

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Padronização e otimização da técnica de detecção de atividade de catalase
para amostras biológicas**

Samantha Kettler Costa Xavier
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

SAMANTHA KETTLER COSTA XAVIER

**Padronização e otimização da técnica de detecção de atividade de catalase
para amostras biológicas**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Leandro L. de Oliveira

Coorientadores: Ana L. Fonseca Destro
Ana L. Fonseca Destro
Daniel S. Sena Bastos

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

X3p
2026

Xavier, Samantha Kettler Costa, 2001-
Padronização e otimização do ensaio de catalase para
amostras biológicas / Samantha Kettler Costa Xavier. – Viçosa,
MG, 2026.

1 dissertação eletrônica (70 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2026.

Referências bibliográficas: f. 63-70.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.195>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Catalase. 2. Enzimas. 3. Estresse oxidativo. I. Oliveira,
Leandro Licursi de, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 572.791

SAMANTHA KETTLER COSTA XAVIER

**Padronização e otimização da técnica de detecção de atividade de catalase
para amostras biológicas**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 6 de março de 2026.

Assentimento:

Samantha Kettler Costa Xavier
Autora

Leandro Licursi de Oliveira
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 14/05/2026 às 13:15:26 e pelo orientador em 14/05/2026 às 17:09:24. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **TNRX.G9OP.X6Y5** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela paz, ternura incomparável e serenidade que me sustentaram em todos os momentos desta caminhada.

Ao meu orientador, Leandro Licursi de Oliveira, por sua orientação atenta, paciência, confiança e por todo o conhecimento compartilhado. Sua dedicação e comprometimento foram essenciais para a realização deste trabalho e para meu amadurecimento científico. Também agradeço pela amizade e companheirismo durante essa caminhada de crescimento pessoal.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, pelas contribuições acadêmicas e parcerias produtivas.

À minha família, especialmente aos meus pais, Maria Aparecida e José Luiz, pelo amor incondicional, pelo exemplo de perseverança e por acreditarem em mim em todos os momentos. Sem o apoio de vocês, esta conquista não seria possível.

Aos amigos, Tharcilla, Deivid, Thaís, Caio, Marisa, Larissa, Gabriel e também ao meu esposo Matheus por serem minha fortaleza em toda minha história na UFV, pelo apoio emocional durante os momentos de incerteza e pelas boas risadas que tornaram o caminho mais leve.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

XAVIER, Samantha Kettler Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2026.

Padronização e otimização da técnica de detecção de atividade de catalase para amostras biológicas

. Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientadores: Ana Luiza Fonseca Destro, Ana Luiza Fonseca Destro e Daniel Silva Sena Bastos.

O estresse oxidativo pode ser compreendido como um desequilíbrio redox em que a produção de espécies reativas de oxigênio supera a capacidade neutralizadora dos sistemas antioxidantes endógenos, comprometendo a homeostasia celular. Entre os principais mecanismos de defesa antioxidante, destaca-se a enzima catalase, cuja atuação clássica na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio constitui um dos pilares da proteção contra danos oxidativos.

Considerando a relevância histórica e metodológica da mensuração dessa atividade enzimática em estudos bioquímicos e biomédicos, o presente estudo teve como objetivo desenvolver o ensaio de catalase por meio de sua padronização para amostras de tecido, assegurando maior reprodutibilidade e confiabilidade analítica. Ademais, propõe-se a utilização de um novo tipo de amostra, baseado em sangue total, com o objetivo de ampliar a aplicabilidade do método e preservar a robustez técnica que tradicionalmente fundamenta as análises enzimáticas em pesquisas experimentais.

Para tal, foram realizados experimentos quanto estabilidade do substrato enzimático e da solução de complexação. Otimizamos a frequência analítica da leitura espectrofotométrica transferindo a reação método de alto rendimento (High-Throughput Screening - HST). Além disso, foram coletados cérebro, fígado, coração, rim e sangue de camundongos Balb/C saudáveis, a fim de obter parâmetros de normalidade de U.mg^{-1} em cada tipo de amostra. Obteve-se a linearidade da atividade enzimática e estabeleceu-se os limites mínimo e máximo de U.mg^{-1} confiáveis para comparação de diferentes indivíduos. Além disso, observou-se grande variação nos valores de amostras de soro hemolisado se comparadas com soro não hemolisado, propomos a utilização de amostras de sangue total como um novo tipo de amostra externo a este erro instrumental. O novo método apresentou coeficiente de correlação, $R^2 = 0,997$ e coeficiente de variação (CV) igual a 2,43%. Os tecidos apresentaram diferentes níveis de atividade de catalase, cujas faixas de linearidade estão entre 1373 - 2200 U.mg^{-1} para fígado, 105,48 - 160,05 U.mg^{-1} para rim, 90,30 - 96,34 U.mg^{-1} para coração, em torno de 7,93 U.mg^{-1} para cérebro, 30 U.mL^{-1} para soro e entre 300-500 U.mL^{-1} para amostras de sangue total. Portanto,

a

padronização e otimização garantiu resultados mais precisos, sensíveis e uma análise mais rápida e de baixo custo conferindo maior confiabilidade nos dados relativos às comparações entre diferentes indivíduos.

Palavras-chave: atividade enzimática; catalase; padronização; estresse oxidativo

ABSTRACT

XAVIER, Samantha Kettler Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2026. **Standardization and optimization of the catalase activity assay for biological samples.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira. Co-advisers: Ana Luiza Fonseca Destro, Ana Luiza Fonseca Destro and Daniel Silva Sena Bastos.

Oxidative stress can be understood as a redox imbalance in which the production of reactive oxygen species exceeds the neutralizing capacity of endogenous antioxidant systems, thereby compromising cellular homeostasis. Among the principal antioxidant defense mechanisms, the enzyme catalase stands out, whose classical role in the decomposition of hydrogen peroxide into water and oxygen constitutes one of the pillars of protection against oxidative damage.

Considering the historical and methodological relevance of measuring this enzymatic activity in biochemical and biomedical studies, the present study aimed to develop a catalase assay through its standardization for tissue samples, ensuring greater reproducibility and analytical reliability. In addition, the use of a new type of sample, based on whole blood, is proposed in order to expand the applicability of the method while preserving the technical robustness that traditionally underlies enzymatic analyses in experimental research.

For this purpose, experiments were conducted to evaluate the stability of the enzymatic substrate and of the complexation solution. We optimized the analytical reading frequency of the spectrophotometric measurement by transferring the reaction to a high-throughput screening (High-Throughput Screening – HST) method. In addition, brain, liver, heart, kidney, and blood samples were collected from healthy Balb/C mice in order to obtain normality parameters expressed as $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ for each type of sample. The linearity of enzymatic activity was obtained, and the minimum and maximum reliable limits of $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ were established for comparisons among different individuals. Furthermore, a large variation was observed in the values obtained from hemolyzed plasma samples when compared with non-hemolyzed serum; therefore, we propose the use of whole blood samples as a new sample type external to this instrumental error. The new method presented a correlation coefficient of $R^2 = 0.997$ and a coefficient of variation (CV) equal to 2.43%. The tissues exhibited different levels of catalase activity, whose linearity ranges were between 1373–2200 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ for liver, 105.48–160.05 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ for kidney, 90.30–96.34 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ for heart, approximately 7.93 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ for brain, 30 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ for serum, and between 300–500 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ for whole blood samples. Therefore, the standardization and optimization ensured more precise and sensitive

results, as well as faster and lower-cost analysis, providing greater reliability in the data related to comparisons among different individuals.

Keywords: enzymatic activity; catalase; standardization; oxidative stress

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Estresse oxidativo	11
2.1.1 Fontes endógenas de espécies reativas	11
2.1.2 Fontes exógenas de espécies reativas	13
2.1.3 Mecanismos de defesa	15
2.2 Catalase	17
2.3 Atividade de catalase em diferentes órgãos	23
2.3.1 Fígado	23
2.3.2 Rins	24
2.3.3 Coração	25
2.3.4 Cérebro	27
2.4 Atividade de catalase no sangue e soro	29
2.5 Protocolos para ensaio de catalase	32
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivos específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Considerações éticas e obtenção das amostras	41
4.2 Preparo de amostras	41
4.2.1 Tecidos	41
4.2.2 Sangue total	41
4.2.3 Plasma	42
4.3 Ensaio de catalase	42
4.3.1 Padronização e estabilidade dos reagentes	42
4.3.2 Metodologia do ensaio de catalase	43
4.3.3 Precisão, repetibilidade e reprodutibilidade	44
4.4 Dosagem de proteínas totais	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Padronização do ensaio de atividade enzimática	46
5.1.1 Estabilidade dos reagentes	46
5.2 Atividade de Catalase	47
5.2.1 Atividade de catalase em tecidos	48
5.2.2 Atividade de Catalase em sangue total, soro não hemolisado e soro hemolisado	54
5.3 Precisão, repetibilidade e reprodutibilidade	58

6.CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1.INTRODUÇÃO

O metabolismo celular é extremamente rico, promovendo uma rede de reações bioquímicas que transformam moléculas em energia e componentes celulares. Não surpreendentemente, as reações metabólicas são rigorosamente reguladas para garantir o atendimento das necessidades específicas de células, tecidos e órgãos. As reações redox estão intrinsecamente ligadas ao metabolismo energético. Portanto, os processos redox são indispensáveis para a fisiologia do organismo e para a própria vida. Entretanto, um conjunto distinto de derivados moleculares de oxigênio são produzidos durante o metabolismo aeróbico normal, denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs).

O termo “Estresse oxidativo” está associado à uma variedade de efeitos danosos que as EROS causam nas macromoléculas celulares (Sies; Berndt; Jones, 2025). Uma forte pressão seletiva induziu a evolução de mecanismos de remoção ou neutralização das EROS, incluindo a produção de catalases para conversão da espécie citotóxica, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em oxigênio molecular e água (Harris; Marles-Wright, 2024). Quando a produção de EROS excede a capacidade antioxidante, levando a dano lipídico, proteico e ao DNA, estes fenômenos típicos do estresse oxidativo são associados ao envelhecimento e diversas doenças (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Devido seu papel crítico na defesa contra o dano oxidativo, a catalase é amplamente distribuída entre todos os organismos que possuem metabolismo aeróbico (Oyeyemi; Caden, 2025). Assim, a expressão da enzima catalase é crucial para evitar injúrias celulares e preservação da integridade celular (Anwar et al., 2024). Cada órgão possui diferentes níveis de atividade metabólica e de exposição ao estresse, sendo assim, os níveis da catalase variam consideravelmente dependendo do tecido e atividade metabólica (Oyeyemi; Caden, 2025). Várias condições de saúde, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares, anemia, doenças neurodegenerativas, entre outras, têm sido associadas ao mal funcionamento da enzima catalase (Anwar et al., 2024). Sendo assim, a quantificação da atividade da catalase abre um novo campo de diagnósticos úteis em diversas desordens de saúde (Rasheed, 2024).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é resultado do acúmulo excessivo de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Reddy, 2023).

As EROS e ERN são definidas como espécies de oxigênio ou nitrogênio com radicais livres, ou seja, um ou mais elétrons desemparelhados. Dentre as ERN destacam-se o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$), peroxinitrito (ONOO^-) entre outros. Já entre as EROS destacam-se espécies como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), radicais peroxila e hidroperoxila ($\bullet\text{RO}_2$ e $\bullet\text{HO}_2$) (Dong et al., 2022). Estes radicais, por sua vez podem ser facilmente convertidos em não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), singleto de oxigênio e ácido hipocloroso ($^1\text{O}_2$ e HOCl) (Dong et al., 2022).

A geração de espécies reativas em sistemas biológicos pode ter origem endógena, proveniente de processos metabólicos celulares, ou exógena, decorrente da exposição a fatores ambientais (Aranda-Rivera et al., 2022). Entre as principais fontes exógenas estão a radiação ultravioleta (UV), metais pesados, poluentes atmosféricos e a fumaça do cigarro. Já entre as fontes endógenas, destacam-se as mitocôndrias, os peroxissomos, o retículo endoplasmático e a ação de enzimas como as NADPH oxidases e superóxido dismutases, que participam ativamente na produção intracelular de espécies reativas.

2.1.1 Fontes endógenas de espécies reativas

As EROS são formadas durante o metabolismo respiratório, no qual as mitocôndrias são as maiores contribuintes (Napolitano; Fasciolo; Venditti, 2021). A mitocôndria é uma organela celular com dupla membrana presente nas células eucarióticas da maior parte dos organismos (Napolitano; Fasciolo; Venditti, 2021). Essas organelas exercem várias funções como a regulação da concentração de cálcio intracelular, controle da oxidação de ácidos graxos, síntese de ureia, sendo a principal,

a síntese de ATP através da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa (Napolitano; Fasciolo; Venditti, 2021).

Os carreadores de elétrons produzidos a partir da glicólise, beta oxidação, ciclo do ácido cítrico, entre outras vias, são oxidados na cadeia transportadora de elétrons principalmente pelos complexos I e II (Rich; Maréchal, 2010). Os complexos I e II por sua vez, transferem os elétrons para ubiquinona, uma molécula pequena e lipossolúvel que pode ser facilmente reduzida e oxidada. A ubiquinona reduzida pelos complexos I e II, se transforma em ubiquinol e é oxidada pelo complexo III. O complexo III reduz então outra molécula lipossolúvel, o citocromo c, que por sua vez reduz o complexo V, onde o oxigênio, acceptor final de elétrons, é reduzido à água. Por fim, o bombeamento de prótons para o espaço intermembranar, realizados pelos complexos I, III e IV, acarreta uma concentração de prótons no espaço intermembranar que produz um potencial eletroquímico capaz de converter essa energia na produção de ATP pela ATP sintase (Rich; Maréchal, 2010).

Os principais locais de produção de EROS na cadeia transportadora de elétrons são os complexos I e III, a maior parte das EROS são produzidas na matriz mitocondrial e as contribuições de cada complexo neste processo depende de uma série de fatores, como, os tipos de substratos que estão sendo oxidados, as demandas energéticas da célula, o potencial transmembrana, a concentração de ubiquinol e o tipo de célula (Mazat; Devin; Ransac, 2020).

Outras organelas como os peroxissomos, realizam a beta-oxidação de ácidos graxos com produção de H_2O_2 , através da atividade de oxidases, por conta disso, os peroxissomos possuem altos níveis de catalase e peroxirredoxina 5 (Aranda-Rivera et al., 2022). Na literatura, foi reportado que as EROS produzidas pelos peroxissomos podem mediar autofagia e o processo tanto de degradação quanto de reciclagem de componentes celulares (Zhang et al., 2013).

Outra fonte considerável de EROS é o retículo endoplasmático (RE), que forma principalmente H_2O_2 no dobramento de proteínas por conta do mecanismo de ação das dissulfeto isomerases (Bravo et al., 2011). Outras três famílias de enzimas endógenas produtoras de EROS e ERN, são as xantina-oxidases (XOs), as mieloperoxidases (MPOs) e as óxido nítrico sintases endoteliais (eNOS) (Aranda-Rivera et al., 2022). As XOs são enzimas citosólicas envolvidas no catabolismo de

purinas, tem a função de oxidar as bases hipoxantina e xantina à ácido úrico, e nessas reações há produção de H_2O_2 (Huber et al., 1996). As MPOs são peroxidases, principalmente expressas em neutrófilos e monócitos e possui atividade contra patógenos por produzir HOCl e intermediários (Ndrepepa, 2019). O papel protetor contra patógenos das MPOs é essencial na mediação de locais de dano tecidual e inflamação em doenças inflamatórias, por isso são fortemente requisitas pelo sistema imune (Ndrepepa, 2019). Por fim, as óxido nítrico sintases endoteliais (eNOS) são as mais críticas produtoras de radical $\bullet NO$, através da hidroxilação de L-arginina, este radical é importante sinalizador do endotélio vascular (Lowry et al., 2013).

2.1.2 Fontes exógenas de espécies reativas

Além das fontes endógenas de EROS supracitadas, as espécies reativas de oxigênio também podem ser geradas pela exposição à fatores externos como: radiação ultravioleta, microrganismos, poluentes, ultraprocessados, drogas, álcool e tabaco (Aranda-Rivera et al., 2022).

Primeiramente, entre as fontes de radiação pode-se citar um componente comum do dia a dia, a luz ultra violeta (UV). A luz UV está dentro do espectro de emissão da luz solar, e a sua exposição é importante para produção de vitamina D, porém em demasia pode causar danos à pele e inícios de processos carcinogênicos (Heck et al., 2003; Bernard; Gallo; Krutmann, 2019). A exposição à radiação UV solar ou artificial induz a produção de radical superóxido ($\bullet O_2^-$), singleto de oxigênio (1O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e são capazes de desencadear maior síntese de EROS através de mecanismos como, dano estrutural à catalase, indução de síntese exagerada de NOS, e hipo-expressão da proteína kinase C (PKC) (Heck et al., 2003).

Existe uma forte correlação na literatura, entre dietas ricas em carboidratos, gorduras saturadas e produtos de glicação avançada (AGEs) e efeitos danosos resultantes do processo de estresse oxidativo como o aumento de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (Cai et al., 2002). A alta disponibilidade de glicose e D-galactose podem desacoplar a cadeia transportadora de elétrons e gerar ânion superóxido ($\bullet O_2^-$). Uma dieta rica em gorduras, por sua vez necessita de altos níveis

de beta oxidação que como dito anteriormente tem como subprodutos, espécies reativas de oxigênio, além da produção de LDL oxidada (ox-LDL) também preocupante do ponto de vista cardiovascular (Yi et al., 2022).

Além da dieta rica em ultraprocessados ser maléfica, uma série de aditivos alimentares induzem condições de estresse oxidativo. Aditivos com frações de nanopartículas como dióxido de titânio, óxidos e hidróxidos de ferro, prata, ouro e sílica, podem ser acumulados e induzir gastro e hepatotoxicidade, disbiose intestinal, e impactos no eixo intestino-fígado-cérebro (Medina-Reyes et al., 2020). O primeiro sítio de contato das nanopartículas é o muco das células enteroendócrinas e microbiota intestinal. As nanopartículas causam estresse oxidativo local e desbalanço entre espécies bacterianas causando a alteração de peptídeos intestinais e distúrbios na neurotransmissão do eixo intestino-cérebro (Medina-Reyes et al., 2020). Durante a absorção, essas partículas podem interagir com componentes do sangue como proteínas, lipídios e carboidratos e formar uma “coroa proteica”. Através da corrente sanguínea, esses aditivos e coroas proteicas afetando vários tecidos e órgãos sendo o fígado o mais afetado, seguido de baço e rim. Além disso, as nanopartículas podem atravessar as barreiras hemato-testicular e hemato-encefálica podendo depositar-se nesses órgãos (Medina-Reyes et al., 2020). As nanopartículas possuem uma vasta gama de mecanismos de geração de estresse oxidativo dentre elas, a alimentação de reações de Fenton e Harber-Weiss, desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons nos complexos I e III e a ativação das NOX em membranas celulares, por conta da disbiose a liberação de LPS bacteriano. Todos estes mecanismos em conjunto induzem direta ou indiretamente EROS e estresse oxidativo (Medina-Reyes et al., 2020).

A exposição à poluentes como metais pesados (chumbo, mercúrio, cádmio, arsênio), poluentes atmosféricos (material particulado e ozônio) e pesticidas (organofosforados) mostraram-se também relevantes na indução de estresse oxidativo em órgãos como cérebro, pulmão e fígado (Yang; Omaye, 2009). O material particulado fino presente em ar poluído pode penetrar profundamente nos pulmões, alcançar a circulação e induzir a produção de EROS por meio de distúrbio mitocondrial e fagócitos. De maneira semelhante, metais pesados e de transição presentes em aerossóis alimentam reações de Fenton, produzindo principalmente ($\bullet\text{OH}$), alguns inibem enzimas antioxidantes e desencadeiam peroxidação lipídica que afeta

principalmente órgãos com alta taxa metabólica ou com alta concentração de lipídios suscetíveis, como fígado e cérebro (Ahmad, 1995). O contato com poluentes como dioxinas, bifenilas policloradas (PCBs) pelo ar, paraquat, DDT, endrin, entre outros, pesticidas organoclorados em resíduos presentes em alimentos e água contaminada, também são capazes de induzir estresse oxidativo (Ahmad, 1995; Leni; Künzi; Geiser, 2020). As dioxinas e PCBs ligam-se à receptores que induzem metabolismo de CYP450 com produção elevada de EROS, estes pesticidas entram em ciclos redutores com NADPH gerando ânions superóxido continuamente (Yang; Omaye, 2009).

Além disso, drogas de recreação como álcool e tabaco são poderosas fontes exógenas de estresse oxidativo (Ignatowicz et al., 2013). Os órgãos mais afetados pela sua exposição são fígado e pulmão, não obstante, os efeitos são sistêmicos, podendo afetar outros órgãos como coração, cérebro e rins (Ignatowicz et al., 2013). O álcool possui ao menos cinco maneiras de induzir o estresse oxidativo, entre elas a diminuição do potencial redutor dos hepatócitos, ativação da CYP2E1 (família das CYP450) e NADPH oxidase, ambas produtoras de EROS, produção de acetaldeído, e redução do conteúdo de antioxidantes, como glutatona e vitaminas (Coulbault et al., 2025.). Enquanto o tabaco, possui em sua fase gasosa milhares de radicais livres instáveis, EROS e ERN. Na fase particulada, radicais como semiquinonas e quinonas que entram em ciclo redutor com oxigênio, gerando EROS continuamente. Os metais pesados presentes na fumaça (Fe, Cu, Cd e Ni), catalisam reações de Fenton e causam ativação de macrófagos, neutrófilos que liberam número ainda maior de EROS e ERN causando depleção de antioxidantes, pela sua exposição crônica (Emma et al., 2022).

Tendo em vista, todos os fatores exógenos e causadores de estresse oxidativo e desequilíbrios endógenos aos quais o organismo é exposto, o mesmo demanda de uma série de linhas de defesa contra o estresse oxidativo (Jomova et al., 2024). Estas linhas de defesa podem ser divididas em prevenção da formação de EROS, neutralização das EROS existentes, reparo dos danos oxidativos formados e ativação de genes e respostas celulares protetoras (Jomova et al., 2024)

2.1.3 Mecanismos de defesa

A primeira maneira de defender-se contra o estresse oxidativo, é prevenindo a formação de radicais. Os principais defensores são moléculas com poder antioxidante, como proteínas de ligação à metais (ferritinas, transferrinas, ceruloplasminas) que sequestram metais e evitam a catálise de reações de Fenton. Outros exemplos são, ácido úrico, ubiquinona, glutathione (GSH) e vitaminas E, C, A e D, moléculas redutoras, ou seja, capazes de doar elétrons e/ou que possuem papel de indutoras de enzimas antioxidantes como a melatonina, por exemplo (Klran; Otlu; Karabulut, 2023).

A segunda linha de defesa é constituída de enzimas, capazes de neutralizar as EROS existentes, dentre essas, pode-se citar, as peroxirredoxinas e tioredoxinas que participam de reações redox protetoras (Jomova et al., 2024). Glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), que reduzem peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos usando GSH (Jomova et al., 2024). Por fim, as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) que trabalham em cascata, uma vez que a SOD catalisa a reação de conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e a CAT degrada o produto da SOD, o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Jomova et al., 2024).

A terceira linha de defesa, cumpre a reparação de danos oxidativos já existentes e modulação de uma resposta adaptada (Martins et al., 2021; Jomova et al., 2024). Em relação aos danos oxidativos à molécula de DNA, cita-se o sistema de reparo com excisão de bases, nucleotídeos e recombinação. Proteases como as calpaínas e sistema de proteassoma para remoção e degradação de proteínas defeituosas e lipases que degradam lipídios oxidados (Moldogazieva et al., 2023; Qiu et al., 2022)

Por fim, a quarta linha, em relação a modulação de uma resposta celular para resistir a estresses oxidativos futuros, cita-se a ativação de fatores de transcrição como Nrf2 que induz genes de defesa antioxidante, FOXO, NF-kB, AP-1 que regulam expressão de enzimas protetoras e citocinas (Martins et al., 2021).

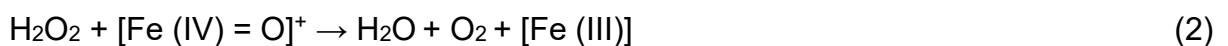
Dentre as linhas de defesa supracitadas a catalase é uma enzima que se destaca pelo seu papel crucial na resposta adaptativa à H_2O_2 (Tehrani; Moosavi-Movahedi, 2018). Por conta do seu fundamental papel na defesa contra o estresse oxidativo, as concentrações de catalase se apresentam alterados nos diferentes tecidos e desordens fisiológicas (Sies; Berndt; Jones, 2025). Os desequilíbrios

relativos a baixas concentrações de catalase se apresentam significativos em diabetes, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatórias e vários tipos de câncer (Galasso et al., 2021; Anwar et al., 2024). Portanto, a catalase representa tanto um alvo terapêutico, como potencial biomarcador para diagnósticos, destacando a relevância do desenvolvimento de uma técnica capaz de mensurar seus níveis em diversos tecidos.

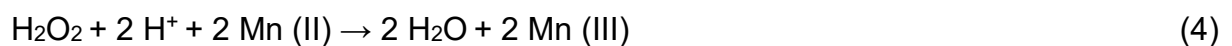
2.2 Catalase

Thernard, o descobridor do peróxido de hidrogênio, descreveu em 1811, que o consumo de tal substância pelo fígado, representado pela efervescência, era realizado por um “composto especial” (Zámocký; Koller, 1999). O qual em 1863 foi identificado por Schönbein como um “fermento”(Zámocký; Koller, 1999). Este “fermento” recebeu o nome de catalase por Loew, no século seguinte, em 1901 e duas décadas depois, havia na literatura mais informações acerca da sua estrutura. Na década seguinte, Sumner e Dounce em 1937 cristalizaram a primeira catalase a partir de fígado bovino(Zámocký; Koller, 1999). Nos anos 70, a estrutura primária da catalase havia sido desvendada e nos anos 80 surgiram as contribuições do isolamento do gene e caracterização da estrutura 3D da enzima (Quan et al., 1986a; Kirkman; Gaetani, 2007a).

Catalases são enzimas amplamente estudadas e divididas em 3 classes. A primeira classe, que abrange a maior parte das catalases, usa o peróxido de hidrogênio para oxidar um grupo Heme b, levando-o de Ferro (Fe) (III) à Fe (IV), formando um radical óxido-férrico e então reduz este radical utilizando outra molécula de H₂O₂ à Fe (III), formando oxigênio (Díaz et al., 2012). Equações 1 e 2 representam o mecanismo das catalases Heme-monofuncionais.



Este mecanismo também é observado em reações catalisadas pelas peroxidases. Porém, enquanto as catalases tem como substrato apenas H_2O_2 , as peroxidases podem utilizar diversos compostos orgânicos (Harris; Marles-Wright, 2024). Uma segunda classe de catalases, são as bifuncionais catalase-peroxidases, que surgiram de peroxidases de plantas e fungos e não compartilham homologia de sequência com as heme-monofuncionais supracitadas (Harris; Marles-Wright, 2024). A reação de peroxidação das catalases bifuncionais pode ocorrer em etapas de um elétron ou dois elétrons com H_2O_2 ou uma variedade de doadores de elétrons (Díaz et al., 2012). Aparentemente, essa classe de enzimas evoluiu para mitigar o poder de oxidação de H_2O_2 em diferentes compostos orgânicos e inorgânicos. A terceira e última classe de catalases, são as “manganês-dependentes”, usando um centro dinuclear de manganês (Mn) onde o peróxido de hidrogênio é primeiro oxidado à oxigênio molecular, enquanto a enzima extrai dois elétrons e dois prótons de H_2O_2 que são utilizados para reduzir a segunda molécula de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água (Whittaker, 2012). Equações 3 e 4 demonstram o mecanismo das catalases Mn - dependentes.



Utilizando como princípio os mecanismos supracitados, é possível mensurar a atividade de catalase analisando-se o consumo de H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio possui pico de absorbância no comprimento de onda 240 nm, com baixas concentrações de H_2O_2 é possível observar a redução da amplitude pico na presença de catalase (Aebi, 1984). Algumas técnicas quantificam o O_2 liberado da decomposição de H_2O_2 (Maehly; Uflith, 1954). Outras determinam o H_2O_2 residual, pela reação com compostos que conferem cor como iodeto de potássio, permanganato ou ainda acetato de cromo III (Hadwan, 2016).

Outras técnicas baseiam-se a oxidação de dicromato de potássio ou iodeto de potássio em meios ácidos de maneira a fazer medidas espectrofotométricas à 570 nm e 405 nm respectivamente (Sinha, 1972). Na década de 90, Góth e colaboradores

desenvolveram um ensaio espectrofotométrico, rápido e de baixo custo para quantificação da atividade de catalase em soro. Este método consiste na combinação de condições enzimáticas ótimas e formação de um complexo estável entre molibdato de amônio e o peróxido de hidrogênio (Góth, 1991).

A metodologia proposta por Góth consiste na incubação de 0,2 mL de soro com 1 mL de substrato (solução de 65 µmol/L de H₂O₂ em tampão fosfato 60 mmol/L pH 7,4) por 60 segundos. A reação é paralisada com adição de 1 mL de molibdato de amônio à 32,4 mmol/L. Forma-se então um complexo amarelo entre molibdato e H₂O₂ residual com pico de absorvância em 405 nm. A equação final necessita de três brancos, o branco 1 contendo substrato, molibdato e soro, o branco 2 contendo substrato, molibdato e tampão e o branco 3 contendo tampão e molibdato. Todas essas três soluções têm seus valores de absorvância à 405 nm considerados na equação final. A equação 5 representa o cálculo que correlaciona a atividade de catalase nas amostras com os valores de absorvância em 405 nm no método proposto por Góth em 1991.

$$\text{Atividade de catalase (kU/L)} = \frac{\text{Abs (amostras)} - \text{Abs (branco 1)}}{\text{Abs (branco 2)} - \text{Abs (branco 3)}} \times 271 \quad (5)$$

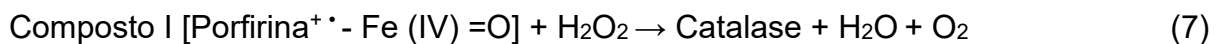
Esta técnica possui limitações quanto a exatidão em diferentes amostras, uma vez que, o conteúdo de lipídios, bilirrubinas e hemoglobinas induzem valores de absorvância mais elevados influenciando no ensaio da catalase (Góth, 1991). Além das limitações pela presença de interferentes, são necessárias grandes quantidades de amostra e a frequência analítica é baixa.

Tendo em vista as limitações apresentadas por esta técnica, o objetivo deste estudo foi otimizar as condições do ensaio quanto a quantidade de amostra, eliminação de interferentes, aumento da frequência analítica, além da aplicação em diferentes tecidos como fígado, rim, cérebro, coração e sangue total.

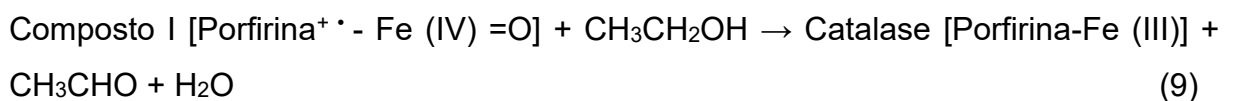
O locus gênico da catalase em mamíferos pode variar, em camundongos se encontra no cromossomo 2 e 3, em ratos no cromossomo 3, em bovinos no cromossomo 5 e em humanos no cromossomo 11p13(Quan et al., 1986b). Diferente de organismos como *Aspergillus nidulans*, que possuem múltiplos alelos de catA,

catB, catC e etc(Kawasaki; Aguirre, 2001). Os mamíferos possuem somente uma forma do gene CAT, altamente conservada, com 13 éxons, 12 íntrons, 527 aminoácidos de aproximadamente 60kDa que formam um homotetrâmero de aproximadamente 240 kDa(Bonini et al., 2007). O gene CAT é polimórfico, com diversos tipos de SNPs. Mutações nos sítios dos promotores (-262, -89 e -20) alteram a ligação com fatores de transcrição e modulam os níveis de expressão da catalase(Ren et al., 2007). Assim como mutações raras, como no nucleotídeo 5, trocando o resíduo Arg 2 por His causa acatalasemia, ou doença de Takahara, descrita como ausência da atividade de catalase (Hassib et al., 2024).

A catalase de mamíferos pertence ao grupo de catalases monofuncionais, com grupamento heme protoporfirina, com ferro IV no sítio ativo(Kirkman; Gaetani, 2007b ; Díaz et al., 2012). O mecanismo de reação mais bem aceito até a atualidade é o mecanismo no qual H₂O₂ oxida o Fe (III), formando um radical no grupo porfirina denominado composto I (Kirkman; Gaetani, 2007b; Díaz et al., 2012). Em seguida, a oxidação da segunda molécula de H₂O₂ pelo composto I, formando duas moléculas de água e oxigênio molecular (Kirkman & Gaetani, 2007b).Equações 6 e 7 representam o mecanismo das heme-catalases expressas em mamíferos.



A catalase de mamíferos também apresenta uma limitada atividade de peroxidase, como da formação de acetaldeído à partir do etanol por exemplo. No entanto, com velocidade muito baixa se comparada à função de catalase com um dos maiores valores de turnover já conhecidos (Kirkman; Gaetani, 2007b). A Equação 9 representa o mecanismo secundário de peroxidase exercido pelas catalases.



A cinética desta enzima segue o princípio de Michaelis-Menten, e possui taxa proporcional a concentração do seu substrato, em altas concentrações de H_2O_2 predomina-se o mecanismo supracitado e em baixas concentrações as reações peroxidativas podem ser observadas (Kirkman; Gaetani, 2007a).

Na década de 80 algumas descobertas foram feitas acerca da participação de NADPH na atividade de catalase (Kirkman; Gaetanit, 1984). Experimentos com eritrócitos humanos e fígado bovino demonstraram que tetrâmero da enzima apresenta-se fortemente ligado à quatro moléculas de NADPH e a ordem de afinidade é de $NADPH > NADH > NADP^+ > NAD^+$, a remoção de NADPH não inativa a enzima, mas durante exposições prolongadas à H_2O_2 o NADPH é oxidado à $NADP^+$ e a atividade decai na ordem de três vezes (Quan et al., 1986a; Kirkman; Galiano; Gaetani, 1987).

Foram formuladas três hipóteses sobre o papel de NADPH, nas quais o NADPH seria um substrato em alguma ação enzimática da catalase, ou NADPH serviria para prevenção da inativação da catalase pelo seu próprio substrato tóxico, funcionando como redutor para recuperação de atividade, ou a terceira hipótese do papel da catalase como proteína reguladora ativando mecanismos das GSH e GPX para funcionarem mais eficientemente em condições celulares de estresse peroxidativo (Kirkman; Galiano; Gaetani, 1987; Kirkman; Gaetanit, 1984).

Quase uma década depois foi proposto um mecanismo para catalase de mamíferos, confirmando a segunda hipótese supracitada. No funcionamento normal enzimático, o composto I, onde o grupo heme fica como cátion radical e $Fe(IV)$ ligado à um oxigênio, oxida em seguida outra molécula de H_2O_2 , retirando dois elétrons da molécula formado H_2O e O_2 e reduzindo $Fe(IV)$ à $Fe(III)$ e liberando a enzima no seu estado ativo novamente (Putnam et al., 2000).

No entanto, o composto I é um poderoso oxidante, e se esse recebe um único elétron de maneira inadequada, forma-se um composto II que é inativo, uma vez que o $Fe(IV)$ permanece ligado no oxigênio, porém o radical do anel porfirínico é reduzido estabilizando-se sem completar a reação (Putnam et al., 2000).

Dessa forma o NADPH impede a formação do composto II promovendo a transferência de elétrons por *tunneling*, mantendo a enzima ativa e reduzindo mais de 80% da formação do composto II (Putnam et al., 2000). A cristalografia de hemácias

humanas demonstrou que o resíduo de Tyr 370 serve como ponte para transferência de elétrons (*tunneling*), ou seja, o NADPH não reduz diretamente o sítio ativo (Putnam et al., 2000). O papel protetor de NADPH é tão fundamental que sua deficiência em eritrócitos humanos aumentou a vulnerabilidade ao estresse oxidativo levando à hemólise (Luzzatto; Ally; Notaro, 2020).

A catalase possui diferentes níveis de expressão em cada tecido e órgão, visto que a demanda da atividade desta enzima varia de acordo com a necessidade metabólica de cada órgão e o quanto cada tecido é exposto às situações de estresse oxidativo (Kim; Kim. G; So, 2018).

Além disso, os órgãos possuem diferentes fatores de transcrição com perfis de expressão diferentes. Por exemplo, nos adipócitos o principal fator transcrricional é PPAR γ , enquanto nas células musculares é o NF- κ B (Luo; Rando, 2003; Okuno et al., 2008). Por outro lado, além da regulação transcrricional, mecanismos pós transcrpcionais também são observados. Situações de acatalasemia, por exemplo, apresentam altos níveis do mRNA do transcrito da catalase em eritrócitos, mas sem atividade da enzima, sugerindo controle pós-transcrricional por degradação do transcrito (Nakamura et al., 1999).

O padrão de expressão de catalase modifica-se ao longo do tempo, com genes reguladores apresentando perfis diferentes no desenvolvimento neonatal, fase adulta e envelhecimento (Schisler; Singh', 1987). Além disso, fatores ambientais são relevantes na indução ou supressão da expressão da catalase, como exercício físico, dieta, assim como, condições de inflamação e patologias (Wilson; Johnson, 2000).

Dada sua localização estratégica em organelas como peroxissomos e sua alta eficiência na decomposição do H₂O₂, a catalase atua como um pilar na defesa antioxidante celular. Alterações em seus níveis ou atividade funcional estão associadas a diversas patologias. Nesse contexto, a quantificação precisa da atividade de catalase em diferentes matrizes biológicas não só contribui para o entendimento da fisiopatologia redox, mas também pode oferecer suporte diagnóstico e prognóstico, reforçando a necessidade de ensaios padronizados e sensíveis

2.3 Atividade de catalase em diferentes órgãos

2.3.1 Fígado

O fígado é um órgão especialmente exposto à EROS, não só produtos da cadeia respiratória mitocondrial, peroxissomos, xantina oxidases, CYP450 oxidases e NOXs, como também, durante processos de biotransformação de xenobióticos (Allameh et al., 2023). As oxidases da família das citocromo P450 são as maiores produtoras de EROS nos hepatócitos. As NOX por sua vez são as principais contribuintes nas células estreladas hepáticas (HSCs) e células de Kupffer (Allameh et al., 2023).

No fígado, catalase é uma das enzimas antioxidantes dominantes, armazenadas principalmente nos peroxissomos (Walton; Pizzitelli, 2012). Quanto aos fatores de transcrição, NFR2 e PPAR-alfa são basicamente os dois eixos reguladores da expressão de catalase, sendo NFR2 nos contextos de dieta, xenobióticos, lesão por drogas e esteatose e PPAR-alfa voltada para proteção contra hepatotoxicidade alcohólica em humanos (Yue et al., 2021; Fuertes-Agudo et al., 2023).

Como o fígado recebe aproximadamente 70% do fluxo sanguíneo da veia porta, no caso de uma alimentação rica em ultraprocessados, é o órgão com a maior acumulação de nanopartículas vindas dos aditivos alimentares. O que causa inflamação, resistência à insulina e esteatose mediados por estresse oxidativo (Medina-Reyes et al., 2020). Por ser o principal local do metabolismo de xenobióticos são altamente susceptíveis aos desbalanços no metabolismo das CYP450 causados pelo contato com poluentes como dioxinas e resíduos de pesticidas (Ahmad, 1995).

Além disso, a exposição a drogas recreativas como álcool é um importante via de indução de estresse oxidativo neste órgão (Allameh et al., 2023). Visto que o metabolismo hepático do etanol depende de duas enzimas, a álcool desidrogenase, que converte etanol em acetaldeído, e aldeído desidrogenase que converte acetaldeído em acetato. Durante estes processos ocorre um aumento de NADH/NAD⁺ que leva à uma sobrecarga mitocondrial que é um grande contribuinte para o estresse oxidativo (Yang et al., 2022). Além disso, o etanol ativa enzimas como CYP2E1 grande produtora de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Também

ativa NADPH oxidases em células inflamatórias produzindo ainda mais EROS localmente (Yang et al., 2022).

Na literatura a catalase foi capaz de reduzir o acúmulo de H_2O_2 e atenuar lesões causadas por hepatotóxicos (Bai et al., 2023). Variações bruscas nos níveis de catalase mostraram-se promissores na oncogênese e progressão tumoral neste órgão (Kosmalski et al., 2023).

2.3.2 Rins

Devido a função de filtração, os rins captam nanopartículas de aditivos alimentares e possuem alta exposição ao estresse oxidativo por conta da filtração glomerular das exocitoses realizadas pelos outros órgãos e recirculação destes materiais tóxicos (Medina-Reyes et al., 2020). Além disso, na exposição à poluentes, sofrem com acúmulo de metais pesados com cádmio, mercúrio e chumbo que causam danos tubulares associados à EROS (Ahmad, 1995; Yang; Omaye, 2009; Suradi et al., 2021).

Por conta de toda a exposição deste órgão à danos oxidativos, a catalase também possui um papel central na proteção deste órgão. A catalase encontra-se principalmente localizada nos peroxissomos renais, a atividade e expressão varia entre córtex, medula e segmentos tubulares por conta das diferentes atividades metabólicas (Sani et al., 2006; Glorieux; Calderon, 2017). A regulação da expressão é controlada pelos fatores NRF2, PPARs e altamente influenciada pelos estados metabólicos, como diabetes e obesidade (Sani et al., 2006; Glorieux; Calderon, 2017).

Sabe-se que o peróxido de hidrogênio contribui de maneira relevante para dano isquêmico no rim, e estudos da inibição de catalase antes do episódio de isquemia exacerba o dano, necrose e perda de função (Paller, 1991). Ensaio de nefrotoxicidade, onde houve queda na atividade de catalase após a exposição de nefrotóxicos (cisplatina, contraste iodado) mostrando seu consumo e papel central na defesa dos rins (Yoshioka; Fogo; Beckman, 1992). Outros estudos sobre nefropatia diabética demonstraram que a deficiência de catalase acelera a lesão renal diabética, com maiores níveis de proteinúria, fibrose e lipotoxicidade tubular (Hwang et al., 2012).

A presença de NOX4 em doenças renais mostrou-se de grande relevância, uma vez que interagiu com a mitocôndria estimulando um aumento na produção de EROS, que causou uma hiperativação da sinalização redox (Aranda-Rivera et al., 2022). Em tumores a mesma enzima mostrou-se associada à quimioresistência e a sua inibição sensibilizou células tumorais à morte (Aranda-Rivera et al., 2022). Esses resultados em conjunto demonstram o importante papel da catalase na proteção deste órgão contra danos oxidativos advindos de situações metabólicas de estresse.

2.3.3 Coração

O músculo cardíaco consiste em um tecido com alta demanda de energia e alta dependência de ATP, que provém aproximadamente 60% da oxidação de ácidos graxos e 40% de glicose e lactato, sendo assim a maquinaria oxidativa está sob intensa demanda e sensível à distúrbios mitocondriais produtores de EROS (Pagan et al., 2022). As principais fontes de EROS além dos distúrbios mitocondriais são as NADPH oxidases (NOX), NOS, retículo endoplasmático e outros contribuintes menores como CYP450.

Em baixas concentrações EROS estão relacionadas à sinalização celular, mas em altas concentrações impactam diretamente na maquinaria eletrofisiológica e contrátil dos cardiomiócitos, por modificar proteínas centrais da excitação e canais iônicos (Van der Pol et al., 2019). O estresse causado pela família das NOXs tem sido relacionado à fisiopatologia de hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose, angiogênese e disfunções endoteliais diversas. As mudanças nas concentrações de NOS e óxido nítrico estão envolvidas na fisiopatologia do envelhecimento. O óxido nítrico regula as xantina oxidases, grandes produtoras de EROS neste tecido, e a deficiência de NOS1 E NOS3 é associada à hipertrofia em camundongos (Tsutsui; Kinugawa; Matsushima, 2011). Tanto no coração quando nos rins os substratos das xantina oxidases (XOs), produzidas por meio da quebra de ATP em episódios de isquemia, induzem a produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ seguido de reperfusão.

Há uma correlação entre doenças cardiovasculares de a hiperativação de XOs, uma vez que aumentam a produção de EROS e diminuem a de ERN que são relevantes para sinalização celular nesses tecidos, causando perturbação da

homeostase (Huber et al., 1996). Outra família relevante de enzimas produtoras de EROS são as MPOs, sua ativação é fortemente relatada em doenças cardiovasculares e aterosclerose e experimentos mostraram que a hiperexpressão de MPO em camundongos acelerou o desenvolvimento de placas de ateroma (Ndrepepa, 2019). Além disso, a ativação de MPO é presente no início e progressão de doenças cardíacas (Ndrepepa, 2019).

O consumo crônico de álcool não afeta somente o fígado, mas também ativa CYP2E1 no miocárdio gerando EROS, o estresse oxidativo causa peroxidação lipídica, formando 4-HNE e MDA que formam adutos com proteínas contráteis (actina, miosina e troponina) causando distúrbios na força de contração (Ignatowicz et al., 2013). Além disso, o estresse oxidativo causa a oxidação do receptor Rianodina e SERCA, uma bomba de cálcio presente no retículo sarcoplasmático, causando vazamento de Ca^{2+} levando a contrações disfuncionais, arritmias e morte celular.

Dessa forma, o estresse oxidativo também causa ativação inflamatória que contribui para doses ainda maiores de EROS e por consequência o processo de remodelamento e fibrose (Ignatowicz et al., 2013). Outra droga recreativa também relevante do ponto de vista de formação de estresse oxidativo neste órgão é o tabaco. A ingestão de radicais livres, geram continuamente ânions superóxido e peróxido de hidrogênio e o material particulado do alcatrão com metais pesados catalisam reações de Fenton, produtoras de radical hidroxila, e essas EROS por fim geram estresse oxidativo agudo neste tecido (Emma et al., 2022). Somado ainda a outros fatores, como a nicotina que causa aumento de catecolaminas que aumentam a demanda de oxigênio do miocárdio, no entanto o monóxido de carbono inalado reduz a entrega de oxigênio levando à uma hipóxia miocárdica e favorece a geração de EROS por mitocôndrias em baixa concentração de oxigênio. Assim também, como a oxidação de lipoproteínas (ox-LDL) que são fagocitada por macrófagos e a reação inflamatória resulta em aterosclerose (Ignatowicz et al., 2013).

Devido à alta atividade metabólica e o controle fino das concentrações de EROS que este órgão necessita a defesa antioxidante é fundamental. Fazendo parte desta defesa a catalase se apresenta principalmente armazenada nos peroxissomos dos cardiomiócitos e com algumas porções no citosol (extraperoxisomais) (ZhouKang, 2000). A regulação da expressão de catalase no miocárdio é realizado pelos fatores Nrf2 e FOXO3 ambos integram sinais de estresse ao aumento de

expressão de catalase e a maquinaria antioxidante para proteção do tecido cardíaco contra lesões (Tan et al., 2008; Chen; Maltagliati, 2018).

Na literatura, em estudos de casos de insuficiência cardíaca avançada, os pacientes apresentam aumento nos níveis de catalase de maneira compensatória em resposta ao estresse oxidativo e outras enzimas também relevantes (SOD e GPx) não apresentam o mesmo padrão (Dieterich et al., 2000). A administração de antioxidantes em pacientes pós-operatórios resultou em aumento da atividade de catalase no tecido atrial com efeitos positivos na recuperação (Rodrigo et al., 2013). E estudos relacionados a fibrilação atrial paroxística demonstraram aumentos significantes de catalase horas antes da manifestação clínica que permaneceu por semanas com a restauração do ritmo saudável, mostrando um potencial poder prognóstico (Negreva et al., 2014). Estes estudos clínicos revelam o potencial da catalase como diagnóstico, tratamento de insuficiência cardíaca e cuidados pós-cirúrgicos.

2.3.4 Cérebro

O cérebro é um órgão altamente suscetível ao estresse oxidativo, devido sua alta demanda energética e alto teor de lipídios em sua composição (Trofin et al., 2025). No entanto, apesar da susceptibilidade possui uma defesa antioxidante vulnerável e o desequilíbrio de EROS está relacionada à várias doenças neurodegenerativas (Trofin et al., 2025). As nanopartículas de aditivos alimentares atravessam a barreira hematoencefálica, e acumulam-se principalmente no hipocampo, hipotálamo, córtex, tálamo e cerebelo, onde levam a condições de estresse oxidativo, apoptose dos neurônios e astrócitos (Medina-Reyes et al., 2020; Kim; Jung; Kim, 2024). No contato com poluentes, material com particulado extra fino também é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, ativando a micróglia e causando pontos de inflamação (Suradi et al., 2021).

O cérebro é especialmente vulnerável à metais pesados, pesticidas e partículas atmosféricas por possuir uma alta taxa metabólica, alta proporção de lipídios poli-insaturados e baixa defesa antioxidante o que o torna alvo fácil de danos por peroxidação lipídica o que pode estar relacionado à diversas doenças neurodegenerativas (Suradi et al., 2021).

A exposição ao álcool também tem seu papel na neurotoxicidade causada pelo estresse oxidativo (Coulbault et al., 2025.). O estímulo de enzimas, como a CYP2E1 em neurônios e astrócitos gera EROS localmente, o acetaldeído e EROS ativam a micróglia aumentando a carga de EROS e ERN que causam danos a proteínas e dano mitocondrial(Coulbault et al., 2025.). As mitocôndrias por sua vez disfuncionais aumentam a formação de EROS e diminuem a síntese de ATP, causando perda de homeostase iônica, entrada massiva de cálcio e ativação de proteases, endonucleases e fosfolipases que aprofundam o dano oxidativo(Coulbault et al., 2025.).

Quanto a outras drogas recreativas como tabaco, os efeitos são piores, uma vez que as nanopartículas ultrafinas alcançam a circulação e tem contato direto com células da glia, os radicais da fumaça ativam CYP1A1 e CYP1B1 em células da gliais que produzem semiquinonas e geração contínua de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio(Emma et al., 2022). A ativação da micróglia contribui com maior produção de EROS localmente, causando neurodegeneração, disfunção do endotélio cerebral e edemas. Dessa forma, aumenta-se o risco de AVC isquêmico, microangiopatia e comprometimento cognitivo(Emma et al., 2022).

Tendo em vista, a vulnerabilidade do cérebro e as diversas vias de exposição ao estresse oxidativo, a catalase destaca-se como enzima antioxidante fundamental(Trofin et al., 2025). Neste tecido é principalmente armazenada em peroxissomos (Berger et al., 2016). Astrócitos e oligodendrócitos são células com alto conteúdo de peroxissomos, e alta eficiência em decompor peróxidos de hidrogênio (Desagher; Glowinski; Premont, 1996; Berger et al., 2016). Existem evidências robustas de que a atividade de catalase peroxissomal são críticos para integridade da substância branca, assim como distúrbios peroxissomais causam severas disfunções neurológicas (Kassmann, 2014; Berger et al., 2016; Takahashi, 2021).

A expressão de catalase neste órgão assim como os outros também possui regulação transcricional pelas vias clássicas de resposta ao estresse oxidativo, via fator NRF2 e PPARy. Na década de 70, um estudo em cérebros de pacientes com Parkinson demonstrou uma evidência de redução local de catalase na substância negra e putamen sugerindo vulnerabilidade contra EROS (Ambani; Van Woert; Murphy, 1975). Estudos mostram um papel significativo do estresse oxidativo na

doença de Alzheimer e especialmente uma correlação entre a disfunção de catalase e progressão neurodegenerativa (Mao et al., 2012). Em modelos animais e estudos pré-clínicos com doença de Alzheimer o aumento da concentração de catalase direcionada ao peroxissoma ou ainda mais eficiente, direcionada à mitocôndria reduz a toxicidade das placas beta amiloides, reduzindo a neuroinflamação (Nell et al., 2017).

Vários estudos correlacionam o declínio da atividade de catalase em cérebros de roedores envelhecidos e manipulações com aumento de catalase mitocondrial (mCAT) com melhora de prognósticos como aumento do tempo de vida (Nistic.G. et al., 1992). Portanto, claramente existe uma correlação positiva entre a presença de catalase e proteção contra danos oxidativos neste órgão.

2.4 Atividade de catalase no sangue e soro

O sangue é o principal veículo de transporte de oxigênio e metabólitos, por conta disso é um tecido constantemente exposto à EROS, sendo assim, a catalase possui importante papel antioxidante (Margaritelis et al., 2015). No sangue circulante, a maior parte da atividade medida vem de hemácias ou de proteínas e vesículas liberadas (Margaritelis et al., 2015; Grilo et al., 2020). A atividade de catalase no plasma é normalmente baixa, mas a presença de contaminação por hemólise, ou seja, lise de hemácias, pode resultar em valores superestimados que atrapalham a análise dos resultados (Grilo et al., 2020).

A deficiência ou total ausência de catalase, no sangue foi descrita pela primeira vez em 1948 pelo médico japonês Shigeo Takahara, ao observar pacientes com gangrena oral, periodontite grave, perda precoce dos dentes (Takahara, 1951; Takahara, 1954). A acatalasemia ou doença de Takahara é rara e é causada por uma mutação bialélica do gene CAT (Takahara, 1951; Ogata, 1991). A deficiência de catalase tem uma série de implicações clínicas uma vez que a vulnerabilidade ao estresse oxidativo associa-se aos mais diversos fenótipos como diabetes, esteatose entre outros associados ao acúmulo de peróxido de hidrogênio (Heit et al., 2017). Em

situações de alta produção de EROS como inflamações, diabetes, infecção viral e intoxicação por xenobióticos, a atividade de catalase no sangue se apresenta reduzida, por conta das altas taxas de substrato que levam ao seu consumo e este perfil é observado em conjunto com aumento de biomarcadores de peroxidação lipídica (Asatiani et al., 2025).

Na prática clínica os experimentos que mensuram a atividade de catalase no soro apresentam-se muito heterogêneos uma vez que a precisão dos resultados depende fortemente do controle de hemólise (Grilo et al., 2020). Do ponto de vista clínico, os valores de catalase no plasma apresentam-se alteradas em diversas doenças como diabetes, doenças cardiovasculares e infecções como COVID-19 (Qin et al., 2020). A atividade de catalase se apresentou descendente, em diabetes mellitus tipo II e diabetes gestacional, porém sem alterações na diabetes tipo I (Góth et al., 2015). Este resultado sugere, a baixa atividade de catalase mais como causa do que como consequência, uma vez que a sensibilidade crônica contra o estresse oxidativo em células beta pancreáticas, produtoras de insulina, pode manifestar a diabetes tipo II (Takemoto et al., 2009; Góth et al., 2015). Esta sugestão é fortalecida mediante a susceptibilidade de camundongos acatalasêmicos à diabetes (Takemoto et al., 2015).

Estudos presentes na literatura sugerem que variações polimórficas de catalase contribuem para níveis elevados de triglicérides no plasma de pacientes com diabetes tipo II e doenças cardiovasculares causadas por diabetes. Não obstante, outros estudos afirmam a não associação entre a atividade de catalase e risco de doenças coronarianas em pessoas saudáveis (Chen et al., 2012; Yang et al., 2014). Estudos da atividade de catalase no plasma de pacientes com catarata, mostraram uma fina correlação entre os níveis de catalase baixos e níveis altos de peroxidação lipídica, porém sem resultados significativos (Ateş et al., 2004). Outros estudos mais recentes mostraram alterações na atividade plasmática de catalase em pacientes com COVID-19, sugerindo que infecções envolvem mecanismos de dano mediados pela formação de radicais, uma vez que a taxa de peroxidação lipídica aumentou três vezes, e atividade de catalase aumentou 1,4 vezes em pacientes com COVID-19 e comparados com saudáveis (Pavlova et al., 2025).

Resultados drásticos de redução dos níveis de catalase em pacientes com psoríase se mostraram marcadores da severidade da doença (Zhang et al., 2019). Em pacientes com câncer de ovário, a atividade de catalase no plasma se mostrou

significativamente menor que dos controles saudáveis, mas não confirmaram fatores prognósticos (Didžiapetriene et al., 2014a). Uma série de terapias envolvendo o uso de catalase no plasma estão em constante progressão (Anwar et al., 2024). Usos da enzima recombinante (rhCAT) em estudos pré-clínicos demonstraram proteção contra lesões oxidativas no pulmão de camundongos com pneumonia, mas demonstrou rápida depuração. Por outro lado, a catalase “PEG-lada”, com modificação química de cauda de poli-etileno glicol (PEG) aumentou a biodistribuição e eficácia terapêutica da rhCAT (Shi et al., 2013).

Estes resultados em suma demonstram o grande potencial da catalase como biomarcador no sangue/plasma ou utilizando-a como veículo de terapias. No entanto, os resultados heterogêneos mostram as limitações da utilidade clínica do plasma como amostra, uma vez que a contaminação por hemólise é um grande interferente. Portanto a padronização analítica deste tipo de amostra é de fundamental importância para novos desenvolvimentos da pesquisa clínica.

2.5 Protocolos para ensaio de catalase

A primeira metodologia proposta para medir a atividade de catalase foi criada por Britton Chance em 1952, baseado no método manométrico, ou seja, a amostra é colocada em frasco de Warburg com tampão e substrato (H_2O_2) e a liberação de O_2 realizada pela reação desloca o líquido de referência em um manômetro conectado (Chance, 1952). Dessa forma a atividade de catalase é proporcional à liberação de O_2 , este ensaio mede diretamente o produto formado. No entanto, necessita de vidrarias obsoletas e possui baixa sensibilidade para pequenas quantidades de amostras (Chance, 1952).

O mesmo pesquisador, associado à Maehly em 1954, propuseram uma metodologia espectrofotométrica. Até hoje conhecida como método espectrofotométrico clássico que visava acompanhar a diminuição da absorbância de H_2O_2 a 240 nm no espectrofotômetro (Maehly; Chance, 1954). Este método é simples, rápido e direto, permite análise cinética em tempo real, no entanto, é pouco robusto para amostras complexas, como homogenatos e plasma devido a presença de uma série de interferentes, como proteínas e outros compostos que absorvem na mesma região UV (Maehly; Chance, 1954).

Após duas décadas, em 1972, Sinha, propôs uma metodologia colorimétrica, com a parada da reação após um tempo fixo por meio da adição de dicromato e ácido acético e aquecimento com formação de complexo de Cr^{3+} de cor verde azulada de absorbância mensurável a 570 nm (Sinha, 1972). Método inovador, simples que não requiriu UV. No entanto, como possui parada de reação não é possível observar a cinética e dicromato é um reagente altamente tóxico e cancerígeno (Sinha, 1972). Mais tarde, Aebi, em 1984 criou uma metodologia com objetivo de refinar as anteriormente propostas, definindo parâmetros cinéticos, estabelecendo monitoramento da velocidade enzimática sob condições de concentração fixa de H_2O_2 e medidas do consumo de H_2O_2 à cada 15 segundos por 3 minutos (Aebi, 1984).

Técnica reproduzível, que se transformou em padrão internacional, mas com as mesmas limitações do método de 1955 quanto a presença de interferentes (Aebi, 1984). Em 1991, Góth, L. desenvolveu um ensaio capaz de determinar a atividade de catalase em amostras de soro, onde a amostra é incubada com solução com excesso

de H_2O_2 após tempo fixo e 60 segundos, a adição de molibdato de amônio em meio ácido, interrompendo a reação e formando um complexo amarelo com o H_2O_2 residual, cuja absorvância máxima está em 405 nm contra o branco dos reagentes, sendo a atividade de catalase expressa em katal/L (Góth, 1991). Este método é simples, barato, rápido, com complexo estável, o que permite leituras tardias se necessárias. No entanto, possui uma série de interferentes como bilirrubina, ácido úrico e antioxidantes que podem afetar a absorvância e pouca sensibilidade à baixos níveis de catalase (Góth, 1991). Alguns anos mais tarde, em 2004, esse método foi refinado pelo seu criador que ampliou seu uso para amostras de homogenatos, flexibilização do tempo de incubação entre 30 e 60 segundos para amostras mais saturadas, correção das amostras com criação de um branco, mudou a unidade de atividade para U/L (Góth; Rass; Páy, 2004)

Em 1997, surgiu a metodologia fluorimétrica, seguindo o mesmo princípio da metodologia proposta por Góth, porém com formação de complexos entre o H_2O_2 residual e Amplex Red, formando resorufina fluorescente com absorvância em 530/590 nm (Zhou et al., 1997). Este método tem como vantagem, altíssima sensibilidade em nanomolar, mas é um método caro e fotossensível. Além disso, este método foi criado para medir peróxido de hidrogênio gerado por oxidases, onde a catalase entra como competidora, reduzindo o sinal de Amplex Red, portanto, a medida de atividade de catalase é indireta neste método (Zhou et al., 1997).

Nos anos 2010, surgiram uma ampla gama de novos métodos eletroquímicos e quimioluminescentes. Em 2014, foi desenvolvido um biosensor amperométrico, onde a amostra é imobilizada em eletrodo modificado, seguido da adição de H_2O_2 e a liberação de O_2 é monitorado por meio de corrente elétrica, onde a intensidade do sinal reflete a atividade de catalase (Teke, 2014). Ainda no mesmo ano, o reagente CUPRAC foi criado, composto de cobre II que é capaz de reagir com H_2O_2 para formar complexo colorido de absorvância em 450 nm, porém com a inovação da imobilização deste sistema em filme para sensor óptico (Bekdeşer et al., 2014). Método de baixo custo, aplicável em amostras de tecido e leitura rápida, porém menos sensível e com série de interferentes complexadores de Cu(II) (Bekdeşer et al., 2014).

Em 2018, o método quimioluminescente recebeu destaque pela utilização de luminol para medida de H_2O_2 remanescente, sua intensidade de luz é inversamente proporcional à atividade de catalase (Ghavami-pour; Sajedi; Khajeh, 2018). É um

método extremamente sensível (femto à picomolar) porém de alto custo, e baixa aplicação em amostras clínicas (Ghavamipour; Sajedi; Khajeh, 2018). Ainda no mesmo ano surgiram outras propostas de métodos colorimétricos, usando peroxovanadato e metavanadato (Hadwan; Ali, 2018).

Em 2021 surgiram aplicações de métodos indiretos, baseados na oxidação de compostos como pirogalol vermelho e pirocatecol pelo H_2O_2 residual, com medidas indiretas da atividade de catalase (Farman; Hadwan, 2021; Krishna et al., 2021). Em 2022, foi publicado um trabalho relevante de princípio inovador sobre a atividade de catalase natural (catalase-like nanozymes), capaz de produzir O_2 que inibe a autopolimerização da dopamina, portanto quanto maior a atividade de catalase, menor polimerização, menor sinal colorimétrico e menor absorbância (Lin et al., 2022). Esta metodologia apresenta obstáculos como interferentes que podem despolarizar a dopamina (Lin et al., 2022). Por fim, nos anos de 2023 e 2025 foram feitas atualizações dos métodos eletroquímicos e luminescentes (Yuan et al., 2023; Nde et al., 2025).

Novos eletrodos de material híbrido foram desenvolvidos para aumentar limites de detecção, com resposta rápida e análises em tempo real de atividade de catalase no plasma sanguíneo (Nde et al., 2025). Assim como, sondas quimioluminescentes híbridas (CL) de SPAN e luminol, foram desenvolvidas para detecção de H_2O_2 e resistência a diferentes pHs, permitindo o monitoramento de H_2O_2 produzido por células *in vivo* (Yuan et al., 2023).

Tabela 1 - Ensaio de catalase criados entre 1952-2025

Método (ano)	Princípio	Tipo de leitura	Tipo de amostras	Vantagens	Desvantagens
Manométrico (1950s)	O ₂ liberado pela CAT	Volume de gás (manômetro)	Homogenatos, enzimas puras	Direto	Baixa sensibilidade, trabalhoso, não adequado a rotina Exige espectro UV; interferência de
Chance & Maehly (1955) Aebi (1984)	Queda de H ₂ O ₂ a 240 nm	Queda de H ₂ O ₂ a 240 nm	Enzimas puras, soro	Simples, rápido, clássico, ainda usado em pesquisa	absorvância de proteínas/pigmentos; pouco aplicável a amostras complexas
Sinha (1972)	Dicromato + H ₂ O ₂ → cor (verde/azul)	Absorbância 570 nm	Amostras opacas, sem acesso a UV	Mais barato, não precisa UV, reprodutível	Usa reagentes tóxicos (dicromato); menor sensibilidade; pouco usado hoje
Góth (1991; refinado 2004)	H ₂ O ₂ residual + molibdato → complexo amarelo	Absorbância 405 nm	Soro, plasma, eritrócitos, tecidos	Adequado a rotina clínica, robusto, custo baixo, boa reprodutibilidade	Menos sensível que fluorimetria; interferentes ópticos (hemoglobina,

					bilirrubina) exigem brancos
Zhou et al. (1997)					Reagente caro, dependente de HRP, risco de falsos sinais em matrizes complexas
Amplex Red / Horseradish Peroxidase (HRP)	H_2O_2 residual → resorufina fluorescente	Fluorescência (530/590nm)	Sangue, tecidos, cultura celular	Altíssima sensibilidade, aplicável em microplaca, baixo volume de amostra	
Bekdeser et al. sensor (2014)	H_2O_2 + CUPRAC (Cu(II)-Nc) → cor	Absorbância 450 nm	Homogenatos, tecidos (fígado, rim)	Simples, barato, boa linearidade, aplicável em sensores portáteis	Sensibilidade menor; pode sofrer interferência de antioxidantes/redutores
Hadwan (2016)	Dicromato + H_2O_2 residual → ácido percrômico → acetato de cromo (III)	Absorbância 570 nm	Soro	Baixo custo, poucos interferentes, metodologia simples	Açúcares e aminoácidos básicos são possíveis interferentes.

Hadwan M. (2018) Metavanadato de amônia	H ₂ O ₂ residual + metavanadato → peroxovanádio colorido	Absorbância 405–452 nm	Soro e tecidos	Não usa reagentes tóxicos, barato, confiável, aplicável em clínica	Menos sensível que fluorimetria, dependente de pH/tempo, interferentes redox possíveis
Pyrogallol Red-HRP (2017–2021)	H ₂ O ₂ residual oxida PGR na presença de HRP → cor cinética	Absorbância 500 nm	Soro, plasma, tecidos, microplaca	Sensível, leitura em visível, microplaca, custo baixo	Depende de HRP, reagentes menos estáveis, matriz pode interferir
Pyrocatechol (2020– 2021)	H ₂ O ₂ residual oxida pyrocatechol → quinona- imina (rosado)	Absorbância 530 nm	Sangue humano (plasma, eritrócitos)	Específico para sangue, reagentes baratos, boa linearidade	Sensibilidade moderada, reagentes precisam ser frescos, suscetível a interferência
Lin et al. (2022) Ensaio de dopamina	O ₂ liberado por CAT inibe polimerização da dopamina	Absorbância/ cor	Enzimas, nanozymes, múltiplas matrizes	Versátil (catalase e nanozymes), não precisa HRP, inovador	Novo, pouco padronizado, polimerização pode ser

					afetada por outras espécies
Quimioluminescência / QDs (2018–2023)	H ₂ O ₂ modula emissão luminosa de luminol/QDs	Luz (CL detector)	Ensaio ultra-sensíveis em células <i>in vivo</i>	Altíssima sensibilidade	Equipamento caro, reagentes instáveis, pouca aplicabilidade clínica de rotina
Eletroquímico / biosensores (2010s–2025)	Consumo/liberação de H ₂ O ₂ ou O ₂ em eletrodo	Voltametria	Ensaio portátil, tecidos e soro	Rápido, tempo real, microvolumes, potencial portátil	Necessidade de eletrodos modificados, padronização ainda limitada, interferentes eletroativos

Fonte: Elaboração própria.

De todos os métodos descritos na literatura para ensaio de atividade de catalase, os métodos colorimétricos são os que apresentam as melhores relações de custo benefício. Uma vez que métodos que envolvem usos de enzimas purificadas, substâncias quimioluminescentes e biosensores possuem como vantagem altas sensibilidades, mas como desvantagens, muitos interferentes e exigem reagentes ou equipamentos de alto custo e/ou complexidade. Os métodos colorimétricos são simples, de baixo custo,

possuem boa sensibilidade e poucos interferentes e são versáteis podendo ser aplicados a diferentes tipos de amostra. Portanto, este estudo visa a otimização de um ensaio quantitativo de catalase utilizando molibdato de sódio como agente colorimétrico padronizado em microplaca para diferentes tipos de amostras biológicas.

3. OBJETIVOS

Padronizar e otimizar o ensaio de catalase em microplaca de 96 poços para tecido hepático, renal, cardíaco, nervoso e sanguíneo.

3.1 Objetivos específicos

- Adaptar o ensaio de atividade de catalase para o formato de microplaca de 96 poços (*High-throughput Screening - HTS*), definindo volumes, condições de reação e parâmetros de leitura espectrofotométrica.
- Avaliar a estabilidade dos reagentes críticos do ensaio (solução de peróxido de hidrogênio e solução de parada com molibdato), estabelecendo condições e frequência adequadas de preparo/armazenamento.
- Validar o desempenho analítico do método em microplaca, determinando linearidade (curva padrão), precisão/exatidão, repetibilidade (intraensaio) e reprodutibilidade (interensaios/interdias) por meio de métricas como DP e %CV.
- Determinar, para cada tecido analisado (fígado, rim, coração e cérebro), a faixa de diluições em que o ensaio apresenta resposta linear e resultados confiáveis, definindo zonas de trabalho recomendadas.
- Investigar o efeito da hemólise sobre a atividade de catalase em amostras sanguíneas, comparando plasma, plasma hemolisado e sangue total, e avaliar a viabilidade do sangue total como alternativa para reduzir interferências associadas à hemólise.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas e obtenção das amostras

Foram utilizados 5 camundongos *Balb/C* machos de 60 dias de idade e massa corporal entre 25 e 30 g, obtidos do Biotério Central da UFV. A contenção dos animais foi feita em gaiolas de polipropileno (50 x 40 x 30 cm) com maravalha. Os animais foram alimentados com ração *labina* específica para roedores e água *ad libitum*. Foram mantidos em ambiente com ciclo de foto período de 12 h e temperatura controlada de (20 à 24 °C). O protocolo experimental seguiu os princípios éticos da experimentação animal, tendo sido submetido à Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV aprovado de acordo com certificado de número de processo 37/2023.

Para remoção cirúrgica de fígado, rim, coração, cérebro e sangue os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, a dissecação foi feita com auxílio de um bisturi e os órgãos foram removidos de maneira imediata. Após a eutanásia as carcaças foram recolhidas pela Divisão de Gerenciamento de Resíduos (DGR) da Universidade Federal de Viçosa para destino adequado.

4.2 Preparo de amostras

4.2.1 Tecidos

Amostras de 100 mg de cada órgão foram homogeneizadas em 1 mL de solução tampão fosfato gelado, pH 7,4, 50mM com auxílio de moinho de esferas Tissuelyser II® (QUIAGEN; Hilden, Alemanha). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 5000 por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado para análises posteriores. A partir de cada homogenato foram feitas 10 diluições, utilizando princípio de diluição seriada, portanto as amostras foram diluídas de 2 à 1024 vezes.

4.2.2 Sangue total

Foram coletados por meio de punção cardíaca aproximadamente 1 mL de sangue de cada camundongo em tubos tipo eppendorf, as análises foram feitas no mesmo dia para conservar o caráter fresco das amostras. Parte das amostras de sangue foram hemolisadas manualmente para fins de comparação, através do uso de *beads* de metal e agitador manual do tipo vórtex por 30 segundos, 60 segundos e 90 segundos para simular diferentes graus de hemólise. Para obter hemólise total das hemácias 1 µL de sangue total foi adicionado a 100 µL de tampão fosfato e partir dessa amostra foram feitas diluições de 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 vezes.

4.2.3 Plasma

As amostras de sangue total foram coletadas e processadas sob rigor técnico para prevenir hemólise, após o procedimento de coleta. As amostras foram centrifugadas em baixa rotação, 1000 rpm por 10 minutos a fim da separação do plasma e armazenada à - 20 °C para análises futuras.

4.3 Ensaio de catalase

4.3.1 Padronização e estabilidade dos reagentes

A solução de H₂O₂ foi preparada na concentração de 20 mmol/L em tampão fosfato, de 50 mM, pH 7,4 e posteriormente padronizada com auxílio de espectrofotômetro. A concentração da solução padrão de H₂O₂ foi corrigida em relação a absorvância à 240 nm e coeficiente de extinção molar com auxílio de espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10 S UV-Vis). As concentrações foram corrigidas de acordo com a seguinte fórmula (Equação 10)

$$\text{Concentração em mol/L} = \frac{\text{Abs } 240\text{nm}}{43,6 \cdot 1} \quad (10)$$

A solução de parada contendo molibdato de sódio foi preparada na concentração de 40 mmol/L em tampão fosfato, de 50 mM, pH 7,4 contendo 40%

de isopropanol a fim de diminuir a tensão superficial e eliminar interferências no caminho óptico da leitura espectrofotométrica como bolhas geradas na reação.

Afim de analisar a estabilidade dos reagentes foram realizadas medidas das absorvâncias dos mesmos em intervalos nos intervalos de 0h, 4h, 8h, 24h, 48h, 72h e 96h armazenados em temperatura ambiente.

4.3.2 Metodologia do ensaio de catalase

O ensaio de atividade de catalase foi executado utilizando microplaca de 96 poços. Em cada poço, foi adicionado 5 μ L de amostra seguidos de 95 μ L de substrato (H_2O_2 à 20 mmol/L em tampão fosfato de 50 mM, pH 7,4), após o tempo de reação de 3 minutos, foram adicionados 100 μ L de molibdato de sódio à 40 mmol/L em 40 % de isopropanol.

Para preparo do branco adicionou-se 5 μ L de amostra, 95 μ L de tampão fosfato de 50 mM, pH 7,4 no lugar do substrato e 100 μ L de molibdato de sódio. Para construção da curva padrão, foram adicionados 100 μ L de tampão fosfato de 50 mM, pH 7,4 na primeira coluna da microplaca, nos dois primeiros poços foram acrescentados de 100 μ L de substrato e do segundo poço em diante procedeu-se uma diluição seriada onde cada poço foi homogeneizado 10 vezes. Em seguida, todos os poços da primeira coluna, destinados à curva padrão foram adicionados de 100 μ L de molibdato 40 mM. Em seguida, a placa foi submetida à um leitor de placas (Thermo Scientific Multiskan TM GO) para leitura à 374 nm. Destaca-se a importância das leituras da curva e das amostras ser realizadas simultaneamente, a fim de evitar interferências de erros sistemáticos.

A concentração de peróxido de hidrogênio restante em cada poço é determinada através da correlação entre a absorvância dos poços e a concentração conhecida de cada ponto da curva padrão, e a atividade enzimática é calculada através da concentração inicial de peróxido de hidrogênio (solução de substrato preparada e subtraída da concentração final (a encontrada no poço ao fim dos 3 minutos) multiplicado pelo volume total da reação (V_t) dividido pelo volume de amostra (V_a) utilizado e tempo de análise (3 minutos). Sendo a atividade enzimática expressa em unidades de CAT por mL de amostra

(U/mL), obedecendo a seguinte fórmula (Equação 11) ou para amostras de tecidos o valor obtido de U/mL deve ser normalizado dividindo-o pelo miligrama de proteína total presente na amostra.

$$U/mL = \frac{(20 - X)}{3} \times \frac{Vt}{Va} \quad (11)$$

4.3.3 Precisão, repetibilidade e reprodutibilidade

Para analisar a precisão do método, foi feita uma regressão linear entre os valores de absorbância obtidos na microplaca de 96 poços, à 374 nm que correspondem a formação do peroxocomplexo de molibdênio com H₂O₂ de cor amarelada. Portanto, foi feita uma diluição seriada partindo de uma solução mãe (20 mM) padronizada através de correção com coeficiente de extinção molar e leitura à 240nm (absorbância de H₂O₂). Na curva de regressão linear, o peróxido hidrogênio foi adicionado em igual proporção de molibdato de sódio (mmol/L em tampão fosfato, de 50 mM, pH 7,4 e 40% de isopropranol) para análise da correlação positiva entre aumento da concentração de H₂O₂, e aumento da absorbância à 374 nm gerada pelo complexo com molibdato.

Para análise de repetibilidade da metodologia proposta, foram preparadas 3 alíquotas de diferentes amostras de fígado, a fim de representar as amostras de tecido e de sangue total dentro das respectivas faixas de diluição adequadas para análise e foram feitas 30 repetições de cada uma das 3 amostras de fígado e 3 amostras de sangue total em diferentes concentrações. Tal análise visou observar a variação entre os resultados obtidos para uma mesma concentração em diferentes momentos da análise no mesmo lote com erros sistemáticos referentes à manipulação, materiais e equipamentos. Para determinar a repetibilidade foram calculados os DP e CV.

Para análise de reprodutibilidade foram preparadas 3 alíquotas de amostras de fígado em 3 diferentes concentrações e de sangue total dentro das respectivas faixas de diluição adequadas. Foram feitas 30 repetições de cada uma das 3 amostras de tecido e 3 amostras de sangue total em diferentes concentrações durante 3 dias consecutivos. Tal análise visou observar a

variação entre os resultados obtidos para uma mesma concentração em diferentes lotes de análise com erros sistemáticos referentes à manipulação, materiais e o acréscimo de diferentes soluções padrão preparadas para cada dia assim como tempo de congelamento. Para determinar a repetibilidade foram calculados os DP e CV.

4.4 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Para isso, 10 μ L das amostras correspondentes aos homogenatos de tecidos foram acrescidos de 190 μ L de reagente de Bradford e após 10 minutos as microplacas foram submetidas à leitura em 595 nm em leitor de placas (Thermo Scientific-Multiskan TM GO). A curva padrão segue o mesmo protocolo das amostras, no entanto, no lugar de 10 μ L de amostra foram utilizadas soluções de albumina de soro bovino (BSA) de 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,0312 mg/mL; 0,0156 mg/mL diluídos em tampão fosfato de 50 mM, pH 7,4.

4.5 Análises estatísticas

A distribuição dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o programa GraphPad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram realizados em triplicata e expressos como médias \pm desvios-padrão da média. Os dados foram submetidos a uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. A significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização do ensaio de atividade enzimática

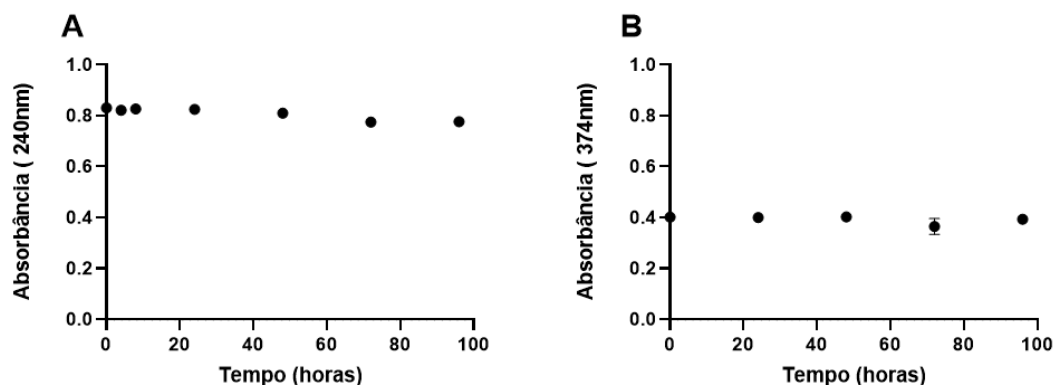
5.1.1 Estabilidade dos reagentes

Com o intuito de otimizar o ensaio de catalase decidiu-se padronizar o ensaio para um formato de alto rendimento (High-Throughput Screening - HTS) passando o ensaio de cubetas de quartzo para microplaca de 96 poços alterando a proporção dos reagentes. Dessa forma, também se diminuiu a quantidade de amostra necessária. No protocolo proposto por Góth, utilizava-se 0,2 mL de soro, 1 mL de substrato e 1 mL de molibdato de amônio. Estas quantidades foram substituídas para 5 μ L de amostra (tecido ou soro), 95 μ L de substrato e 100 μ L de molibdato. Alteraram-se também as concentrações do substrato para aproximadamente 20 mmol/L e aumentamos a concentração do reagente de complexação para 40 mmol/L de modo a garantir complexação completa do H₂O₂ remanescente.

Além disso, o reagente molibdato de amônio após algumas horas de preparo apresentava perfil de precipitação do sal no fundo das vidrarias, dessa forma, foi optou-se pela substituição por molibdato de sódio que possui maior coeficiente de solubilidade em temperatura ambiente e não apresentou o mesmo perfil.

Para aumentar a precisão do protocolo, foram testadas as estabilidades do substrato e molibdato de sódio ao longo de 96 horas (Figura 1).

Figura 1 – Estabilidade dos reagentes críticos do ensaio em temperatura ambiente



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: (A) Estabilidade da solução de peróxido de hidrogênio (B) Estabilidade da solução de molibdato de sódio demonstrados pelos valores de absorbância nos comprimentos de onda de 240 nanômetros e 374 nanômetros respectivamente, coletados das mesmas soluções de peróxido de hidrogênio e molibdato de sódio em 0h, 4h, 8h, 24h, 48h, 72h e 96h.

Pode-se observar um ligeiro decaimento da concentração de peróxido de hidrogênio da solução 24h a partir da primeira leitura. Isso demonstra a necessidade do preparo da solução de substrato uma vez a cada 24h horas a fim de garantir a concentração obtida no preparo original. Também foi testada a estabilidade do reagente da solução de parada, molibdato de sódio ao longo do tempo. Observa-se um perfil mais estável da solução de parada molibdato de sódio, uma vez que, mesmo após 96 horas, manteve a capacidade de complexação de H_2O_2 . Este perfil demonstra a possibilidade de armazenamento desta solução na rotina laboratorial e a praticidade de uso. Este resultado fortalece o potencial desta otimização ser utilizada em futuras automatizações, aumentando ainda mais a frequência analítica e adequando-se a uma rotina laboratorial extensa.

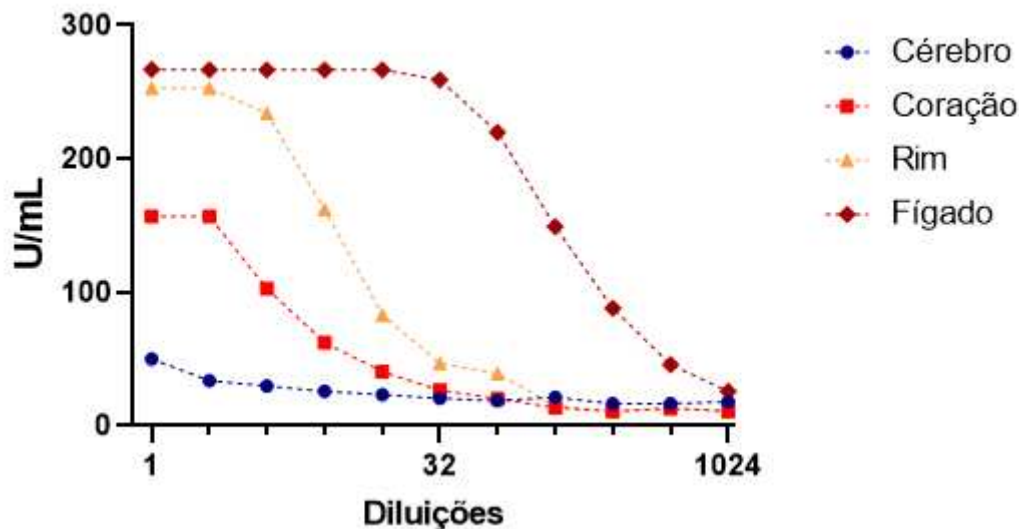
5.2 Atividade de Catalase

5.2.1 Atividade de catalase em tecidos

Em homogenatos de tecidos com altos níveis de catalase, por possuírem uma concentração muito elevada da enzima em questão, em 3 minutos da reação, todo o peróxido de hidrogênio da solução de substrato é consumido, resultando em valores saturados de U/mL que impedem comparações entre amostras diferentes. Faz-se necessária então a diluição desses homogenatos com o objetivo de diminuir a concentração de catalase das amostras e obter assim valores de atividade enzimática capazes de serem encaixados em parâmetros de comparação. Igualmente relevante para confiabilidade dos resultados, é obter uma faixa de proteínas por miligrama de amostra que em um gráfico de U/mL represente a atividade enzimática da catalase contemplando uma faixa linear de atividade.

Para tal fim, foram preparadas diluições seriadas partindo do homogenato para 2, 4, 8, 16 até 1024 vezes. Além da avaliação da atividade de catalase também foram medidos os conteúdos de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Afim de obter uma faixa de conteúdo de proteínas totais das amostras que fosse compatível com a faixa de linearidade de atividade enzimática, podendo dessa forma estipular uma faixa segura de trabalho com maior precisão dos dados. Como os órgãos possuem concentrações características de catalase observaram-se padrões diferentes nas diluições (Figura 2).

Figura 2 – Atividade de catalase de diferentes órgãos



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Os diferentes perfis de atividade de catalase em diluições de 1 a 1024 vezes em tecidos, representados pelos dados relativos à unidade de atividade enzimática (U) por mL de homogenato de fígado (losango), rim (triângulo) coração (quadrado) e cérebro (círculos).

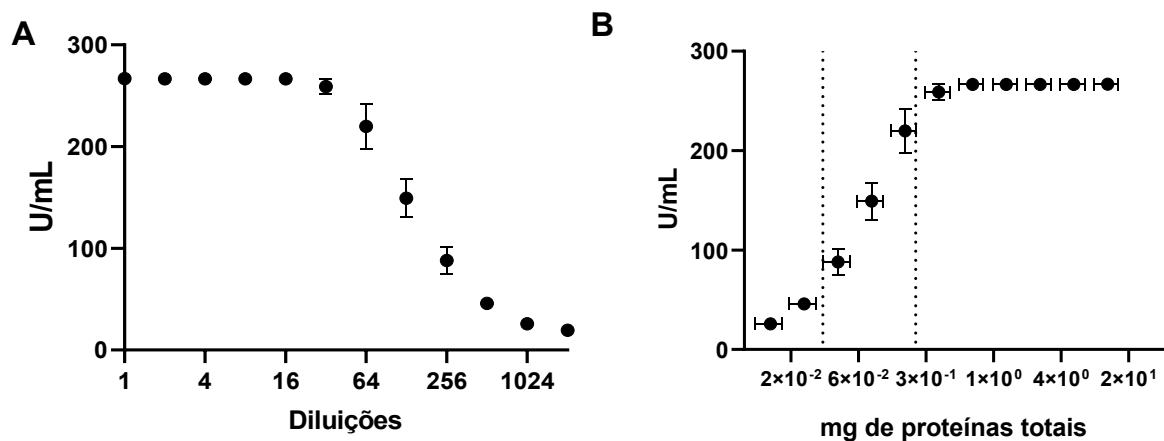
Pode-se observar que os órgãos possuem diferentes concentrações de catalase, sendo o platô observado nas primeiras diluições referente a valores máximos de atividade de catalase nestes órgãos deste modelo animal. À medida que o coeficiente de diluição aumenta, observa-se um decaimento da atividade enzimática até próximo de zero referente ao decaimento da concentração de enzima por mL de homogenato. Cada órgão segue um padrão, o fígado apresenta maior atividade entre todos os avaliados. Este tecido, somente atinge valores de atividade capazes de serem encaixados em parâmetros de comparação com outras amostras semelhantes em torno da 32ª diluição, quando entra em uma linearidade de atividade enzimática. O rim e coração apresentaram homogenatos também ricos em catalase porém com faixa de linearidade logo após a 2ª diluição. Enquanto, o cérebro níveis baixos de atividade enzimática não devendo ser diluído. A fim de aumentar a precisão e aplicabilidade desta otimização para outros tecidos e outros modelos animais, foram quantificados os valores de concentração de proteína das amostras em cada coeficiente de

diluição. Dessa forma, tornando a técnica mais precisa, se o ensaio for aplicado em amostras dentro da faixa de proteínas que corresponde a faixa de linearidade de atividade enzimática.

- **Fígado**

Entre todas as amostras de tecidos analisadas, o homogenato de fígado apresentou as maiores taxas de atividade de catalase. Isso deve-se tanto a sua alta atividade metabólica como ao seu papel de biotransformador de xenobióticos, o que o torna um órgão especialmente exposto à EROS (Allameh et al., 2023). Portanto, devendo ser o detentor de maior concentração de catalase (Pereira et al., 2023; Sani et al., 2006).

Figura 3 – Perfil de atividade de catalase no fígado



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: (A) Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de fígado (B) Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de fígado no eixo Y e miligramas de proteínas totais no eixo X com faixa de linearidade delimitada por linhas tracejadas.

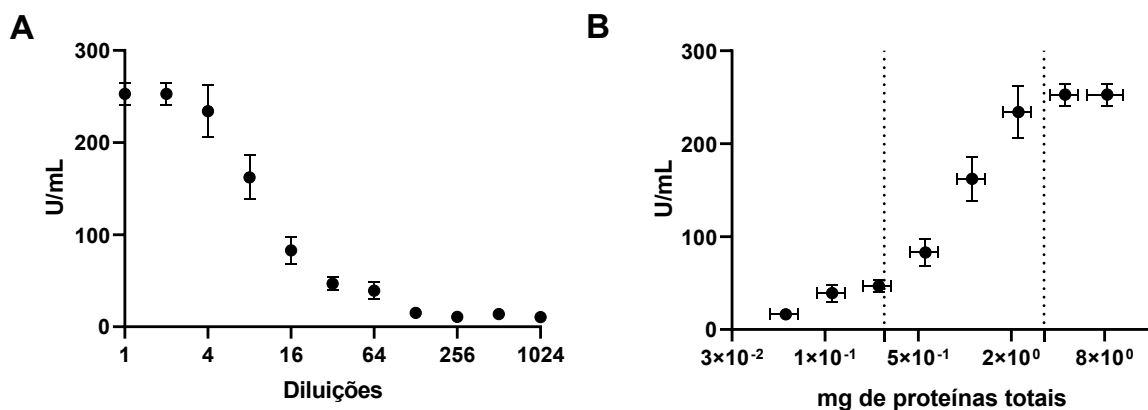
A atividade de catalase do fígado apresentou linearidade entre as diluições de 64 vezes e 256 vezes (Figura 3A). Com os valores de 88,12 e 219,8 U/mL de catalase. Quando convertidos os valores da escala de diluições para concentração de proteínas totais, observa-se que esta faixa de linearidade está

localizada entre concentrações de 0,04 e 0,16 mg de proteína por mL de homogenato da amostra (Figura 3B). Sendo assim, uma faixa de diluições de trabalho segura e precisa, demonstrou ser aquela apresentando resultados em torno de 1373 U/mg e 2200 U/mg para tecidos hepáticos.

- **Rim**

Em segundo lugar após as amostras de fígado, o rim foi o órgão que apresentou maior atividade de catalase. Devido a sua função de filtragem os glomérulos renais são constantemente expostos à estresse oxidativo causado por respostas inflamatórias contra exocitoses de outros órgãos e recirculação de compostos tóxicos (Sani et al., 2006; Pereira et al., 2023).

Figura 4 – Perfil de atividade de catalase no rim



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: (A) Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de rim (B) Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de rim no eixo Y e miligramas de proteínas totais no eixo X com faixa de linearidade delimitada por linhas tracejadas.

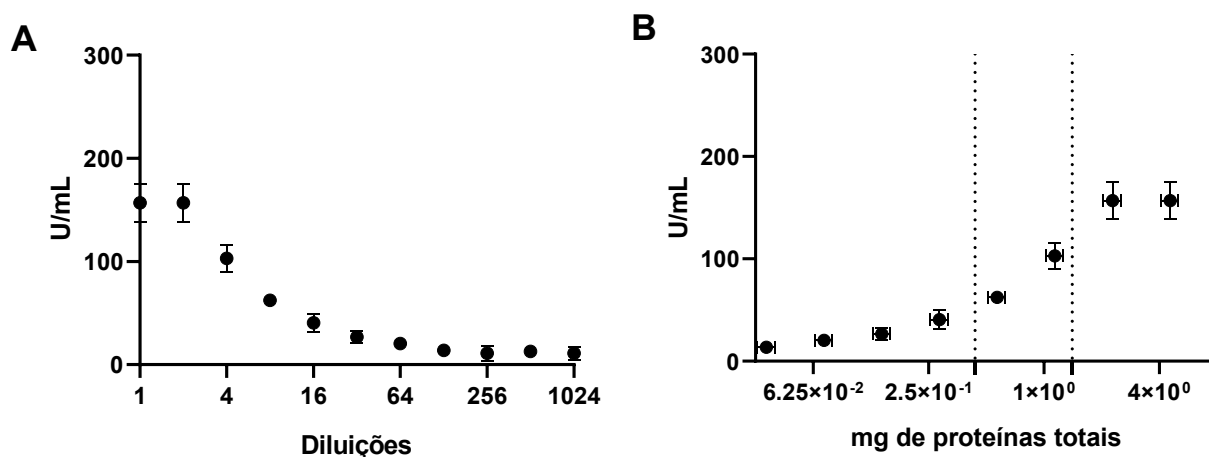
A atividade de catalase do rim apresentou linearidade entre as diluições de 4 vezes e 16 vezes (Figura 4A). Com os valores de 88,03 e 234,18 U/mL de catalase. Quando convertidos os valores da escala de diluições para concentração de proteínas totais, observa-se que esta faixa de linearidade está

localizada entre concentrações de 0,55 e 2,22 mg de proteína por mL de homogenato da amostra (Figura 4B). Sendo assim, uma faixa de diluições de trabalho segura e precisa é a que apresenta resultados entre 105,48 U/mg e 160,05 U/mg para tecidos renais.

- **Coração**

Logo após as amostras de fígado e de rim, as amostras de coração também apresentaram atividade considerável de catalase, porém com menor saturação da atividade enzimática. Esperava-se uma atividade quantificável de catalase uma vez que esta enzima exerce papel antioxidante protetor em diversas vias de estresse oxidativo em que este órgão é exposto. (Dieterich et al., 2000; Tsutsui et al., 2011).

Figura 5 – Perfil de atividade de catalase no coração



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: (A) Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de coração (B) Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de coração no eixo Y e miligramas de proteínas totais no eixo X com faixa de linearidade delimitada por linhas tracejadas.

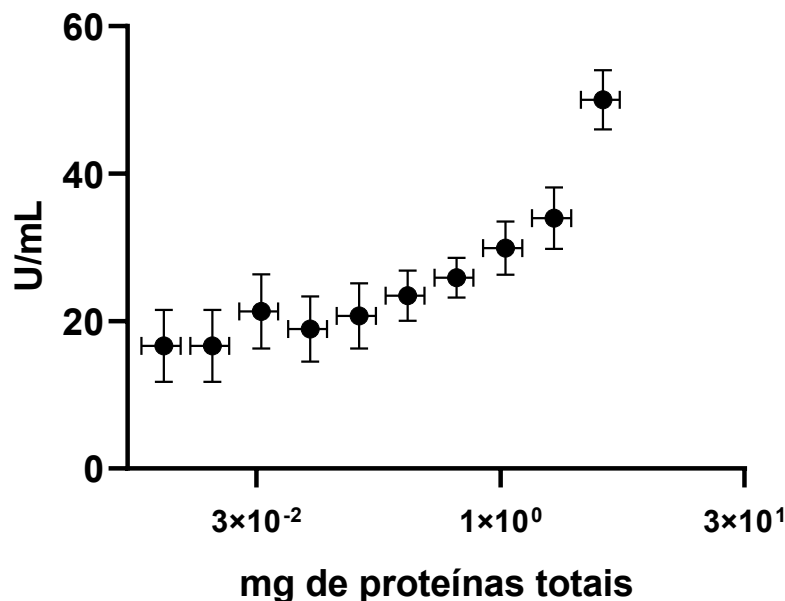
A atividade de catalase do coração apresentou linearidade entre as diluições de 4 vezes e 8 vezes (Figura 5A). Com os valores de 66,48 e 102,95 U/mL de catalase. Quando convertidos os valores da escala de diluições para concentração de proteínas totais, observa-se que esta faixa de linearidade está

localizada entre concentrações de 0,69 e 1,14 mg de proteína por mL de homogenato da amostra (Figura 5B). Adicionados aos desvios padrões (de 0,13 e 0,26) uma faixa de diluições de trabalho segura e precisa, apresentará resultados entre 90,30 - 96,34 U/mg para tecidos cardíacos.

- **Cérebro**

Como o esperado entre todos os órgãos, o cérebro apresentou menor atividade de catalase. Sabe-se que apesar das diversas exposições oxidativas que este órgão sofre, é um órgão com baixa e controlada atividade de catalase (Sani et al., 2006).

Figura 6 – Atividade de catalase no cérebro.



Fonte: Elaboração própria

Legenda: Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de cérebro no eixo Y e miligramas de proteínas totais no eixo X.

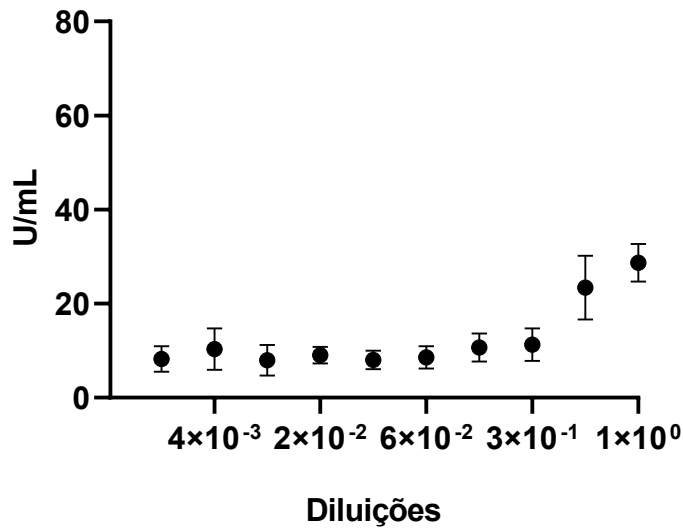
A atividade de catalase no cérebro se mostrou basal e com decaimento brusco logo após a primeira diluição, o que demonstra a impossibilidade do preparo de diluições para análises deste tipo de tecido seguindo o protocolo de

preparo de homogenato dos outros órgãos. Portanto, com a utilização da metodologia apresentada neste trabalho, o homogenato não deve ser diluído, exigindo uma concentração maior do tecido para preparo do homogenato. A amostra de cérebro apresentou unidade de atividade enzimática neste modelo animal de 50,025 U/mL e portanto apresenta valores de normalidade em torno de 11,6 U/mg (Figura 6).

5.2.2 Atividade de Catalase em sangue total, soro não hemolisado e soro hemolisado

No sangue circulante, a maior parte a atividade de catalase vem de hemácias ou de proteínas e vesículas liberadas (Grilo et al., 2020; Margaritelis et al., 2015). A atividade de catalase no soro é normalmente baixa. Desta forma seguindo a metodologia proposta, assim como os homogenatos de cérebro, são amostras que não devem ser diluídas. As amostras de soro não hemolisado apresentaram valores de normalidade em torno de 30 U/mL (Figura 7)

Figura 7 - Atividade de catalase em soro não hemolisado

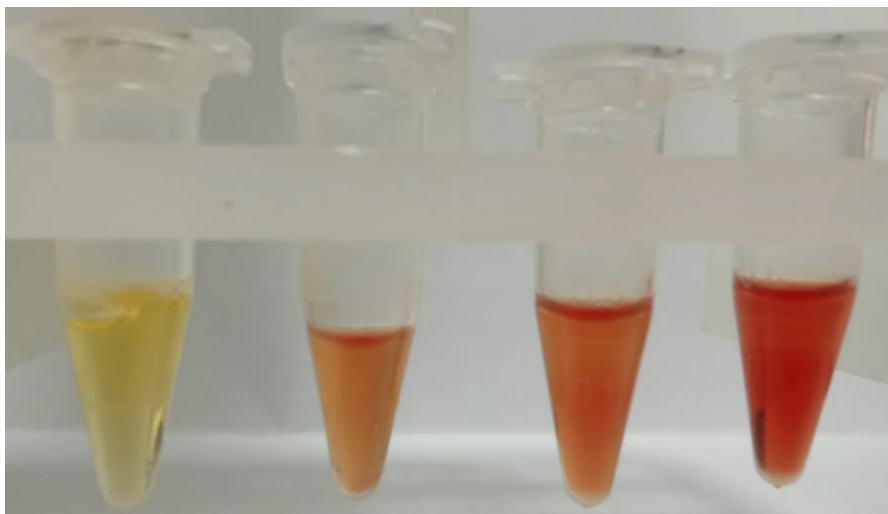


Fonte: Elaboração própria.

Os resultados presentes na literatura, dos testes de catalase em amostras de soro demonstram o grande potencial da catalase como biomarcador no sangue/plasma ou potencial veículo de terapias (Didžiapetriene et al., 2014b; Góth et al., 2015; Kim; Jung; Kim, 2024; Margaritelis et al., 2015; Takahara, 1951; Takemoto et al., 2009). No entanto, os resultados são muito heterogêneos demonstrando as limitações da utilidade clínica deste tipo de amostra, uma vez que a contaminação por hemólise é um grande interferente. A presença de contaminação por hemólise, lise de hemácias, no soro pode resultar em valores superestimados que atrapalham a análise crítica dos resultados (Grilo et al., 2020).

Afim de analisar os efeitos da hemólise nos valores obtidos de atividade de catalase, foram preparadas quatro amostras diferentes de soro, uma com rigor metodológico para garantir nenhum grau de hemólise. As outras três amostras sofreram forte agitação na presença de *beads* de metal, pelos tempos de 30, 60 e 90 segundos a fim de mimetizar três graus de hemólise, um mais brando (grau I), um médio (grau II), e um mais elevado (grau III) (Figura 8).

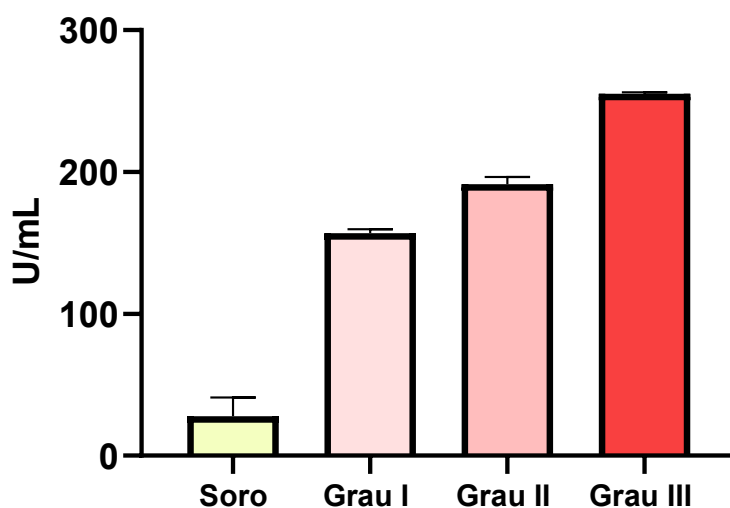
Figura 8 – Diferença de coloração de amostras de soro hemolisadas e não hemolisadas



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Da direita para esquerda, amostras de soro não hemolisado, soro em grau I, grau II e grau III de hemólise.

Figura 9 - Valores de atividade de catalase obtidos do plasma não hemolisado e com hemólises de grau I, II e III.

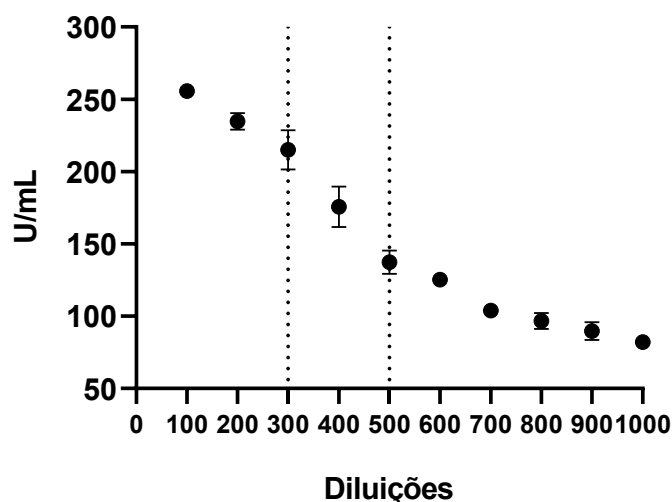


Fonte: Elaboração própria.

Observa-se que a hemólise superestima a atividade de catalase nas amostras de plasma, e induz ao erro as análises obtidas a partir destes resultados. O soro não hemolisado apresentou atividade de catalase de 31,08 U/mL, e os graus de hemólise I, II e III apresentaram respectivamente 156,81; 191,39; 255,22. Portanto, a presença de hemólise tão comum no cotidiano laboratorial pode superestimar entre 4 à 8 vezes o valor real de atividade enzimática.

Tendo em vista, o objetivo de solucionar este interferente. Este estudo propõe o uso de sangue total como um novo tipo de amostra. Uma vez que a concentração de hemácias no sangue possui valores de normalidade bem estabelecidos a hemólise total das amostras e diluição correta é uma forma viável de eliminar este erro pré-clínico. Dessa forma, seguindo um padrão seguro de diluições é possível medir a atividade total de catalase e suas alterações no sangue, e elimina-se o erro recorrente dos diferentes graus de hemólise que a amostra de plasma ou soro podem sofrer, no momento da coleta, transporte e armazenamento.

Figura 10 - Atividade de catalase em sangue total



Fonte: Elaboração própria.

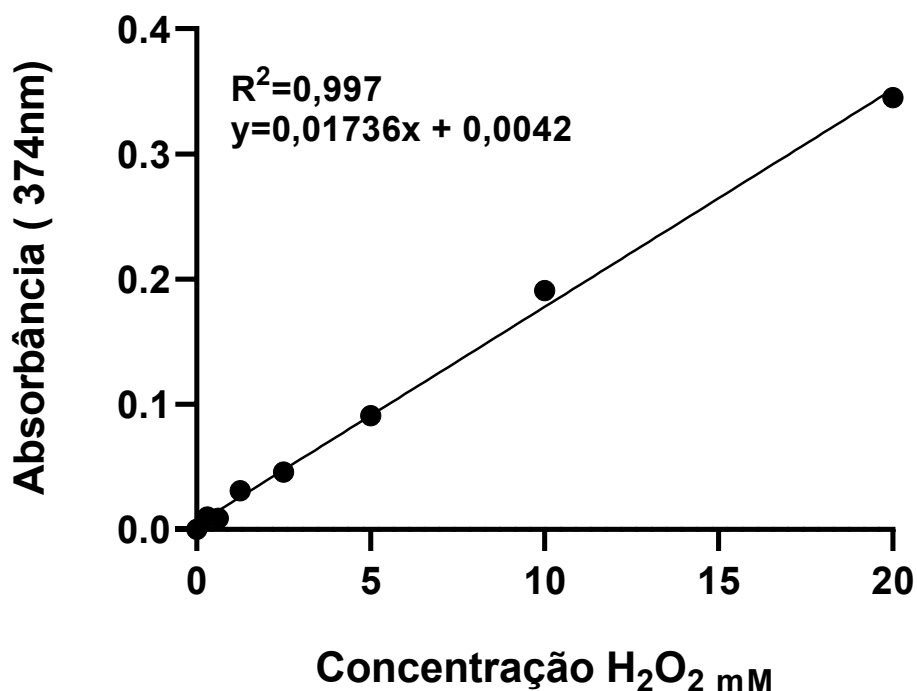
Legenda: Unidade de atividade enzimática por mL de amostras de sangue total (totalmente hemolisadas por osmose) com faixa de linearidade limitada por linhas tracejadas.

Para tal fim, preparamos diluições de 100 à 1000 vezes afim de determinar uma faixa com homogeneidade de valores de atividade de catalase e segura para análises. Observou-se que uma faixa recomendável de trabalho está com amostras diluídas entre 300 e 500 vezes, apresentando 137,28 e 215,03 U/mL respectivamente (Figura 10). Nesta faixa de diluições não se apresentam valores saturados de atividade enzimática e nem densidade de resultados semelhantes como é observado nas diluições de maiores coeficientes.

5.3 Precisão, repetibilidade e reprodutibilidade

Afim de medir a precisão deste método foi feita uma regressão linear entre os valores de absorvância obtidos na microplaca de 96 poços à 374 nm e diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio complexados com molibdato de sódio. Para tal fim, foi feita uma diluição seriada partindo de uma solução mãe (20 mM) e verificada através de correção com coeficiente de extinção molar e leitura à 240nm. O peróxido hidrogênio foi adicionado em igual proporção de molibdato de sódio afim da formação de complexo cuja absorvância se encontra em 374 nm. Obteve-se uma curva com coeficiente de correlação (R^2) de 0,997 (Figura 11).

Figura 11 - Regressão Linear entre concentração de peróxido de hidrogênio e absorvância à 374 nm



Fonte: Elaboração própria.

Correlacionando valores de concentrações de peróxido de hidrogênio crescentes com seus respectivos valores de absorbância à 374 nm, obteve-se a curva descrita com *slope* de 0,017 e coeficiente linear de 0,0042. Observou-se um valor de coeficiente de correlação de 0,997, este alto valor de correlação confere confiabilidade na metodologia proposta em microplaca de 96 poços e demonstra precisão no cálculo de concentração a partir dos valores de absorbância do complexo peróxido de hidrogênio + molibdato de sódio.

Para avaliar a repetibilidade deste método repetiu-se o ensaio 30 vezes com 3 amostras diferentes de fígado e sangue total e foram obtidos valores de CV e DP variando entre 0,6 e 1 para amostras de fígado e valores de CV entre 0,08 e 2 e DP entre 0,3 e 1 para sangue total (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Repetibilidade para fígado

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
--	-----------	-----------	-----------

Média (U/mL)	119,99	177,83	135,26
DP (U/mL)	0,606	0,971	1,01
CV %	0,047	0,113	0,086

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Média, desvio padrão e coeficiente de variação de 3 amostras distintas de homogenatos de fígado em 30 repetições. DP (desvio padrão), CV (coeficiente de variação) e U/mL (Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de fígado).

Tabela 3 - Repetibilidade para sangue total

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Média (U/mL)	49,11	25,15	36,28
DP (U/mL)	1,607	0,479	0,347
CV %	0,088	0,239	0,018

Fonte: Elaboração própria

Legenda: Média, desvio padrão e coeficiente de variação de 3 amostras distintas de sangue total em 30 repetições. DP (desvio padrão), CV (coeficiente de variação) e U/mL (Unidade de atividade enzimática por mL de sangue total).

Os baixos valores de coeficiente de variação e desvio padrão demonstram a reprodutibilidade do método e confiabilidade nos resultados. Além de reforçar a estabilidade dos reagentes relatada anteriormente.

Por fim, para avaliar a reprodutibilidade repetiu-se o ensaio 30 vezes em 3 amostras diferentes de fígado e sangue total em 3 dias diferentes. Foram obtidos valores de DP e CV entre 0,5 e 1 e 0,03 e 0,1 respectivamente para fígado. Enquanto para amostras de sangue total valores de DP e CV entre 0,5 e 1 e 0,03 e 0,08 respectivamente (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Reprodutibilidade para fígado.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Reprodutibilidade
Média (U/mL)	134,67	141,27	100,87	125,605
DP (U/mL)	1,348	1,041	0,517	17,69
CV %	0,117	0,096	0,036	0,1408

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Média, desvio padrão e coeficiente de variação de uma amostra de homogenato de fígado em 30 repetições, durante 3 dias consecutivos. DP (desvio padrão), CV (coeficiente de variação) e U/mL (Unidade de atividade enzimática por mL de homogenato de fígado).

Tabela 5 - Reprodutibilidade para sangue total

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Reprodutibilidade
Média (U/mL)	100,87	99,62	113,33	104,610
DP (U/mL)	0,517	1,20	0,606	6,188
CV %	0,037	0,086	0,047	0,059

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Média, desvio padrão e coeficiente de variação de uma amostra de sangue total em 30 repetições, durante 3 dias consecutivos. DP (desvio padrão), CV (coeficiente de variação) e U/mL (Unidade de atividade enzimática por mL de sangue total).

Estes valores baixos de desvio padrão e coeficiente de variação demonstram a precisão e exatidão da técnica tanto intra-ensaio quanto entre ensaios. Reforçando seu potencial para quantificação de atividade enzimática em outros tecidos e /ou outros modelos animais. Além disso, a alta estabilidade dos reagentes críticos deste ensaio, se padronizados como este estudo propõe podem ser utilizados em futuras automações, aumentando ainda mais a frequência analítica desta enzima no cotidiano laboratorial.

6.CONCLUSÃO

A metodologia nova proposta neste estudo apresentou alto coeficiente de correlação, 0,997 para ensaio em microplaca de 96 poços. Além disso, também apresentou bons parâmetros de exatidão e precisão para reprodutibilidade e repetibilidade. Estes parâmetros somados da alta estabilidade dos reagentes permite futuras automatizações e aplicações desta otimização para quantificação em outros tipos de tecidos e modelos animais. Portanto, a aprimoração do método se mostrou eficaz sendo preciso, sensível, rápido e de baixo custo e a padronização dos diferentes tipos de amostras confere maior confiabilidade nos dados. Esta confiabilidade é altamente necessária para qualidade de futuros estudos do papel da catalase em diferentes patologias e seu potencial de utilização como diagnósticos e tratamentos.

Os tecidos apresentaram diferentes níveis de atividade de catalase, cujas faixas seguras de análise estão entre 1373 - 2200 U.mg⁻¹ para fígado, 105,48 - 160,05 U.mg⁻¹ para rim, 90,30 - 96,34 U.mg⁻¹ para coração e entre 137,28 e 215,03 U.mL⁻¹ para amostras de sangue total. Os homogenatos de cérebro e plasma não devem ser diluídos devido seus valores naturalmente reduzidos de atividade de catalase. Amostras de sangue total abrem uma nova gama de possibilidades de ensaios com a possibilidade de medição dos valores totais de catalase e eliminação dos erros advindos de diferentes graus de hemólise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984.
- AHMAD, Sami. Oxidative stress from environmental pollutants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, n. 2, p. 135–157, 1995.
- ALLAMEH, Abdolamir *et al.* **Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. Antioxidants** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2023.
- AMBANI, Lalit M.; VAN WOERT, Melvin H.; MURPHY, Sean. **Brain Peroxidase and Catalase in Parkinson Disease** *Arch Neurol. [S.l.: S.n.]*. Disponível em: <<http://archneur.jamanetwork.com/>>.
- ANWAR, Shehwaz *et al.* **Exploring Therapeutic Potential of Catalase: Strategies in Disease Prevention and Management. Biomolecules** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jun. 2024.
- ARANDA-RIVERA, Ana Karina *et al.* **RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. Oxygen** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 dez. 2022.
- ASATIANI, Nino *et al.* Blood Catalase, Superoxide Dismutase, and Glutathione Peroxidase Activities in Alcohol- and Opioid-Addicted Patients. **Medicina (Lithuania)**, v. 61, n. 2, 1 fev. 2025.
- ATEŞ, Nurcan Aras *et al.* Plasma catalase activity and malondialdehyde level in patients with cataract. **Eye**, v. 18, n. 8, p. 785–788, 2004.
- BAI, Hua *et al.* Mitochondria-derived H₂O₂ triggers liver regeneration via FoxO3a signaling pathway after partial hepatectomy in mice. **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2023.
- BEKDEŞER, Burcu *et al.* Development of a new catalase activity assay for biological samples using optical CUPRAC sensor. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 485–490, 11 nov. 2014.
- BERGER, Johannes *et al.* Peroxisomes in brain development and function. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 5, p. 934–955, 1 maio 2016.
- BERNARD, Jamie J.; GALLO, Richard L.; KRUTMANN, Jean. **Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 1 nov. 2019.
- BONINI, Marcelo G. *et al.* Immunolocalization of hypochlorite-induced, catalase-bound free radical formation in mouse hepatocytes. **Free Radic Biol Med.**, v. 42, p. 530–540, 2007.
- BRAVO, Roberto *et al.* **Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. Journal of Cell Science**, 15 jul. 2011.
- CAI, Weijing *et al.* **Oxidative Stress-Inducing Carbonyl Compounds From Common Foods: Novel Mediators of Cellular Dysfunction** *Molecular Medicine. [S.l.: S.n.]*.
- CHANCE, Britton. Peroxidase Heme Linkages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, p. 153–164, abr. 1952.

- CHEN, Hong *et al.* Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 363, n. 1–2, p. 85–91, abr. 2012.
- COULBAULT, Laurent *et al.* Thiamine et atteintes cérébrales liées à l'alcool : une mise au point. **Revue Alcoologie et Addictologie**, v. 80, mar. 2025.
- DESAGHER, Solange; GLOWINSKI, Jacques; PREMONT, Jo4. **Astrocytes Protect Neurons from Hydrogen Peroxide Toxicity**The Journal of Neuroscience. [S.l.: S.n.].
- DÍAZ, Adelaida *et al.* **Thirty years of heme catalases structural biology**. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 15 set. 2012.
- DIDŽIAPETRIENE, Janina *et al.* Significance of blood serum catalase activity and malondialdehyde level for survival prognosis of ovarian cancer patients. **Medicina (Lithuania)**, v. 50, n. 4, p. 204–208, 2014.
- DIETERICH, Sabine *et al.* **Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart**Circulation. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.circulationaha.org>>.
- DONG, Chencheng *et al.* **A comprehensive review on reactive oxygen species (ROS) in advanced oxidation processes (AOPs)**. **Chemosphere**Elsevier Ltd, , 1 dez. 2022.
- EMMA, Rosalia *et al.* **The Impact of Tobacco Cigarettes, Vaping Products and Tobacco Heating Products on Oxidative Stress**. **Antioxidants**MDPI, , 1 set. 2022.
- FARMAN, Ali A.; HADWAN, Mahmoud Hussein. Simple kinetic method for assessing catalase activity in biological samples. **MethodsX**, v. 8, 1 jan. 2021.
- FUERTES-AGUDO, Marina *et al.* **Advances in Understanding the Role of NRF2 in Liver Pathophysiology and Its Relationship with Hepatic-Specific Cyclooxygenase-2 Expression**. **Antioxidants**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 ago. 2023.
- GALASSO, Marilisa *et al.* **Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer**. **Free Radical Biology and Medicine**Elsevier Inc., , 20 ago. 2021.
- GHAVAMIPOUR, Fahimeh; SAJEDI, Reza H.; KHAJEH, Khosro. A chemiluminescence-based catalase assay using H₂O₂-sensitive CdTe quantum dots. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 8, 1 ago. 2018.
- GLORIEUX, Christophe; CALDERON, Pedro Buc. **Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach**. **Biological Chemistry**Walter de Gruyter GmbH, , 26 set. 2017.
- GÓTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, v. 196, n. 2–3, p. 143–151, 15 fev. 1991.
- GÓTH, L. *et al.* Blood Catalase Activities, Catalase Gene Polymorphisms and Acatlasemia Mutations in Hungarian Patients with Diabetes Mellitus. **Global Journal of Obesity, Diabetes and Metabolic Syndrome**, v. 3, p. 001–005, 2015.
- GÓTH, László; RASS, Péter; PÁY, Anikó. **Catalase Enzyme Mutations and their Association with Diseases**Mol Diagn. [S.l.: S.n.].

- GRILO, Luís F. *et al.* Development of a 96-well based assay for kinetic determination of catalase enzymatic-activity in biological samples. **Toxicology in Vitro**, v. 69, 1 dez. 2020.
- HADWAN, Mahmoud Hussein; ALI, Seenaa kadhum. New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 542, p. 29–33, 1 fev. 2018.
- HARRIS, J. Robin; MARLES-WRIGHT, Jon. Macromolecular Protein Complexes V Structure and Function. *In: Subcellular Biochemistry*. [S.l.: S.n.]. v. 104 p. 33–49.
- HASSIB, Nehal F. *et al.* A novel missense variant in CAT gene causing acatalasemia with gangrenous periodontitis (Takahara's disease). **Archives of Oral Biology**, v. 167, 1 nov. 2024.
- HECK, Diane E. *et al.* UVB light stimulates production of reactive oxygen species: Unexpected role for catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22432–22436, 20 jun. 2003.
- HEIT, Claire *et al.* Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 103, p. 48–56, 1 fev. 2017.
- HUBER, Robert *et al.* **A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes***Biochemistry*. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org>>.
- HWANG, Inah *et al.* Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. **Diabetes**, v. 61, n. 3, p. 728–738, mar. 2012.
- IGNATOWICZ, Ewa *et al.* Exposure to alcohol and tobacco smoke causes oxidative stress in rats. **Abstract: Pharmacological Reports**, v. 65, p. 906–913, 2013.
- JOMOVA, Klaudia *et al.* **Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants**. **Archives of Toxicology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 maio 2024.
- JUNG MIN KIM; HYEONG GEUG KIM; CHANG GUE SO. Tissue-Specific Profiling of Oxidative Stress-Associated Transcriptome in a Healthy Mouse Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, out. 2018.
- KASSMANN, Celia M. **Myelin peroxisomes - Essential organelles for the maintenance of white matter in the nervous system**. **Biochimie** Elsevier B.V., , 2014.
- KAWASAKI, L.; AGUIRRE, J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1434–1440, 2001.
- KIM, Sehwan; JUNG, Un Ju; KIM, Sang Ryong. **Role of Oxidative Stress in Blood–Brain Barrier Disruption and Neurodegenerative Diseases**. **Antioxidants** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 dez. 2024.
- KIRKMAN, H. N.; GALIANO, S.; GAETANI, G. F. The function of catalase-bound NADPH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 2, p. 660–666, 1987.
- KIRKMAN, Henry N.; GAETANI, Gian F. **Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries**. **Trends in Biochemical Sciences**, jan. 2007a.
- KIRKMAN, Henry N.; GAETANI, Gian F. **Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries**. **Trends in Biochemical Sciences**, jan. 2007b.

- KIRKMAN, Henry N.; GAETANIT, Gian F. **Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH (ultrafiltration/human erythrocytes/bovine liver)***Biochemistry*. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org>>.
- KLRAN, Tugba Raika; OTLU, Onder; KARABULUT, Aysun Bay. **Oxidative stress and antioxidants in health and disease**. *Journal of Laboratory Medicine* Walter de Gruyter GmbH, , 1 fev. 2023.
- KOSMALSKI, Marcin *et al.* Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with a Decreased Catalase (CAT) Level, CT Genotypes and the T Allele of the -262 C/T CAT Polymorphism. *Cells*, v. 12, n. 18, 1 set. 2023.
- KRISHNA, Honnur *et al.* A quantitative method for the detection and validation of catalase activity at physiological concentration in human serum, plasma and erythrocytes. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 251, 15 abr. 2021.
- LENI, Zaira; KÜNZI, Lisa; GEISER, Marianne. **Air pollution causing oxidative stress. Current Opinion in Toxicology** Elsevier B.V., , 1 abr. 2020.
- LIN, Anqi *et al.* A Dopamine-Enabled Universal Assay for Catalase and Catalase-Like Nanozymes. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 30, p. 10636–10642, 2 ago. 2022.
- LOWRY, Jessica L. *et al.* Endothelial nitric-oxide synthase activation generates an inducible nitric-oxide synthase-like output of nitric oxide in inflamed endothelium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4174–4193, 8 fev. 2013.
- LUO, Dan; RANDO, Thomas A. The regulation of catalase gene expression in mouse muscle cells is dependent on the CCAAT-binding factor NF-Y. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 2, p. 609–618, 4 abr. 2003.
- LUZZATTO, Lucio; ALLY, Mwashungi; NOTARO, Rosario. Review Series INHERITED ANEMIAS Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **The American Society of Hematology**, v. 136, p. 1225–1240, 10 set. 2020.
- MAEHLY, A. C.; CHANCE, Britton. **The Assay of CATALASES AND PEROXIDASES** METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS. [S.l.: S.n.].
- MAEHLY, A. C.; UFLITH, Britton Chance. **The Assay of CATALASES AND PEROXIDASES** METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS. [S.l.: S.n.].
- MAO, Peizhong *et al.* Mitochondria-targeted catalase reduces abnormal APP processing, amyloid β production and BACE1 in a mouse model of Alzheimer's disease: Implications for neuroprotection and lifespan extension. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 13, p. 2973–2990, jul. 2012.
- MARGARITELIS, Nikos V. *et al.* **Blood reflects tissue oxidative stress: A systematic review**. *Biomarkers* Informa Healthcare, , 1 mar. 2015.
- MARTINS, Susana G. *et al.* **Linking Oxidative Stress and DNA Damage to Changes in the Expression of Extracellular Matrix Components**. *Frontiers in Genetics* Frontiers Media S.A., , 29 jul. 2021.
- MAZAT, Jean Pierre; DEVIN, Anne; RANSAC, Stéphane. **Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain**. *Cellular and Molecular Life Sciences* Springer, , 1 fev. 2020.
- MEDINA-REYES, Estefany I. *et al.* **Food additives containing nanoparticles induce gastrotoxicity, hepatotoxicity and alterations in animal behavior: The unknown role of oxidative stress**. *Food and Chemical Toxicology* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2020.

- MOLDOGAZIEVA, Nurbubu T. *et al.* **Lipid peroxidation: Reactive carbonyl species, protein/DNA adducts, and signaling switches in oxidative stress and cancer.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* Elsevier B.V., , 20 dez. 2023.
- NAKAMURA, Kouichi *et al.* Tissue and Organ Expression of Catalase in Acatalasemic Beagle Dogs. *Exp.Anim.*, 1999.
- NAPOLITANO, Gaetana; FASCIOLO, Gianluca; VENDITTI, Paola. **Mitochondrial management of reactive oxygen species.** *Antioxidants* MDPI, , 1 nov. 2021.
- NDE, Dieudonne Tanue *et al.* Ultrasensitive electrochemical detection of catalase activity using Co@MoS₂/N-doped reduced graphene oxide modified electrode. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 727, 20 dez. 2025.
- NDREPEPA, Gjin. **Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease.** *Clinica Chimica Acta* Elsevier B.V., , 1 jun. 2019.
- NEGREVA, Mariya N. *et al.* Paroxysmal atrial fibrillation: dynamics of the main antioxidant enzymes--superoxide dismutase and catalase. *Folia medica*, v. 56, n. 2, p. 96–101, 2014.
- NELL, Hayley J. *et al.* Targeted Antioxidant, Catalase–SKL, Reduces Beta-Amyloid Toxicity in the Rat Brain. *Brain Pathology*, v. 27, n. 1, p. 86–94, 1 jan. 2017.
- NISTICT~, Giuseppe *et al.* **Original Contribution NGF RESTORES DECREASE IN CATALASE ACTIVITY AND INCREASES SUPEROXIDE DISMUTASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN THE BRAIN OF AGED RATS** *Free Radical Biology & Medicine*. [S.l.: S.n.].
- OGATA, Masana. **Acatalasemia** *Hum Genet*. [S.l.]: Springer-Verlag, 1991.
- OKUNO, Yosuke *et al.* Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR γ -responsive region. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, n. 3, p. 698–704, 15 fev. 2008.
- OYEYEMI O. AJIBADE; LILO CADEN. A comparative analysis of catalase activity in animal and plant tissues collected in Pineville, Rapit Parish, Louisiana, USA. **International Journal of Science and Research Archive**, v. 15, n. 3, p. 982–987, 30 jun. 2025.
- PAGAN, Luana U. *et al.* **The Role of Oxidative Stress in the Aging Heart.** *Antioxidants* MDPI, , 1 fev. 2022.
- PALLER, Mark S. •" **Original Contribution HYDROGEN PEROXIDE AND ISCHEMIC RENAL INJURY: EFFECT OF CATALASE INHIBITION** *Free Radical Biology & Medicine*. [S.l.: S.n.].
- PAVLOVA, Elitsa *et al.* Biomarkers of Oxidative Stress in COVID-19 Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 8, 1 abr. 2025.
- PEREIRA, Francielly Dias *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense in the Heart, Liver, and Kidney of Bat Species with Different Feeding Habits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 22, 1 nov. 2023.
- PUTNAM, Christopher D. *et al.* Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. *Journal Molecular Biology*, v. 296, p. 295–309, 2000.

- QIN M. CHEN; ANTHONY J. MALTAGLIATI. Nrf2 at the Heart of Oxidative Stress and Cardiac Protection. **Physiological Genomics**, v. 50, p. 77–97, 2018.
- QIN, Meng *et al.* An Antioxidant Enzyme Therapeutic for COVID-19. **Advanced Materials**, v. 32, n. 43, 1 out. 2020.
- QIU, Min *et al.* Intersection of the Ubiquitin–Proteasome System with Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 out. 2022.
- QUAN, F. *et al.* Isolation and characterization of the human catalase gene **Nucleic Acids Research**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/14/13/5321/1143999>>.
- QUAN, F. *et al.* Isolation and characterization of the human catalase gene **Nucleic Acids Research**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/14/13/5321/1143999>>.
- RASHEED, Zafar. Therapeutic potentials of catalase: Mechanisms, applications, and future perspectives **International Journal of Health Sciences**. [S.l.: S.n.].
- REDDY, V. Prakash. Oxidative Stress in Health and Disease. **Biomedicine** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 nov. 2023.
- REN, Jun *et al.* Cardiac Overexpression of Antioxidant Catalase Attenuates Aging-Induced Cardiomyocyte Relaxation Dysfunction. **Mech Ageing Dev.**, v. 128, p. 276–285, mar. 2007.
- RICH, Peter R.; MARÉCHAL, Amandine. The mitochondrial respiratory chain. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 1–23, 2010.
- RODRIGO, Ramón *et al.* A randomized controlled trial to prevent post-operative atrial fibrillation by antioxidant reinforcement. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 16, p. 1457–1465, 15 out. 2013.
- SÁNCHEZ-BARACALDO, Patricia; CARDONA, Tanai. On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. **New Phytologist** Blackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2020.
- SANI, Mamane *et al.* Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, n. 3–4, p. 331–337, 2006.
- SCAGLIONE, Christine N.; XU, Qijin; RAMANUJAN, V. Krishnan. Direct measurement of catalase activity in living cells and tissue biopsies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 470, n. 1, p. 192–196, 29 jan. 2016.
- SCHISLER, N. J.; SINGH, S. M. Inheritance and expression of tissue-specific catalase activity during development and aging in mice. **Genome**, v. 29, p. 748–760, out. 1987.
- SEPASI TEHRANI, Hessam; MOOSAVI-MOVAHEDI, Ali Akbar. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2018.
- SHI, Xunlong *et al.* PEGylated human catalase elicits potent therapeutic effects on H1N1 influenza-induced pneumonia in mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 10025–10033, dez. 2013.
- SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 37, p. 5, 2025.

- SINHA, Asru K. Colorimetric assay of catalase. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 389–394, 1 jun. 1972.
- SURADI, Hamidah *et al.* Ambient levels, emission sources and health effect of pm2.5-bound carbonaceous particles and polycyclic aromatic hydrocarbons in the city of Kuala Lumpur, Malaysia. **Atmosphere**, v. 12, n. 5, 2021.
- TAKAHARA, Shigeo. Acatlasemia (Lack of Catalase in Blood) and an Oral Progressive Gangrene. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 27, n. 6, p. 295–301, 1951.
- TAKAHARA, Shigeo. Progressive oral gangrene due to acatalasemia (Colored motion picture). **Laryngoscope**, v. 64, n. 8, p. 685–688, 1954.
- TAKAHASHI, Shinichi. **Neuroprotective function of high glycolytic activity in astrocytes: Common roles in stroke and neurodegenerative diseases.** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 2 jun. 2021.
- TAKEMOTO, Kazunori *et al.* Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan. **Clinica Chimica Acta**, v. 407, n. 1–2, p. 43–46, 3 set. 2009.
- TAKEMOTO, Kazunori *et al.* Insulin Release from the Beta Cells in Acatlasemic Mice Is Highly Susceptible to Alloxan-Induced Oxidative Stress. **Journal of Diabetes Mellitus**, v. 05, n. 02, p. 81–89, 2015.
- TAN, Wei Qi *et al.* Foxo3a inhibits cardiomyocyte hypertrophy through transactivating catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 44, p. 29730–29739, 31 out. 2008.
- TEKE, Mustafa. Development of a new biosensor for determination of catalase activity. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 608–616, 18 ago. 2014.
- TROFIN, Daniela Marilena *et al.* **Oxidative Stress in Brain Function. Antioxidants** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2025.
- TSUTSUI, Hiroyuki; KINUGAWA, Shintaro; MATSUSHIMA, Shouji. Oxidative stress and heart failure. **J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, p. 2181–2190, 2011.
- VAN DER POL, Atze *et al.* **Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future.** **European Journal of Heart Failure** John Wiley and Sons Ltd, , 1 abr. 2019.
- WALTON, Paul A.; PIZZITELLI, Michael. Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. **Frontiers in Physiology**, v. 3 APR, 2012.
- WHITTAKER, James W. **Non-heme manganese catalase - The “other” catalase.** **Archives of Biochemistry and Biophysics** Academic Press Inc., , 15 set. 2012.
- WILSON, D. O.; JOHNSON, P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 1791–1796, 2000.
- YANG, Shuman *et al.* Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase activities and risk of coronary heart disease in generally healthy women: A prospective study. **American Journal of Epidemiology**, v. 180, n. 9, p. 901–908, 1 nov. 2014.
- YANG, Wei; OMAYE, Stanley T. **Air pollutants, oxidative stress and human health.** **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 31 mar. 2009.

- YANG, Yoon Mee; CHO, Ye Eun; HWANG, Seonghwan. **Crosstalk between Oxidative Stress and Inflammatory Liver Injury in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease**. *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, , 1 jan. 2022.
- YI, Chengxue *et al.* Short-Chain Fatty Acids Weaken Ox-LDL-Induced Cell Inflammatory Injury by Inhibiting the NLRP3/Caspase-1 Pathway and Affecting Cellular Metabolism in THP-1 Cells. *Molecules*, v. 27, n. 24, 1 dez. 2022.
- YOSHIOKA, Toshimasa; FOGO, Agnes; BECKMAN, Jeffrey K. Reduced activity of antioxidant enzymes underlies contrast media-induced renal injury in volume depletion. *Kidney International*, v. 41, n. 4, p. 1008–1015, 1992.
- YUAN, Sijie *et al.* An enhanced chemiluminescence hybrids of luminol by sulfonated polyaniline decorated copper-based metal organic frame composite applicable to the measurement of hydrogen peroxide in a wide pH range. *Talanta*, v. 254, 1 mar. 2023.
- YUE, Ruichao *et al.* Activation of PPAR α -catalase pathway reverses alcoholic liver injury via upregulating NAD synthesis and accelerating alcohol clearance. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 174, p. 249–263, 1 out. 2021.
- ZÁMOCKÝ, Marcel; KOLLER, Franz. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 72, p. 19–6, 1999.
- ZHANG, Jiangwei *et al.* A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nature Cell Biology*, v. 15, n. 10, p. 1186–1196, out. 2013.
- ZHANG, You Can *et al.* **Association of total oxidant status, total antioxidant status, and malondialdehyde and catalase levels with psoriasis: a systematic review and meta-analysis**. *Clinical Rheumatology* Springer London, , 1 out. 2019.
- ZHOU, Mingjie *et al.* **A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases** ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. [S.l.: S.n.].
- ZHOU, Zhanxiang; KANG, Y. James. **Cellular and Subcellular Localization of Catalase in the Heart of Transgenic Mice** The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.jhc.org>>.