

Caracterização, Pré-Purificação e Aplicação Analítica da enzima Urease obtida do feijão Guandu (*Cajanus Cajan L. Milsp*)

Leidaiany Pereira dos Santos¹ (IC) *, Oldair Donizeti Leite¹ (PQ), Fernanda Sant' Ana de Souza² (PG), Orlando Fatibello Filho² (PQ). leidaiany.santos@bol.com.br

1 - Universidade Federal da Bahia- ICADS, Barreiras-BA.

2 – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

Palavras Chave: Urease, Fertilizante, Feijão Guandu.

Introdução

A urease (uréia amidohidrolase, EC 3.5.1.5) é uma enzima extensamente estudada, dada sua aplicabilidade na agricultura e na medicina. Esta enzima é utilizada em procedimentos de diagnósticos clínicos, na determinação de uréia em fluidos biológicos, como por exemplo, urina e sangue^{1,2}. No entanto, uma das grandes dificuldades encontradas para o emprego de enzimas em procedimentos analíticos é o seu custo, além da grande maioria não serem produzidas no Brasil. Nesse sentido, esse estudo propõe um método rápido e de baixo custo, para a obtenção de um extrato bruto que contém a enzima urease, a partir do feijão guandu, avaliar as características cinéticas desta enzima com seu substrato bem como um procedimento analítico empregando o extrato enzimático purificado na determinação de uréia em amostras de fertilizantes.

Resultados e Discussão

Inicialmente vários estudos foram conduzidos a fim de se obter uma melhor condição de extração associada à estabilidade da enzima. Analisando os resultados obtidos, verificou-se uma maior atividade enzimática associada a uma maior estabilidade, quando nos procedimentos de extração empregou-se uma solução 0,05 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 6,5. O valor de K_m obtido (segundo Lineweaver-Burk) foi de 170,3 mmol.L⁻¹. Este valor encontra-se dentro de uma faixa de valores de K_m reportados na literatura (3–479 mmol.L⁻¹ dependendo do meio extrator, em geral solução tampão fosfato)^{3,4}. Após os estudos de caracterização da enzima, foram realizados estudos para a pré-purificação da enzima, inicialmente realizando-se a precipitação da enzima com acetona a frio e posteriormente percolando-se o extrato precipitado em coluna cromatográfica (Gel Sephadex). Os resultados obtidos nas etapas de pré-purificação são apresentados na Tabela 1. Após as etapas de purificação da enzima, a solução do extrato pré-purificado foi empregado como fonte de enzima urease na hidrólise da uréia em fertilizantes, conforme a reação 1:

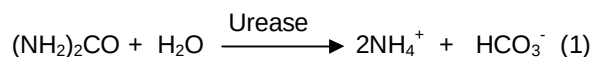


Tabela 1. Etapas de purificação do extrato enzimático de Urease do feijão guandu.

Etapas de Purificação	Proteína total (mg)	U/mg	U totais	Fator Purificação
Extrato Bruto sobrenadante	3007,3	27,6	83122	1,0
Pré-purificação por acetona	710,2	259,1	34021	9,4
Cromatografia em gel	58,6	339,2	946,2	12,3

A quantidade de uréia foi determinada indiretamente, monitorando-se o íon amônio pela reação de Berthelot.

O resultado da análise em fertilizante líquido (n=3) apresentou uma concentração média de uréia de 0,198±0,004g/100 mL de solução de fertilizante.

Conclusões

Os parâmetros cinéticos foram determinados empregando-se a equação de Michaelis-Menten, e de Lineweaver-Burk. Os valores encontrados estão de acordo com os reportados na literatura. Nas etapas de purificação da enzima obteve-se um fator de purificação do extrato de 12 vezes e uma atividade específica de 339,2 U/mg. O extrato enzimático pré-purificado foi empregado com sucesso na determinação de uréia em fertilizantes líquidos.

Agradecimentos

Ao CNPq Proc. 477029/2007.

¹Baldwin, E.A. . “A Natureza da Bioquímica”. Trad., Rio de Janeiro, Ao Livro técnico, 1972, 127p.

²Kempers, A.J.; Kok, C.J.; *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 221, 147.

³Nakamura, M.; Saito, H.; Sugimura, M.; Hirayama, C, *Phytochemistry*, **2000**, 53, 325.

⁴Natarajan, K.R., *J. Chem. Education*, **1995**, 72, 556.