minutos, a 4°C e o precipitado de mitocôndrias foi ressuscitado em tampão Tris-HCl 10mmol.L<sup>-1</sup> em pH 7,4, contendo sacarose 0,25mol.L<sup>-1</sup>, KCl 10mmol.L<sup>-1</sup> e MgCl<sub>2</sub> 5mmol.L<sup>-1</sup>. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados com a suspensão com 0,2mL de suspensão de mitocôndrias isoladas em sistema tampão fosfato 0,02mmol.L<sup>-1</sup> em pH 7,3, utilizando-se como substrato o succinato de sódio (25µmol.L<sup>-1</sup>) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 0,08% como acceptor de elétrons, em um volume final de 2mL. Também foi realizado o teste para inibição da atividade enzimática por tratamento térmico, a 100 °C,

durante 5 minutos. Os sistemas foram mantidos em banho termostatizado a 37°C, durante 30 minutos e então foram analisadas as características colorimétricas das amostras.

## Resultados

A succinato desidrogenase é a enzima mitocondrial, envolvida na 8ª etapa do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, que catalisa a oxidação do succinato (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-HCOO<sup>-</sup>) a fumarato (⁻OOC-CH=C-HCOO<sup>-</sup>). A SDH é uma flavoproteína, contendo como coenzima o FAD, e ferro e enxofre como cofatores de sua estrutura. Sua atividade é inibida competitivamente pelo malonato (HOOC-CH<sub>2</sub>-COOH) e agentes desnaturantes, como o calor. Na sua catálise, dois elétrons e dois prótons são removidos pela oxidação do succinato e transferidos ao FAD, reduzindo-o a FADH<sub>2</sub>, o qual transfere seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, à ubiquinona, que segue as etapas de oxido-redução até a redução do oxigênio molecular a água (LEHNINGER, 2011).

**Figura 1- Oxidação do succinato a fumarato catalisada pela enzima succinato desidrogenase.**



(DONALD VOET/ JUDITH G. VOET, 4º EDIÇÃO)

No sistema *in vitro*, a atividade da enzima succinato desidrogenase pode ser demonstrada pela oxidação do succinato a fumarato, seguida da transferência dos elétrons para o aceptor final de elétrons 2,3,5-trifeniltetrazólio, o qual apresenta coloração amarela na forma oxidada e vermelho na sua forma reduzida (trifenil-formazana).

Após isolamento da fração mitocondrial utilizando a metodologia selecionada foi possível avaliarmos a atividade da SDH isolada de 3 fontes vegetais. A figura 2 apresenta os resultados obtidos a partir da atividade da SDH extraída de couve-flor (A), batata (B) e brócolis(C). Quando o sistema reacional foi incubado na ausência da fração mitocondrial

(coluna 1 A, B e C) ou na ausência de substrato, succinato (coluna 2 A, B e C), não houve desenvolvimento de coloração, conforme esperado. Entretanto, quando o extrato mitocondrial foi adicionado ao sistema reacional na presença de succinato (coluna 4 A, B e C), ocorreu a formação de coloração vermelha nos isolados de couve flor e brócolis, devido à oxidação do succinato e redução do trifeniltetrazólio, indicando que a enzima isolada encontrava-se ativa. Quando o sistema foi incubado utilizando a fração mitocondrial submetida à tratamento térmico, não foi observado o desenvolvimento de coloração avermelhada, devido à desnaturação da enzima e sua inativação permanente (coluna 3 B e C).

**Figura 2: Ensaio da atividade da enzima succinato desidrogenase isolada em couve-flor (A), batata (B) e brócolis (C).**

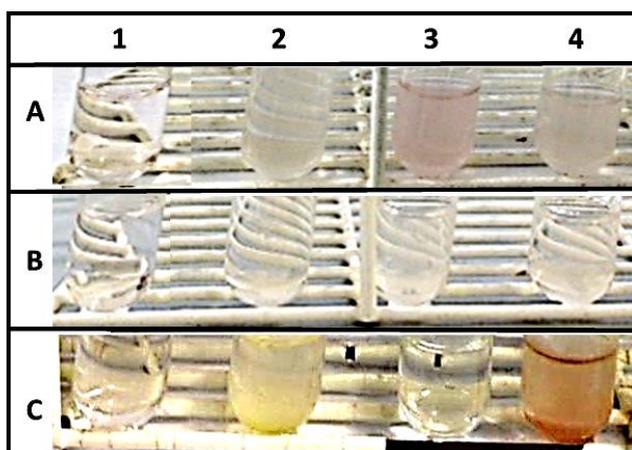


Figura 1: Ensaio de atividade da enzima SDH isolada a partir de couve-flor (A), batata (B) e brócolis (C). 1- ausência de extrato mitocondrial; 2- ausência de succinato; 3- succinato na presença de solução mitocondrial submetida a tratamento térmico (100°C, 5 minutos); 4-succinato na presença de extrato mitocondrial contendo succinato.

Os resultados indicam que a metodologia empregada para isolamento da enzima SDH foi adequado quando o brócolis e a couve-flor foram utilizados como fontes. Não foi observado o desenvolvimento de coloração avermelhada nas reações empregando mitocôndrias isoladas de batata, indicando que ou a metodologia é ineficaz para o seu isolamento a partir desse vegetal, ou a enzima isolada encontrava-se inativa.

### Considerações Finais

Neste trabalho realizou-se a primeira parte do processo da elaboração do roteiro de uma aula prática na disciplina de bioquímica. O roteiro selecionado para extração da mitocôndria, e determinação da atividade da succinato desidrogenase extraída de fonte vegetal

foi adequado. A melhor fonte para a extração da fração mitocondrial foi o brócolis. Assim, os conceitos de atividade enzimática, agentes desnaturantes, conformação proteica, reações de óxido-redução e contextualização do TCA poderão ser abordados em aulas práticas, favorecendo o aprendizado dos alunos, sem que haja necessidade abateimento animal, que envolve custos extras de manutenção e questões de ética.

**APOIO:** Fundação Araucária e técnico Ozires Dutra.

### Referências

LOGUERCIO, Rochele, SOUZA, Diogo, PINO, José Cláudio Del. **Educação em Bioquímica: um programa disciplinas.** 2004. Disponível em: <http://www.iq.ufrgs.br/aeq/producao/delpino/ABRAPEC.pdf>, em 26 de março de 2014.

PINHEIRO, T. M. L.; et al. **Ensino de Bioquímica para acadêmicos de Fisioterapia: Visão e avaliação do discente.** Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia molecular, n.01/09, p. C1-C11, 2009.

YOKAICHIYA, D. K. et al. **O que alunos de diferentes cursos procuram em disciplinas extracurriculares de bioquímica?** Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia molecular, n.01/04, p. E1-E8, 2004.

LOGUERCIO, Rochele, SOUZA, Diogo, PINO, José Cláudio Del. **Mapeando a educação de bioquímica no Brasil.** Ciências & Cognição 2007; Vol 10: 147-155. 2007.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. **Bioquímica-Aulas Práticas**, 6ª Edição, Curitiba, Editora UFPR, 2001, 177p.

Wilson, K. & Walker, J. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry.** Cambridge University Press (UA), 1994.

<http://www2.ufp.pt/~pedros/bq/bq12.gif>, visitado em 29 de março de 2014.