

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
COORDENAÇÃO DO MESTRADO EM EDUCAÇÃO

RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS
DO CERRADO PIAUIENSE NA PREPARAÇÃO DE MATERIAL
DIDÁTICO PARA O ENSINO NAS ÁREAS BIOMÉDICA E QUÍMICA

TERESINA - PI

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
COORDENAÇÃO DO MESTRADO EM EDUCAÇÃO

RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS
DO CERRADO PIAUIENSE NA PREPARAÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO
PARA O ENSINO NAS ÁREAS BIOMÉDICA E QUÍMICA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Educação
da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Educação.

ORIENTADOR: Dr. LUIZ BOTELHO DE ALBUQUERQUE

CO-ORIENTADORES: Dr. LUIZ DE SOUSA SANTOS JÚNIOR

Ms. PAULO HUMBERTO MOREIRA NUNES

TERESINA - PI

O 48u Oliveira, Rita de Cássia Meneses

Utilização da enzima urease de sementes de leguminosas do cerrado piauiense na preparação de material didático para o ensino nas áreas biomédica e química. / Rita de Cássia Meneses Oliveira. _ Teresina, UFPI, 1997.

102p. (Dissertação Mestrado)

1. Enzima _ Plantas. 2. Leguminosas. I. Título.

C.D.D – 581.192 5

UTILIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS
DO CERRADO PIAUIENSE NA PREPARAÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO
PARA O ENSINO NAS ÁREAS BIOMÉDICA E QUÍMICA

RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA

Aprovada em 04/06/1997

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Botelho de Albuquerque (Orientador)

Doutor em Educação

Prof. Dr. Luiz De Sousa Santos Júnior (Co-orientador)

Doutor em Química

Prof^a. Dra. Maria das Graças Medina Arrais (Membro)

Doutora em Botânica

Prof^a. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida (Membro)

Doutora em Farmacologia

TRABALHO REALIZADO NOS DEPARTAMENTOS DE
BIOFÍSICA E FISIOLOGIA - SETORES DE BIOFÍSICA
E NÚCLEO DE PESQUISA EM PLANTAS MEDICINAIS-
E QUÍMICA E CENTRO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Aos meus pais Raimundo e M^a de Jesus,
a meu esposo Elioano, a meu filho Fellipe
e a minhas inesquecíveis avó Andrelina e
sogra Mundica, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Deus, pela experiência vivida, por tudo...
- Aos Profs. Dr. Luiz Botelho Albuquerque, Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior e Mestre Paulo Humberto Moreira Nunes pela orientação, amizade e constantes discussões, meus agradecimentos.

Agradeço ainda:

- À Universidade Federal do Piauí, pela minha liberação para a realização deste curso.
- Ao Departamento de Biofísica e Fisiologia da Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade concedida.
- Aos meus colegas de Departamento, pela participação e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.
- Aos colegas Profs. Maria Rita Santos, José Machado Moita Neto, Silva Lopes, Graça Arrais, Graça Castelo Branco, Alberto Jorge, Fernanda Almeida e Lourdinha Nunes, pela participação, colaboração, discussões e sugestões.
- Aos colegas, professores e funcionários da pós-graduação, aos funcionários dos setores de Biofísica e Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais do Departamento de Biofísica e Fisiologia, em especial aos técnicos de laboratório Benedito Viana e Lúcia Lima e aos colegas Francílio, Sérgio, Brito, Edilene e Eleodoro do Departamento de Química, pela colaboração.
- À coordenação do Curso de Mestrado em Educação.
- Aos meus irmãos, pelo incentivo, confiança e amizade.
- Aos irmãos Ribeiro, pela amizade e propriedade concedida para o levantamento florístico.
- À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu reconhecimento.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas e Quadros.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1-Introdução.....	01
1.1- Leguminosas.....	02
1.2- Cerrado.....	04
1.3- Enzimas.....	05
1.4- Urease.....	09
1.5- Imobilização de Enzimas.....	12
1.5.1- Métodos.....	13
1.5.2- Suportes.....	13
a-Agar-Agar.....	13
b-Sílica Gel.....	14
2- Metodologia.....	16
2.1-Levantamento Florístico.....	18
2.2-Pesquisa de Atividade Ureásica nas Sementes.....	19
2.2.1- Atividade Ureásica.....	19
2.2.2- Extração da Urease e Preparação do Pó Cetônico.....	19

2.2.3- Inibição da Atividade Ureásica por Mercuriais.....	20
2.2.4- Reversão da Inibição da Atividade Ureásica por Mercuriais.....	20
2.3- Caracterização da Urease e do Sistema Sílica/Urease por FTIR.....	21
2.4- Imobilização da Enzima Urease em Suporte Agar-Agar.....	21
2.5- Imobilização da Enzima Urease em Suporte Sílica Gel Funcionalizada com Grupo Amina (NH ₂).....	22
2.6- Adsorção de Íons Metálicos sobre Urease Imobilizada em Sílica Gel.....	23
2.7- Produção de Roteiros Práticos sobre a Aplicação da Urease como Fonte de Material Didático para o Ensino nas Áreas Biomédica e Química	24
3- Resultados.....	26
3.1- Levantamento Florístico.....	26
3.2- Pesquisa de Atividade Ureásica nas Sementes.....	33
3.2.1- Atividade Ureásica.....	33
3.2.2- Extração da Urease e Preparação do Pó Cetônico.....	38
3.2.3- Inibição da Atividade Ureásica por Mercuriais	38
3.2.4- Reversão da Inibição da Atividade Ureásica.....	41
3.3- Caracterização da Urease e do Sistema Sílica/Urease por FTIR.....	45
3.4- Imobilização e Inibição da Enzima Urease em Suporte Agar-Agar.....	47
3.5- Imobilização da Enzima Urease em Suporte Sílica Gel Aminada.....	49
3.6- Adsorção de Íons Metálicos Divalentes sobre Urease Imobilizada em Sílica....	51
3.7- Produção de Roteiros Práticos em Modelos Experimentais para o Ensino.....	55
3.7.1- Roteiros Práticos que envolvem a demonstração de atividade enzimática, especificidade e fatores que contribuem para a diminuição e/ou perda da atividade enzimática.....	56
3.7.2- Roteiros Práticos que envolvem a demonstração de substâncias que	

inibem a atividade enzimática e/ou promovem a reversão da inibição.....	67
3.7.3-Roteiros Práticos que envolvem a demonstração de métodos e técnicas de imobilização de enzimas e suas aplicações.....	74
4-Discussão.....	86
5-Conclusão.....	93
6-Referências Bibliográficas.....	94
ANEXO I : Lista das famílias e espécies presentes na Fazenda Sono – Município de Demerval Lobão - PI.	100

LISTA DE FIGURAS

Figuras 01, 02 e 03: Fazenda Sono - cerrado típico.....	28 a 30
Figura 04: teste de atividade ureásica.....	35
Figura 05: Inibição da atividade ureásica por Timerosal	39
Figura 06: Inibição da atividade ureásica por HgCl ₂	40
Figura 07: Efeito do DTT na reversão da inibição enzimática por mercuriais.....	42
Figura 08: Efeito do DTT na reversão da inibição enzimática por mercuriais em urease imobilizada em agar-agar.....	43
Figura 09: Espectros no infravermelho de sílica pura, sílica aminada e sílica/urease obtidos no espectrofotômetro Bomem - MB 100	46
Figura 10: Imobilização e inibição enzimática por mercuriais.....	48
Figura 11: Espectro no infravermelho de sílica aminada com urease imobilizada - espectrofotômetro Bomem - MB 100 Michelson série FTIR.....	49
Figura 12: Espectro no infravermelho de sílica aminada e sílica/urease comercial - espectrofotômetro	50
Figura 13: Adsorção em Coluna.....	52
Figura 14: Espectro no IV de sílica/urease e sílica/urease/metal	54

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Tabela 01: Lista das espécies de Leguminosas arbóreas presentes na
Fazenda Sono, situada no município de Demerval Lobão-PI.....31
- Tabela 02- Lista das espécies de Leguminosas cujas sementes foram testadas
quanto a presença de atividade ureásica.36
- Tabela 03: Efeito do DTT na reversão da inibição da atividade enzimática.....44
- Quadro 01: Adsorção de CoCl_2 em Urease imobilizada em sílica Gel.....53

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Å	= Angstrom
EDTA	= Ácido etileno diamino tetracético
SDS	= Dodecil sulfato de sódio
SH	= Grupamento Sulfidril
DTT	= Ditiotreitól
NaCl	= Cloreto de sódio
KCl	= Cloreto de potássio
HCl	= Ácido clorídrico
NH ₂	= Grupamento Amina
KBr	= Brometo de potássio
BaCl ₂	= Cloreto de bário
FTIR	= Infravermelho com transformada de Fourier
Sil-NH ₂	= Sílica gel funcionalizada com grupamento amina
N _{sob}	= Número de moles no sobrenadante
N _{ad}	= Número de moles adicionado
T.in	= Tubo inicial ou 1ª amostra
TEGB	= Herbário Graziela Barroso
NPPM	= Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais

RESUMO

Consta este trabalho da pesquisa de atividade ureásica nas sementes de espécies arbóreas de Leguminosas de uma região de cerrado piauiense, e da proposta de utilização da enzima urease extraída das sementes com atividade positiva, em modelos experimentais. A enzima natural, na forma livre e imobilizada, será utilizada na preparação de material didático sob a forma de modelos experimentais, com a finalidade de promover um maior rendimento das atividades docente e discente, como complemento ao ensino teórico nas áreas Biomédica e Química. Com o objetivo de identificar as Leguminosas e investigar a presença de atividade ureásica em suas sementes, foi feito um levantamento florístico de uma área correspondente a 72 hectares em ambiente de cerrado, na Fazenda Sono situada no município de Demerval Lobão - PI, utilizando-se o método do Caminhamento. Este levantamento está apresentado no trabalho em forma de tabelas, constando as referências quanto à família, nome científico, nome vulgar e dados fenológicos. O material coletado está registrado no Herbário Graziela Barroso - TEGB - Universidade Federal do Piauí. Nas tabelas as famílias estão ordenadas segundo o sistema filogenético de Cronquist. No sentido de detectar a presença de atividade ureásica nas sementes das espécies de Leguminosas identificadas, determinou-se qualitativamente tal atividade, fazendo-se a reação de pequena amostra do extrato bruto da semente, com uma solução de uréia, fracamente tamponada a pH 6,7 contendo o indicador ácido-básico vermelho de fenol. As

sementes das espécies com atividade ureásica foram submetidas a processos físico-químicos, para extração da enzima e preparação do pó cetônico. Utilizando-se o pó cetônico da espécie com maior atividade ureásica *Vatairae macrocarpa* (Benth.) Ducke, preparou-se 8 (oito) modelos experimentais, aplicando-se a enzima na forma livre e imobilizada, subdivididos em três partes: a primeira parte envolvendo a demonstração de atividade, especificidade e fatores que contribuem para a diminuição e/ou perda da atividade enzimática; a segunda parte envolvendo fatores de inibição enzimática e a terceira envolvendo a aplicação de métodos e técnicas de imobilização de urease em agar-agar e sílica gel e a adsorção de cátions metálicos sobre urease imobilizada.

ABSTRACT

This study investigated the presence of ureasic activity in seeds of Leguminous tree species in a "cerrado" region in the state of Piauí, and purpose its use in experimental models. These experimental models will be prepared from the natural enzyme, free or immobilized. The aim is to promote an higher performance of the professors and graduate students activities as a complement of theoretical teaching on Biomedical and Chemistry Sciences. We have done a floristic survey in an area of 72 hectares of "cerrado" (farm sleep, Demerval Lobão - PI) through the use of gateway method. This result has been presented as tables with references about their Botanical family, scientific names, popular names and fenologics data. The collected material has been registered in Graziela Barroso Herbarium - TEGB - Federal University of Piauí. The families are ordered in tables, in according to Cronquist's phylogenetic system. The ureasic activity was qualitatively studied in identified Leguminous seeds by the use of a reaction between a crude seeds extract and an urea solution, fairly buffered at pH 6.7 with phenol red indicator acid-basic. The seeds that presented ureasic activity were submitted to physical-chemistry processes to extract the enzyme and prepare the ketonic powder. Based on the present data we have purpose 8 (eight) experimental models from the ketonic powder of *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (higher ureasic activity specie) for use in practical teaching. These models have three main parts: the demonstration of activity, specificity and factors that enhance or inhibit enzyme activity, factors of

enzymatic inhibition and use of methods and techniques of urease immobilization in agar-agar and silica gels and metallic cation adsorption on immobilized enzyme.

1-INTRODUÇÃO

Este trabalho trata do estudo aplicativo da enzima urease extraída de sementes de algumas espécies de Leguminosas de uma região de cerrado piauiense, na forma livre e imobilizada, na preparação de material didático sob a forma de modelos práticos experimentais para o Ensino nas áreas Biomédica e Química.

O ensino na área de ciências experimentais necessita muito de estratégias que envolvam a realização de experimentos como uma maneira tanto de estimular a criatividade do aluno quanto de alicerçar conhecimentos novos ou de facilitar a compreensão e assimilação de informações. Essas estratégias comumente são efetivadas através das chamadas "aulas práticas", onde, seguindo um roteiro previamente elaborado, o aluno tem a oportunidade de confrontar a "teoria" com a "prática" e, a partir do seu próprio raciocínio, chegar a conclusões, estabelecendo princípios, relações com conceitos e enunciados aceitos cientificamente, além daqueles criados por ele durante tais experimentos, o que lhe permite aumentar a capacidade criativa, bem como desenvolver o processo de formação do pensamento lógico e crítico⁽¹⁾.

O objetivo geral do presente trabalho é utilizar as plantas como fonte de material para a pesquisa e o ensino nas áreas de Química, Biofísica,

Bioquímica e Biologia e elaborar roteiros e/ou modelos de práticas que viabilizem a aplicação do material produzido nas referidas áreas de ensino.

1.1- Leguminosas

As Leguminosas pertencentes ao grupo das dicotiledôneas (MAGNOLIOPHYTA-MAGNOLIOPSIDA) compreendem cerca de 650 gêneros com 18.000 espécies de ampla distribuição geográfica⁽²⁾. Para alguns taxonomistas estas espécies estão subordinadas a três subfamílias da família Leguminosae Adams: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae^(2e3). No entanto, de acordo com Cronquist⁽⁴⁾, essa subdivisão não é considerada, e o autor trata as subfamílias como famílias independentes: Mimosaceae, Caesalpinaceae e Fabaceae, justificando que as mesmas apresentam características distintas entre si. As Leguminosas variam desde árvores a ervas e são na grande maioria, empregadas como forrageiras, por proporcionarem alimentos nitrogenados tanto por suas sementes como pelas suas partes vegetativas. Grande parte das espécies de Leguminosas é utilizada na produção de madeiras, corantes, fibras, resinas e produtos medicinais. Suas sementes são ricas em proteínas, num percentual de 20 a 40%, as quais podem apresentar compostos com propriedades biológicas interessantes, destacando-se as lectinas e a urease que podem e vêm sendo utilizadas como instrumento em bioquímica, química e clínica. As lectinas vêm sendo purificadas e caracterizadas de várias fontes, inclusive de Leguminosas, devido à grande aplicabilidade em áreas de pesquisa médica e biológica. A enzima urease (uréia amidohidrolase EC 3.5.1.5) também apresenta um grande

aplicabilidade nessas áreas, e já foi pesquisada em algumas espécies de Leguminosas⁽⁵⁻⁹⁾.

O gênero *Hymenaea* dessa família ao qual pertencem espécies conhecidas como Jatobá, é um dos mais importantes dentre os grupos produtores de resinas, as quais apresentam amplo emprego medicinal⁽¹⁰⁾. Além de fornecer frutos com polpa farinácea utilizados na culinária⁽¹¹⁾ da região central do país, é também importante por outros aspectos, como a utilização da madeira que é de boa qualidade⁽¹²⁾.

As plantas biosintetizam uma enorme variedade de substâncias químicas do metabolismo primário, como os açúcares, as gorduras, as proteínas, e do metabolismo secundário como os alcalóides, flavonóides, terpenóides, dentre outros, que podem apresentar propriedades biológicas e propriedades farmacológicas, sendo que algumas dessas substâncias já são citadas na literatura com resultados significativos, o que possibilita a sua utilização como agentes terapêuticos. Alguns desses compostos são pesquisados pelo seu efeito cicatrizante, anti-ulcerogênico, antiinflamatório, hipo e hipertensor, antimicrobiano, anti-ofídico⁽¹³⁻¹⁷⁾. Muitas espécies de Leguminosas apresentam importância pelo seu emprego na medicina popular. As cascas amargas e adstringentes da sucupira (*Bowdichia virgilioides* Kunth.) por exemplo, são empregadas no combate às diarreias crônicas e como depurativo. As sementes são empregadas como anti-reumáticas, anti-sifilíticas e para afecções cutâneas e gástricas. Testes químicos e farmacológicos realizados por Marinho⁽¹⁶⁾ utilizando essa espécie demonstraram grande quantidade de alcalóides e variada atividade farmacológica. Os resultados obtidos por Marinho mostraram que a planta

possui atividade como relaxante de musculatura lisa, e atividade hipo e hipertensora. O barbatimão (*Stryphnodendron coriaceum* Benth.) também tem uso popular contra afecções gástricas. Testes realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais - NPPM, demonstram bons resultados para as atividades anti-ulcerogênica e cicatrizante do extrato bruto dessa espécie em testes experimentais em ratos⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Atualmente a comunidade científica demonstra grande interesse em estudar produtos extraídos das plantas, abrindo perspectivas bastante promissoras nas diversas áreas do conhecimento. Neste setor, a ciência experimental tem um papel primordial no sentido de assegurar medidas quantitativas dos seus sistemas, realizando uma longa série de pesquisas físico-químicas, biológicas, farmacológicas e clínicas que visam assegurar a utilidade, a qualidade e a margem de segurança do uso de fitoterápicos.

1.2-Cerrado

Os cerrados formam um complexo vegetacional de estrutura e fisionomia bastante heterogênea mas característica para cada área. Atualmente os cerrados no Brasil encontram-se temporal e espacialmente inseridos em mais de uma província fitogeográfica⁽²⁰⁾. Cerca de 23,7% do território brasileiro é recoberto pelo cerrado, tipo de vegetação semidecídua, xeromorfa, dominante no Brasil Central e de aparência peculiar. É constituído por dois estratos bem definidos: um inferior - herbáceo subarbustivo, e um superior - arbustivo arbóreo, formado por arbustos ou árvores de troncos baixos, inclinados e tortuosos com ramificação irregular. As espécies lenhosas

e herbáceas apresentam um alto grau de xeromorfismo foliar. As árvores se dispõem de uma certa maneira que, olhando-se de um determinado local se consegue ter uma visão em profundidade (cerrado típico). Em alguns pontos as árvores são um pouco fechadas e altas, assemelhando-se a uma mata (cerradão). Dos 23,7% do território brasileiro ocupado pelo cerrado, apenas 6,6% correspondem a paisagens naturais preservadas, até 1985^(20e21). O cerrado brasileiro apresenta uma flora estimada em 10.000 espécies vegetais, e menos de 1% destas foram estudadas quanto a sua composição e/ou ação farmacológica⁽²²⁾.

O cerrado do Piauí ocupa 5,9% do cerrado do Brasil e em termos de área do estado corresponde a 47,3%, cobrindo uma área estimada em 118.568 Km²⁽²⁰⁾, o que nos levou a optar pelo levantamento em uma área de cerrado.

No sentido de tentar caracterizar os cerrados do nordeste, alguns autores realizaram e/ou estão realizando levantamentos florísticos e/ou fitossociológicos, nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco e Bahia. No Piauí, foram realizados 16 levantamentos florísticos e fitossociológicos. O primeiro realizado por Rizzini, foi enquadrado em uma flora campestre; um segundo, realizado por Jenrich, foi enquadrado em cerradão (chapada); um terceiro realizado por Barros & Guimarães que foi enquadrado em cerrado; um quarto, realizado por Goergen foi classificado como cerradão e os doze últimos realizados por Castro, que os classificou em cerrado típico (Estação Ecológica de Uruçuí-Una em Ribeiro Gonçalves e municípios de Barras, Batalha, Beneditinos, Capitão de Campos, Elesbão Veloso, José de Freitas, Monsenhor Gil, Piracuruca e Piripiri) e em cerradão (Oeiras)⁽²⁰⁻²⁶⁾

1.3- Enzimas

Enzimas são os catalisadores das reações químicas que ocorrem nos sistemas biológicos. Elas são catalisadores altamente eficazes, e em geral produzem aumento na velocidade das. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, as ribozimas, todas as enzimas até hoje estudadas são proteínas. Essas proteínas apresentam como característica o seu alto poder catalítico e a especificidade. A atividade catalítica depende da integridade da estrutura protéica e a especificidade depende do arranjo preciso e exato dos átomos do substrato, que deve ter uma estrutura complementar para se ajustar ao local do centro ativo da enzima. As enzimas têm um alto grau de especificidade por seus substratos e não interagem nem mesmo com moléculas muitíssimo semelhantes. Elas aceleram reações químicas específicas sem a formação de produtos colaterais e funcionam em soluções aquosas diluídas em condições muito suaves de temperatura e pH. Participam como unidades funcionais do metabolismo, catalisando centenas de reações essenciais à manutenção da vida⁽²⁷⁻²⁹⁾.

Enzimas demonstram propriedades catalíticas singulares as quais podem ser exploradas para uma ampla variedade de aplicações como detecção, análise e produção na indústria química, médica e farmacêutica. Uma inerente desvantagem associada a enzimas biocatalítica é a instabilidade. Em resposta, novas tecnologias baseadas na imobilização dessas biomoléculas têm surgido, as quais têm não somente provado serem essenciais para a manipulação prática de enzimas, como têm fornecido

modelos para o estudo da função enzimática e de propriedades físico-químicas da enzima, como a estabilidade ao calor, por exemplo⁽³⁰⁻³²⁾.

A maioria das enzimas pode ser inibida por agentes químicos específicos. A combinação de certos agentes químicos com enzimas induz inibição das reações catalisadas. Existem dois grandes tipos de inibidores enzimáticos: irreversíveis e reversíveis.

Muitas enzimas são inibidas reversivelmente por íons de metais pesados como Hg(II), Cu(II) e Ag(I), que podem reagir com grupos sulfidrila essenciais formando mercaptídeos:



A afinidade desses íons pelos grupos sulfidrila é muito grande, podendo ser usados para fazer a titulação quantitativa desses grupos sulfidrila (-SH).

Na inibição irreversível, o inibidor destrói ou se combina fortemente com um grupo funcional pertencente à enzima que é importante para a atividade catalítica, sendo que a dissociação é muito lenta. Inibição deste tipo é a que ocorre com a acetilcolinesterase, enzima que desempenha importante papel na transmissão dos impulsos nervosos, inibição esta, induzida por gases neurovenenosos e inseticidas organofosforados⁽²⁷⁻²⁹⁾.

Ao contrário da inibição irreversível, a inibição reversível é caracterizada por um equilíbrio rápido entre o inibidor e a enzima. Existem dois tipos de inibidores reversíveis: competitivos e não competitivos. O inibidor competitivo é estruturalmente semelhante ao substrato e compete com este, pela ligação no sítio ativo mas, uma vez ligado não pode mais ser transformado pela enzima. Portanto, o inibidor competitivo diminui a velocidade de catálise porque reduz a proporção de moléculas de enzima que se ligam ao substrato. Na inibição não-

competitiva o inibidor liga-se à enzima mas em local diferente do sítio ativo e através desta ligação ele altera a conformação estrutural da enzima produzindo uma inativação reversível do sítio catalítico. Esta ligação ocorre tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima-substrato, formando os complexos inativos enzima-inibidor e enzima-substrato-inibidor⁽²⁷⁻²⁹⁾.

Os sítios ativos das enzimas são altamente específicos e devido a esta especificidade, são relativamente raros os inibidores competitivos. Os sítios ativos de algumas enzimas contêm grupos funcionais de resíduos de aminoácidos, que participam do processo catalítico como doadores ($-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) ou receptores ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_2$) de prótons. Tais grupos são potentes catalisadores de muitas reações orgânicas em sistemas aquosos⁽²⁹⁾.

Os grupos sulfidríla ($-\text{SH}$) são essenciais para a atividade de algumas enzimas. Se forem oxidados a enzima se tornará inativa.



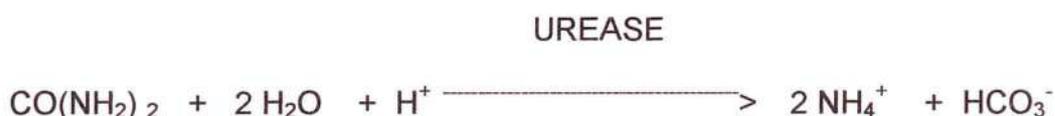
A reversão da inibição de grupos sulfidríla de algumas enzimas pode ser feita usando-se reagentes que apresentam grupos SH livres, como a cisteína, o ditioneitol ou o mercaptoetanol.



O reagente retira o Hg^+ da Enzima e reduz o grupo SH, fazendo a enzima voltar à forma ativa.

1.4-Urease

A urease (uréia amidohidrolase EC 3.5.1.5) é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia transformando-a em amoníaco (NH_4^+) e carbonato (HCO_3^-), em meio ácido:



A urease é uma proteína globular de alto peso molecular cerca de $480.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e raio de 52 \AA , consistindo de 6 (seis) subunidades idênticas, cada qual contendo 2 (dois) átomos de níquel, com 23 grupos -SH por mol de enzima representando um grupo -SH por sítio ativo⁽³⁴⁾

A urease é de grande interesse na área clínica e química; é utilizada como auxiliar no diagnóstico de úlceras gástricas^(35e36), bem como para a determinação de uréia no soro sanguíneo e na urina. A concentração de uréia no soro sanguíneo é um importante parâmetro para o diagnóstico de doença renal, bem como para o controle da diálise renal artificial. Penteadó⁽³⁵⁾, médico gastroenterologista utiliza a urease no diagnóstico clínico de úlceras e gastrites causada pela bactéria *Helicobacter pylori*, atribuída como a verdadeira responsável por cerca de 85% dessas doenças. O médico garante que o método por ele utilizado (conjugação da urease com a coloração – a amônia liberada pela potente atividade ureásica da bactéria, eleva acentuadamente o pH local produzindo coloração do lilás ao vermelho no líquido amarelo em que fragmentos das lesões ulcerogênicas são incubados) dá até 90% de

positividade, percentual que não é obtido quando usado outro método, possibilitando maior rapidez e segurança do que o que se consegue com o exame histopatológico no diagnóstico dessas doenças. Como enzimas são materiais de alto custo, a química industrial vem utilizando enzimas como a urease e outras, na forma imobilizada, o que possibilita uma redução nos custos dos processos utilizados, devido a algumas vantagens como o aumento da estabilidade da enzima e a sua reutilização⁽³⁰⁻³³⁾. A urease é uma das enzimas do solo mais estudadas devido a sua presença, atividade e estabilidade afetar o desempenho da uréia como fertilizante do solo⁽³⁷⁾

A urease se destaca por sua importância histórica por ter sido a primeira enzima isolada na forma cristalina, obtida de extratos de soja (Leguminosa) por James Sumner⁽³⁸⁾ em 1926. Se destaca também por sua alta eficiência e especificidade de ação, e tem sido estudada por diversos grupos de pesquisadores. Grande parte da história da Bioquímica se deve à pesquisa realizada sobre enzimas. Alguns bioquímicos pesquisaram sobre especificidade enzimática, outros sobre a cinética da atividade enzimática e formularam teorias a respeito de seu mecanismo de ação. Vários cientistas como Hanabusa, Gorin, Bailey e Boulter, Andrews e Reithel, Hasnain e Piggott e Sakaguchi entre outros, realizaram estudos com a urease extraída da Leguminosa *Canavalia ensiformis* DC⁽⁸⁾. Soares e colaboradores⁽⁸⁾ em trabalho realizado sobre a pesquisa de atividade ureásica em Leguminosas no qual registraram resultados positivos para algumas espécies, afirmam ser desconhecida até então, literatura sobre a pesquisa de urease em outras espécies de Leguminosas.

A urease bem como outras enzimas têm uma grande aplicabilidade. A obtenção de urease pura ou semi-purificada, além de permitir o estudo físico-químico de uma enzima, fornece material para outros fins, como demonstrações e aplicações práticas em sala de aula sobre bioquímica, química, biologia molecular e biofísica celular, permitindo um maior enriquecimento nas aulas teóricas e práticas, bem como demonstrações práticas sobre enzimologia, dosagens bioquímicas de uréia e outros.

Na pesquisa desenvolvida por Soares e colaboradores sobre atividade ureásica em Leguminosas, o método de extração utilizado resultava numa suspensão da proteína^(8e9). Nunes e colaboradores⁽⁷⁾ em trabalho posterior demonstraram que a extração da enzima a partir do pó cetônico, mostrou-se mais eficaz. Nesse trabalho os autores objetivaram encontrar um método de extração da urease de *Cratylia mollis* Mart. (Leguminosa) que permitisse estudos posteriores dessa enzima nestas e noutras espécies vegetais utilizando-se de processos cromatográficos e eletroforéticos (métodos biofísicos de análise que permitem a separação de substâncias em soluções biológicas, através do peso molecular e cargas elétricas respectivamente). Esses autores demonstraram que: a urease de *C. mollis* Mart. pode ser facilmente extraída do pó cetônico; a preparação obtida contém urease em mistura com mais, pelo menos, nove componentes protéicos; a atividade enzimática pode ser avaliada quantitativamente pelo método de semi-viragem de um indicador de pH, o vermelho de fenol; a urease de *C. mollis* Mart. é uma proteína ácida, com ponto isoelétrico próximo de 5 (semelhante à albumina humana) e deve apresentar peso molecular em torno de 150.000 daltons; o extrato quando submetido a eletroforese em acetato de celulose em pH 8,3

apresentou 3 (três) componentes principais, sendo 2 (dois) com migração anódica e 1 (um) com fraca migração catódica e a atividade ureásica foi encontrada no segmento imediatamente anterior ao componente de maior migração anódica; em gel de poliacrilamida a 5% e na presença de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, o extrato apresentou no mínimo 10(dez) componentes; não foi possível a localização de atividade ureásica no gel de poliacrilamida ⁽⁷⁾.

1.5- Imobilização de Enzimas

Nos últimos anos o uso de enzima imobilizada em diferentes tipos de suporte tem despertado grande interesse na química industrial. A literatura contém inúmeros estudos sobre enzimas imobilizadas em vários suportes e com diferentes técnicas de imobilização. Enzimas são materiais de custo muito elevado, e a imobilização em suportes que proporcione a conservação da atividade enzimática permite a reutilização dessa enzima várias vezes, o que significa a redução nos custos nos processos utilizados. Cormelato⁽³⁰⁾ em sua tese de doutorado trabalhou com a imobilização de enzimas (urease e invertase) em crisotila e o método por ela utilizado garante a manutenção da atividade e conseqüentemente a reutilização da enzima. Shekhovtsova⁽³¹⁾ utilizou a urease imobilizada para a determinação de íons de metais em água de dejetos e rios, numa região de Moscou. Asfha e colaboradores⁽³³⁾ trabalham com análise de fluxo contínuo para ácido úrico em fluidos biológicos, com a enzima uricase imobilizada num sistema de fluxo fechado.

1.5.1- Métodos

Os métodos conhecidos de imobilização podem ser: Químicos - baseados na formação de ligações covalentes entre uma enzima e um suporte ou através de ligações cruzadas intermoleculares de moléculas de proteínas; Físicos - baseados numa frágil interação entre uma enzima fixada em um suporte ou a incorporação da enzima numa membrana ou matriz. Recentemente tem sido usado a combinação dos métodos, ou seja, a imobilização tanto física quanto química, a qual consiste em imobilizar a enzima num polímero gel seguido de um tratamento com um agente ligante. Existem 5(cinco) principais métodos para imobilização de enzimas: oclusão, microencapsulamento, ligação covalente no suporte, ligação covalente cruzada e adsorção ⁽³⁰⁻³³⁾.

A imobilização deve ser realizada através dos grupos que não possuem atividade catalítica. A imobilização ou insolubilização de enzimas é importante pois substitui a utilização na forma solúvel (livre), o que facilita a remoção do meio reacional após o uso e favorece nova utilização ⁽³³⁻³⁴⁾.

1.5.2- Suportes

Dentre os suportes utilizados podemos citar o Agar-agar e a Sílica-gel.

a) Agar-agar

O agar-agar é um polissacarídeo com poros intersticiais de tamanho variável, que pode ser utilizado para uma ampla variedade de análises, além de aceitar diversos tipos de corantes e de se descorar com rapidez. Quando no

estado puro se apresenta como um pó branco obtido das paredes celulares de algas marinhas. Sua consistência na forma coloidal é muito firme a partir de concentrações de 1 %. O agar-agar comparado com outros géis, apresenta três grandes vantagens: facilidade de manuseio, conservação e baixo custo operacional⁽³⁹⁾.

b) Sílica-gel

A sílica gel é um material amorfo, poroso, tridimensional, rígido de unidades SiO_2 , com composição de grupos silanóis ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) na superfície porosa e unidades siloxanos ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) no seu interior. A estrutura de poros, composição química da superfície com sítios potencialmente ativos, propriedades mecânicas como força iônica, formato, volume e distribuição de poros, são alguns fatores importantes na caracterização e classificação dos adsorventes porosos, em função de suas aplicações⁽⁴⁰⁾.

A sílica gel desempenha importante papel na condição de adsorvente, em particular na função de suporte, para uma grande variedade de substâncias, numa extensa aplicabilidade prática. Por apresentarem propriedades de adsorver física e quimicamente espécies sobre suas superfícies, os adsorventes minerais, como a sílica gel, são amplamente usados em separação de misturas em larga escala, como em catálise, cromatografia e troca iônica⁽⁴⁰⁾.

De uma variedade de adsorventes minerais, a sílica gel é um dos mais usados como suporte no ancoramento de substâncias orgânicas, inorgânicas, complexos metálicos e organometálicos, enzimas e proteínas para uso, principalmente em cromatografia, adsorção e catálise. A sílica gel quimicamente modificada com grupos organofuncionais, desperta um grande

interesse, principalmente relacionado à excepcional resistência mecânica e química apresentada pela matriz da sílica. A mesma quando funcionalizada cria especificidade e seletividade, além de aumentar o caráter de adsorção, tornando o seu uso bastante amplo⁽⁴⁰⁾.

2- METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido nas seguintes etapas:

- 2.1- Levantamento florístico de uma região do cerrado piauiense;
- 2.2- Coleta de material botânico (sementes) para a realização de experimentos;
- 2.3- Pesquisa de atividade ureásica em sementes das espécies arbóreas de leguminosas da região;
- 2.4- Extração e tentativa de isolamento da enzima urease de sementes de uma ou mais espécies com atividade ureásica positiva;
- 2.5- Imobilização da enzima urease em suportes agar-agar e sílica gel aminada;
- 2.6- Caracterização da Enzima Urease e do sistema Sílica/Urease por Infravermelho com transformada de Fourier - FTIR;
- 2.7- Adsorção de cátions metálicos divalentes sobre a urease imobilizada em sílica gel;
- 2.8- Elaboração de roteiros práticos que viabilizem a aplicação da enzima urease, no Ensino nas áreas Biomédica e Química.

No desenvolvimento do trabalho foi obedecido as seguintes modalidades: pesquisa de atividade ureásica, extração, isolamento e

caracterização da enzima urease e o estudo de sua aplicabilidade no Ensino nas áreas Biomédica e Química. Após extração, isolamento e caracterização da enzima urease utilizando-se uma metodologia convencional simplificada já desenvolvida no NPPM - Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, desta Instituição, foi desenvolvida uma segunda etapa experimental, a imobilização da enzima urease natural utilizando-se alguns métodos já citados na literatura. Como a extração da enzima é considerada relativamente simples, assim como se reduz os custos ao utilizá-la em substituição à enzima comercial, o presente trabalho propõe modelos práticos experimentais como uma aplicabilidade desse material tanto em sala de aula quanto em atividades de pesquisa. Os modelos experimentais sugeridos compreendem conteúdos que demonstram a atividade, especificidade, perda e inibição da atividade, reversão da perda da atividade, fatores que promovem aumento e/ou diminuição da atividade enzimática, processos e técnicas de imobilização, utilização e reutilização da enzima urease imobilizada nos suportes agar-agar e sílica gel e a adsorção de cátions metálicos divalentes à enzima imobilizada. A utilização da enzima em modelos de unidades experimentais para o ensino, proporciona a vivência de uma gama de informações e produção de conhecimento em várias áreas, como a Química e as Ciências Biomédicas, possibilitando assim, o uso de um produto natural extraído de espécies da nossa região, ampliando as possibilidades de utilização de outras substâncias extraídas de plantas.

2.1- Levantamento Florístico

O levantamento florístico da área amostrada (Fazenda Sono, Município de Demerval Lobão - Figuras 01, 02 e 03) foi realizado utilizando-se o método do Caminhamento⁽⁴¹⁾, o qual consiste do reconhecimento dos tipos de vegetação presentes na área amostrada, listagem das espécies encontradas e análise dos resultados.

O local escolhido apresenta uma área de 72 hectares em ambiente de cerrado. Algumas espécies foram determinadas no local com a ajuda de especialistas e outras foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos com uma ficha de campo para posterior determinação. Parte do material coletado, foi herborizado e incorporado ao acervo do Herbário Graziela Barroso (TEGB) da Universidade Federal do Piauí.

As coletas de material botânico acompanhadas de observações fitofisionômicas e fenológicas foram realizadas na Fazenda do Sono de propriedade dos Irmãos Ribeiro situada no Município de Demerval, em ambiente de cerrado.

A escolha do local para o levantamento e coleta das espécies se deveu a pelo menos dois fatores: o acesso a uma área correspondente ao cerrado e a quase inexistência de uma espécie conhecida vulgarmente por barbatimão (*Stryphnodendron coriaceum* Benth.), pertencente às Leguminosas, tida pelos camponeses como sendo tóxica para o gado, mas que na literatura é referenciada como medicinal, utilizada no combate às afecções gástricas.

O levantamento foi realizado através de visitas ao campo para coleta de dados e de material botânico. Os dados foram coletados através de fichas de

campo. Os frutos e as sementes maduros foram coletados intactos e colocados em sacos de papel para testes e extração de urease.

2.2- Pesquisa de Atividade Ureásica nas Sementes

2.2.1- Atividade Ureásica

Para verificação da atividade ureásica, adicionava-se 70 μ L do extrato da semente da espécie de Leguminosa a ser investigada, a 2 mL de solução de substrato contendo uréia 0,4M em tampão fosfato de sódio 0,001M pH 6,7 e vermelho de fenol como indicador. Considerava-se o teste positivo para a presença de atividade ureásica quando ocorria a viragem (amarelo para lilás) do indicador incorporado à solução de substrato, em decorrência da alcalinização do meio pela amônia liberada⁽⁷⁻⁹⁾.

2.2.2- Extração da Urease e Preparação do Pó Cetônico

Porções de 100g de sementes de cada espécie com atividade ureásica, foram lavadas de 3 a 4 vezes com água destilada e deixadas de molho por um período de 8 a 14 horas para amolecimento das cascas. Foram retiradas as cascas e liquidificadas as sementes num volume de 300 mL de água destilada durante 5 minutos. A massa obtida foi filtrada em funil de Buchner (a vácuo). Desprezou-se o resíduo e acrescentou-se 200 mL de acetona ao filtrado para extração da urease. Agitou-se por rotação e centrifugou-se a 15.000 rpm por 10 (dez) minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o resíduo

com 200 mL de acetona, agitando-se com bastão de vidro. Centrifugou-se por mais 10 (dez) minutos a 15.000 rpm e ressuspendeu-se novamente com 200 mL de acetona e repetiu-se a operação. Ressuspendeu-se o resíduo pela última vez com 200 mL de acetona e filtrou-se a vácuo com placa forrada. Removeu-se o resíduo com espátula e deixou-se secar sobre papel de filtro, em temperatura ambiente por 24 horas para eliminar a acetona. Finalmente seco, passou-se o gral para pulverizar completamente. O material assim obtido, foi conservado em frascos na geladeira⁽⁷⁾.

2.2.3- Inibição da Atividade Ureásica por Mercuriais

Para verificação da inibição da atividade ureásica por mercuriais orgânicos e/ou inorgânicos, diluiu-se 100 µL do extrato preparado com o pó cetônico contendo urease em 1 mL de água destilada e acrescentou-se 100 µL de solução de Timerosal na concentração de 100%. Misturou-se levemente e adicionou-se 2 mL da solução de substrato 0,4M. Repetiu-se o mesmo procedimento para concentrações de 10, 1 e 0,1% de Timerosal. Utilizou-se o mesmo procedimento para o mercurial HgCl₂ nas mesmas concentrações⁽⁷⁻⁹⁾.

2.2.4- Reversão da Inibição da Atividade Ureásica por Mercuriais

Para reversão da inibição da atividade ureásica por mercuriais, incubou-se a enzima com o mercurial Timerosal e com o mercurial HgCl₂ por 2-3 minutos de acordo com o procedimento adotado para a inibição (item 3.2.3) e acrescentou-se 100 µL de solução de ditioneitol a 0,01M⁽⁷⁻⁹⁾.

2.3- Caracterização da Urease e do Sistema Sílica/Urease por FTIR

Para a caracterização da urease livre e urease suportada em sílica gel aminaada, foram obtidos espectros no infravermelho. Foram feitas pastilhas de KBr/sílica, KBr/urease e KBr/sílica/urease, bem como pastilhas puras nas mesmas condições. Foram usadas janelas de BaCl₂ para nujol/urease, nujol/sílica, nujol/sílica/urease, bem como para fluorolube nas mesmas condições. Os espectros foram obtidos num espectrofotômetro IV com transformada de Fourier, Bomem - MB 100 Michelson, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ (30e40).

2.4- Imobilização e Inibição da Enzima Urease em Suporte Agar-agar

Para a imobilização da enzima urease em agar-agar foi utilizado o método de Shekhovtsova⁽³¹⁾ 100mg do pó contendo a enzima foi misturado a 2mg de agar-agar e dissolvido em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5 e aquecido (cerca de 40°C) até completa dissolução e colocado em duas placas de Petri formando camadas de 4-5mm quando esperava-se o seu resfriamento. Foram feitos 5 (cinco) orifícios circulares em cada placa retirando-se o fragmento e colocando-se 20-50µL de água destilada (controle) e soluções de Timerosal e HgCl₂ (experimental) nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1% respectivamente. Após um período de 2-3 minutos, adicionou-se uma solução de uréia 0,4M para molhar as placas e verificar a inibição ou não da

atividade da enzima e com isto, verificar a capacidade de imobilização da enzima.

2.5- Imobilização da Enzima Urease em Suporte Sílica Gel Aminada

Foi preparada 2g de sílica gel funcionalizada com grupamento NH_2 numa mistura de 25 mL de solução de trietilamina 0,05M a 25 mL de etanol 20% à temperatura ambiente e adicionado tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora com etanol 20%, NaCl 1,0M e água destilada.

1g da matriz preparada foi misturada com 50mg do pó cetônico contendo a enzima e guardada por 12 horas à 0°C em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0. Após esse período a sílica imobilizada foi filtrada por sucção em funil de placa porosa e seca em linha de vácuo por 6 horas ou por vácuo em trompa d'água.

Para a outra metade da matriz (1g) foi usado o mesmo procedimento, só que antes de se adicionar a trietilamina, a mesma foi incubada em 25 mL de solução de glutaraldeído 1% durante 12 horas, a 0°C . Logo após o período de incubação, a sílica foi lavada com uma solução de NaCl 1M e tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0.

Passado esse período, 0,5g da sílica assim preparada, foi lavada e incubada em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 por 24 horas a 0°C . À outra metade da sílica foi adicionado 25 mL de trietilamina, dando sequência ao mesmo procedimento acima descrito.

A sílica (0,5g) tratada com glutaraldeído foi filtrada e lavada sucessivas vezes com água bidestilada por sucção em funil de placa porosa. Em seguida, foi adicionada de 5 a 20 mg de urease em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0, com agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. O excesso da enzima foi retirado com tampão fosfato 0,1M e uma solução de NaCl 1,0M em tampão fosfato de sódio 0,1M e novamente com tampão fosfato, filtrada em funil de placa porosa e seca em linha de vácuo sem aquecimento durante 6 horas. Em seguida foram preparadas pastilhas e tirado o espectro de absorção em FTIR - infravermelho com transformada de Fourier num espectrofotômetro Bomem^(30,31,40e42).

2.6- Adsorção de Cátion Metálico Divalente sobre Urease Imobilizada em Sílica Gel em Solvente Etanol

A coluna foi montada com uma massa de 0,5 g de urease imobilizada e lavada com 5mL de água bidestilada, etanol anidro superseco preparado antes do experimento⁽⁴³⁾, carbonato de sódio 0,1M e água bidestilada, separadamente. O metal foi padronizado previamente a fim de ser percolado, seguindo-se as etapas abaixo descritas, conforme apresentado no item 4.7.2 do roteiro nº 08, as quais estão aqui reproduzidas:

1- Percolar 5mL da solução de CoCl_2 $3,361 \cdot 10^{-2}$ na coluna e coletar alíquotas completando o volume para 25 mL;

2- Percolar 5 mL dos seguintes eluentes: etanol seco, HCl 0,001 a 0,1N e água bidestilada, coletando as alíquotas separadamente e completando-as para 25 mL;

- 3- Separar 3 amostras de 1 mL de cada alíquota coletada, colocando-as em 3 béquers;
- 4- Adicionar uma pequena quantidade de hexametilenotetramina em cada béquer contendo as amostras e completar o volume para 20 mL com água bidestilada;
- 5- Adicionar 5 gotas de HCl 0,1N e 2 gotas de indicador xilenol orange.
- 6- Titular cada amostra com uma solução de EDTA 0,01M e anotar o volume gasto;
- 7- Tirar a média aritmética do volume de EDTA gasto nas 3 amostras de cada alíquota e determinar a quantidade de moles do metal;
ex. $N \text{ sob} = M \text{ EDTA} \times \text{Vol. (l) EDTA} \times \text{Valor Alíquota} / \text{Vol. (mL) Alíquota}$
 $T. \text{ in} = 0,053 \text{ mL de EDTA}$
 $T. \text{ in} = 0,01M \times 0,053 \cdot 10^{-3} \times 25/1\text{mL} = 1,325 \cdot 10^{-5} \text{ moles}$
- 8- Após determinação da quantidade de metal em cada alíquota, determinar a quantidade de metal que foi adsorvida na coluna;
- 9- Fazer um quadro demonstrativo com todos os dados obtidos.

2.7- Produção de Roteiros Práticos sobre a Aplicação da Enzima Urease como Fonte de Material Didático para o Ensino nas Áreas Biomédica e Química

Foram elaborados roteiros de práticas envolvendo as aplicações de enzimas compreendendo conteúdos que demonstram a atividade, especificidade, perda e inibição da atividade, reversão da perda da atividade, fatores e/ou reagentes que promovem aumento ou diminuição da atividade enzimática, processos e técnicas de imobilização que permitam a utilização e

reutilização de enzimas em suportes agar-agar e sílica gel, a fim de possibilitar um maior enriquecimento no processo de ensino-aprendizagem na área biomédica e química.

Cada roteiro consta de um título, objetivos, uma introdução, um procedimento metodológico e referências bibliográficas.

Nota:

N.sob = número de moles no sobrenadante

M EDTA = molaridade do ácido etileno diamino tetracético

T.in = tubo inicial ou 1a. amostra

Vol. (L) EDTA = volume do ácido etileno diamino tetracético

3-RESULTADOS

3.1- Levantamento Florístico

De acordo com o levantamento florístico da área estudada (Fazenda Sono - Figuras 01, 02 e 03), a flora arbórea local possui como característica, representantes mais expressivos de **Parkia platycephala** Benth., **Bowdichia virgilioides** Kunth, **Hymenaea courbaril** L. var. **Stilbocarpa** (Hayne) Lee et Lang. e **Sclerolobium paniculatum** Vog. (Leguminosas), **Qualea parviflora** Mart., **Q. grandiflora** Mart., (Vochysiaceae) e **Curatela americana** L. (Dilleniaceae). Além das Leguminosas e as duas famílias acima citadas, a composição florística da região apresentou mais 19 famílias, compreendendo um total de 24 famílias identificadas e cerca de 64 espécies entre elas distribuídas.

As Leguminosas estão representadas por cerca de 30 espécies (tabela 01) distribuídas da seguinte forma: Caesalpiniaceae, Mimosaceae e Fabaceae com 14, 10 e 6 espécies respectivamente, sendo as que mais se destacaram em termos numéricos. Vale salientar que não foi possível a identificação de toda a flora lenhosa local (árvores e arbustos), durante o período de oito (8) meses com escala mensal de coleta, primeiro porque o levantamento foi

limitado à espécies arbóreas de Leguminosas, e segundo, não foi possível acompanhar o período de floração e frutificação de todas as espécies.

Figura 01: Fazenda Sono - cerrado típico

Figura 02: Fazenda Sono - cerrado típico

Figura 03: Fazenda Sono - cerrado típico

Tabela 01: Lista das espécies de Leguminosas arbóreas presentes na Fazenda Sono, situada no município de Demerval Lobão-PI, ordenadas segundo o sistema filogenético de Cronquist (1981).

FAMÍLIA / ESPÉCIE	NOME VULGAR	FLORAÇÃO/FRUTIFICAÇÃO (Meses do Ano)
MIMOSACEAE		
<i>Acassia farnesiana</i> Willd	Coronha	03-05/ 06-07
<i>Anadenanthera</i> sp	Angico preto	11-01/ 07-09
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell) Morong	Tamboril	09-10/ 07-08
<i>Parkia plathycephala</i> Benth.	Faveira	06-07/ 08-10
<i>Piptadenia obliqua</i> (Pers.) Macbr.	Rama Bezerro	01-02/ 09-10
<i>Piptadenia</i> sp.	Angico branco	04-06/ 07-09
<i>Pithecolobium acutifolium</i> Benth.	Bordão de Velho	03 / 06-07
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	Candeia	09-10/ 07-08
<i>Stryphnodendron coriaceum</i> Benth.	Barbatimão	05 e 10/07-09
<i>Pithecellobium foliolosum</i> Benth.	Arapiraca, Rosca	11-12 / 08-09
CAESALPINIACEAE		
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.	Jucá, Pau ferro	12-03/ 07-08
<i>Cassia grandis</i> L.	Canafístula	07-08/ 08-09

<i>Cenostigma macrophyllum</i> Tul.		
var. <i>acuminata</i> Teles Freire	Caneleiro	09-04 / 09-11
<i>Copaifera luetzelburgii</i> Harms	Podoi	01-03 / 07-09
<i>Copaifera</i> sp	Podoi branco	12-03 / 07-09
<i>Dimorphandra gardineriana</i> Tul.	Fava Danta	01-02 e 05 / 07-09
<i>Hymenaea courbaril</i> L.		
var. <i>Stilbocarpa</i> (Hayne) Lee et Lang.	Jatobá	12-01 / 07-09
<i>H. stigonocarpa</i> Mart.	Jatobá	12-01 / 07-09
<i>Hymenaea</i> sp	Jatobá	11-12 / 07-09
<i>Martiodendron parvifolium</i> (Benth) Gleason	Quebra machado	02-05 / 07-10
<i>Peltogyne</i> sp	Jatobá	10-12 / 07-09
<i>Sclerolobium paniculatum</i> Vog.	Pau Pombo	10-11 / 04-05
<i>Senna</i> sp	Maria mole	12-04 / 04-07
<i>Swartzia</i> sp	Jacarandá	09-01 / 02-04
FABACEAE		
<i>Andira</i> sp	Angelim	10-11 / 02-03*
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth.	Sucupira	07-08 / 07-10
<i>Dypterix</i> sp	Banha de galinha	10-01 / 09-10*
<i>Machaerium acutifolium</i> Vog.	Violete	10-11 / 07-09
<i>Machaerium</i> sp	Pau Mocó	** / 10-11
<i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke	Amargoso	07-08 / 08-09

* Informação de acordo com literatura

** Sem informação

3.2- Pesquisa de Atividade Ureásica nas Sementes de Leguminosas

3.2.1- Atividade Ureásica

Os testes realizados para a pesquisa de atividade ureásica nas sementes eram considerados positivos quando ocorria a viragem do indicador vermelho de fenol incorporado à solução de uréia, em decorrência da alcalinização do meio pela amônia liberada. Comparou-se a atividade enzimática da nossa preparação (urease em pó cetônico) com a de uma amostra de urease de *Cratylia mollis* Mart.⁽⁷⁾ e uma amostra de urease comercial (Merck), não constatando diferenças significativas entre as mesmas (figura 04). Comparou-se também as duas amostras (em pó cetônico e comercial) com a urease (também em pó cetônico) de *Cratylia mollis* Mart.⁽⁷⁾ quanto ao ponto de fusão, verificando-se que não ocorre fusão das amostras, as mesmas se decompõem numa temperatura bem próxima. Para a urease comercial, à 235,1°C a amostra escurece e decompõe-se totalmente em 263,8°C e as amostras em pó cetônico escurecem a cerca de 228,5°C e decompõem-se totalmente a 258,9°C.

As espécies arbóreas correspondentes às famílias das Leguminosas, cujas sementes foram testadas quanto à presença de atividade ureásica, estão apresentadas na tabela 02. A presença de atividade ureásica está apresentada por símbolos (-), (+), (++) e (+++) para resultados negativo, fraca atividade, moderada atividade e forte atividade, respectivamente. Das espécies pesquisadas, 7 (sete) apresentaram atividade, 20 (vinte) não apresentaram atividade e 3 (três)* não foram pesquisadas devido a carência de sementes,

conforme mostra a tabela 02. Dentre as espécies testadas a *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke, foi a que apresentou maior atividade ureásica.

Algumas espécies arbustivas, como *Dioclea* sp por exemplo, apresentaram forte atividade, para a enzima urease, mas foram descartadas por não pertencerem ao hábito de crescimento selecionado. As espécies *Cassia grandis* L., *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong e *Martiodendron parvifolium* (Benth.) Gleason apresentaram apenas traços de atividade, ficando portanto classificadas entre as espécies sem atividade ureásica.

Figura 04: teste de atividade ureásica.

Tubos: 1- Urease comercial; 2- Urease de *C. mollis* Mart.; 3- Sem atividade; 4- Urease de *Copaifera luetzelburgii* Harms; 5- Urease de *Anadenanthera* sp; 6- Urease de *Plathymenia reticulata* Benth e 7- Urease de *Vatairae macrocarpa* (Benth.) Ducke.

Tabela 02- Lista das espécies de Leguminosas cujas sementes foram testadas quanto a presença de atividade ureásica. Os símbolos (-), (+), (++) e (+++) representam resultados negativo, fraca atividade, moderada atividade e forte atividade respectivamente.

FAMÍLIA / ESPÉCIES	ATIVIDADE UREÁSICA
MIMOSACEAE	
<i>Acassia farnesiana</i> Willd	-
<i>Anadenanthera</i> sp.	+
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell) Morong	-
<i>Parkia plathycephala</i> Benth.	-
<i>Piptadenia obliqua</i> (Pers.) Macbr.	++
<i>Piptadenia</i> sp.	-
<i>Pithecolobium acutifolium</i> Benth.	-
<i>Plathymentia reticulata</i> Benth.	++
<i>Stryphnodendron coriaceum</i> Benth.	-
CAESALPINIACEAE	
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.	-
<i>Cassia grandis</i> L.	-
<i>Cenostigma macrophyllum</i> Tul.	
var <i>acuminata</i> Teles Freire	-
<i>Copaifera luetzelburgii</i> Harms.	++

<i>Copaifera</i> sp	++
<i>Dimorphandra gardineriana</i> Tul.	-
<i>Hymenaea courbaril</i> L.	
var <i>stilbocarpa</i> (Hayne) Lee et Lang.	-
<i>H. stigonocarpa</i> Mart.	-
<i>Hymenaea</i> sp	-
<i>Martiodendron parvifolium</i> Mart.	-
<i>Peltogyne</i> sp	-
<i>Sclerolobium paniculatum</i> Vog.	-
<i>Senna</i> sp	+
<i>Swartzia</i> sp	-
FABACEAE	
<i>Andira</i> sp	*
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth.	-
<i>Dypterix alata</i> Vog.	*
<i>Machaerium acutifolium</i> Vog.	-
<i>Machaerium</i> sp	*
<i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke	+++

*sementes não coletadas

3.2.2- Extração da Urease e Preparação do Pó Cetônico

As sementes das espécies com atividade ureásica positiva foram separadas e submetidas a uma série de processos físico-químicos para a extração da enzima e preparação do pó cetônico.

Para cada teste positivo para a presença de atividade ureásica, 100g de sementes das espécies correspondentes eram liquidificadas e o filtrado acrescido de acetona era centrifugado várias vezes em centrífuga refrigerada Beckman de alta rotação para a obtenção do pó cetônico, como referido no item 3.2.2.

Cerca de 1,5 a 2,5% de urease semi-purificada (urease em pó cetônico) foram obtidos de cada 100g de sementes, sendo o maior percentual obtido para a espécie *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke. A urease assim obtida, foi utilizada para a realização dos testes experimentais que cumularam na produção dos roteiros práticos para a aplicação no Ensino nas áreas Biomédica e Química.

3.2.3- Inibição da Atividade Ureásica por Mercuriais Orgânicos e Inorgânicos

Observou-se a ocorrência de inibição enzimática tanto pelo mercurial orgânico (timerosal) quanto pelo mercurial inorgânico (HgCl_2) nas 4 (quatro) concentrações utilizadas, sendo que nas 2 (duas) concentrações menores houve apenas uma inibição parcial, verificada pela ocorrência de mudança de coloração da reação com pequena intensidade (figuras 05 e 06).

Figura 05: Inibição da atividade ureásica por Timerosal:

Tubos: 0- Enzima (controle); 1, 2, 3 e 4- Enzima + Timerosal 100, 10, 1 e 0.1%.

Figura 06: Inibição da atividade ureásica por HgCl_2 :

Tubos: 0- Enzima (controle); 1, 2, 3 e 4- Enzima + HgCl_2 100, 10, 1 e 0,1%.

3.2.4- Reversão da Inibição da Atividade Ureásica

Utilizando-se o ditiotreitol, observou-se a ocorrência de reversão da inibição enzimática tanto para o mercurial orgânico timerosal quanto para o mercurial inorgânico cloreto de mercúrio nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1%, como mostram as figuras 07 e 08 e tabela 03.

Figura 07: Efeito do DTT na reversão da inibição enzimática por mercuriais.

Tubos: 0- Enzima (controle); 1- Enzima + HgCl_2 ; 2- Enzima + Timerosal + DTT

Figura 08: Efeito do DTT na reversão da inibição enzimática por mercuriais em urease imobilizada em agar-agar:

Placas: 1- Enzima + HgCl_2 + DTT; 2- Enzima + Timerosal + DTT

Tabela 03: Efeito do DTT na reversão da inibição da atividade enzimática promovida por mercuriais orgânico (timerosal a 100%) e inorgânico (HgCl_2 a 100%).

ESPÉCIES	ATIVIDADE		
	Adição de Timerosal	Ad. de HgCl_2	Ad. de DTT
<i>Anadenanthera</i> sp	-	-	+
<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	-	-	+
<i>Copaifera luetzelburgii</i> Harms.	-	-	+
<i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke	-	-	+

3.3- Caracterização da Urease e do Sistema Sílica/Urease por FTIR

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de caracterizar a urease suportada em sílica através da obtenção de espectros no infravermelho. Os espectros são mostrados na figura 09.

Através da técnica de infravermelho podemos inferir:

Apesar de prejudicada pela alta absorção da própria sílica, a técnica de infravermelho apresenta dois pontos os quais podemos focar nosso objetivo que é o de confirmar o ancoramento da urease na sílica. Assim, analisando a figura 06, onde temos o espectro da sílica pura, sílica aminada e sílica/urease, observamos na região de 2975-2921 cm^{-1} , a banda referente a estiramento C-H, a qual não aparece na sílica pura, aparece no espectro da sílica aminada e é acentuadamente aumentada na sílica-urease, o que é de se esperar visto que a enzima apresenta este fragmento em sua estrutura. Por outro lado, observamos uma banda em 1534 cm^{-1} , correspondente a estiramento C—N, banda esta que está ausente em sílica pura, muito fraca na sílica aminada e mais intensa na sílica urease.

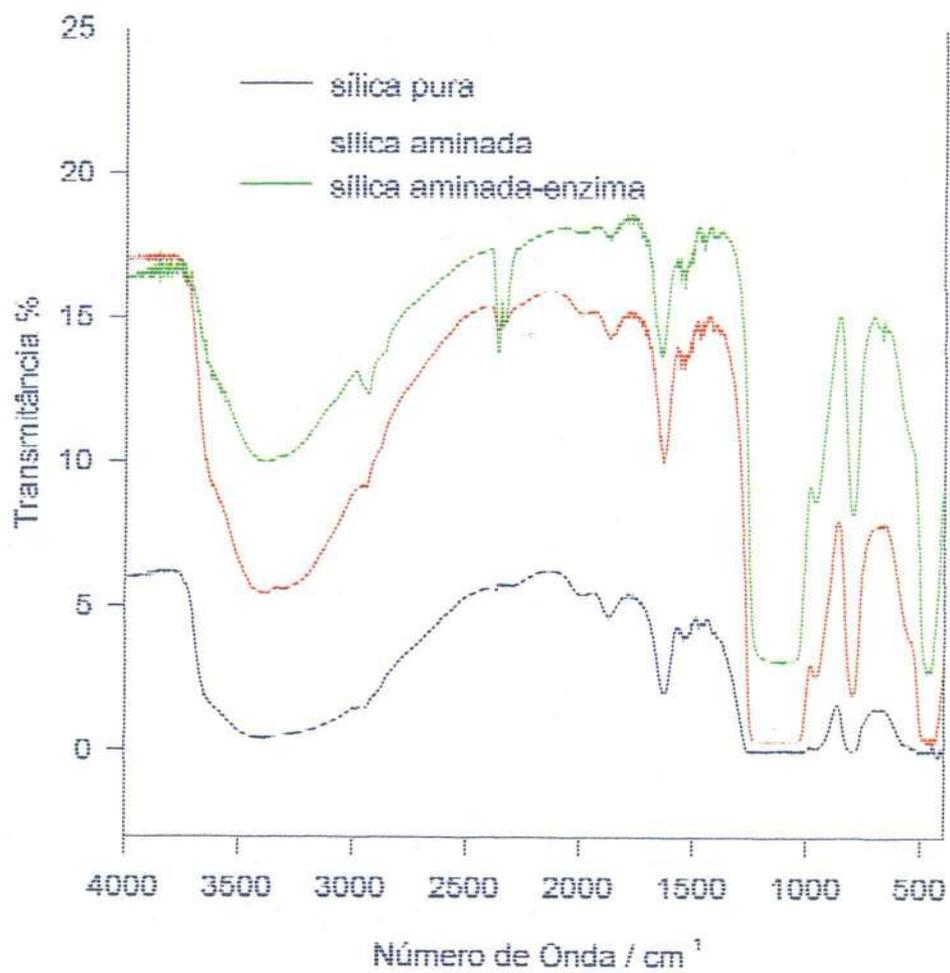


Figura 09: Espectros no infravermelho de sílica pura, sílica aminada e sílica/urease obtidos no espectrofotômetro Bomem - MB 100 Michelson série FTIR na faixa de 4000 a 400cm⁻¹, resolução de 4cm⁻¹.

3.4- Imobilização e Inibição da Enzima Urease em Suporte Agar-Agar

Utilizando-se o método de oclusão, um dos 5 (cinco) principais métodos de imobilização de enzimas, o qual consiste em aprisionar a enzima dentro dos espaços intersticiais das ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel como o amido, poliacrilamida e outros, aplicando-se a técnica de Shekhovtsova⁽³¹⁾ (co-imobilização em agar-agar), imobilizou-se a enzima urease natural em agar-agar. A atividade da enzima imobilizada foi testada pelo método de viragem do indicador vermelho de fenol, através do qual pode-se constatar a atividade enzimática.

Após a imobilização da enzima pode-se testar o efeito inibitório de metais orgânicos e inorgânicos sobre a enzima urease. De acordo com os resultados apresentados (figura10) pode-se observar que ocorreu inibição da enzima tanto para o íons metálico Hg(II), quanto para o metal orgânico timerosal, nas concentrações empregadas (100, 10, 1e 0,1%), ocorrendo maior inibição com a concentração de 100%, o que garante a utilização desse método para a determinação qualitativa e quantitativa de íons de metais em concentrações muito baixas. A figura 10 mostra a formação de um halo amarelo ao redor do orifício devido a inibição da enzima pelo metal, o qual pode ser utilizado para a determinação qualitativa do metal.

Figura 10: Imobilização e inibição enzimática por mercuriais.

Legenda: O- controle (enzima); O- enzima + timerosal; O- enzima + HgCl₂

3.5- Imobilização da Enzima Urease em Suporte Sílica Gel Aminada

Para imobilização da urease em sílica gel utilizou-se a imobilização por ligação covalente e ligação covalente cruzada. Este método foi utilizado devido a simplicidade e economia de material utilizado, o que garantiu uma boa imobilização conforme mostra as figuras 11 e 12.

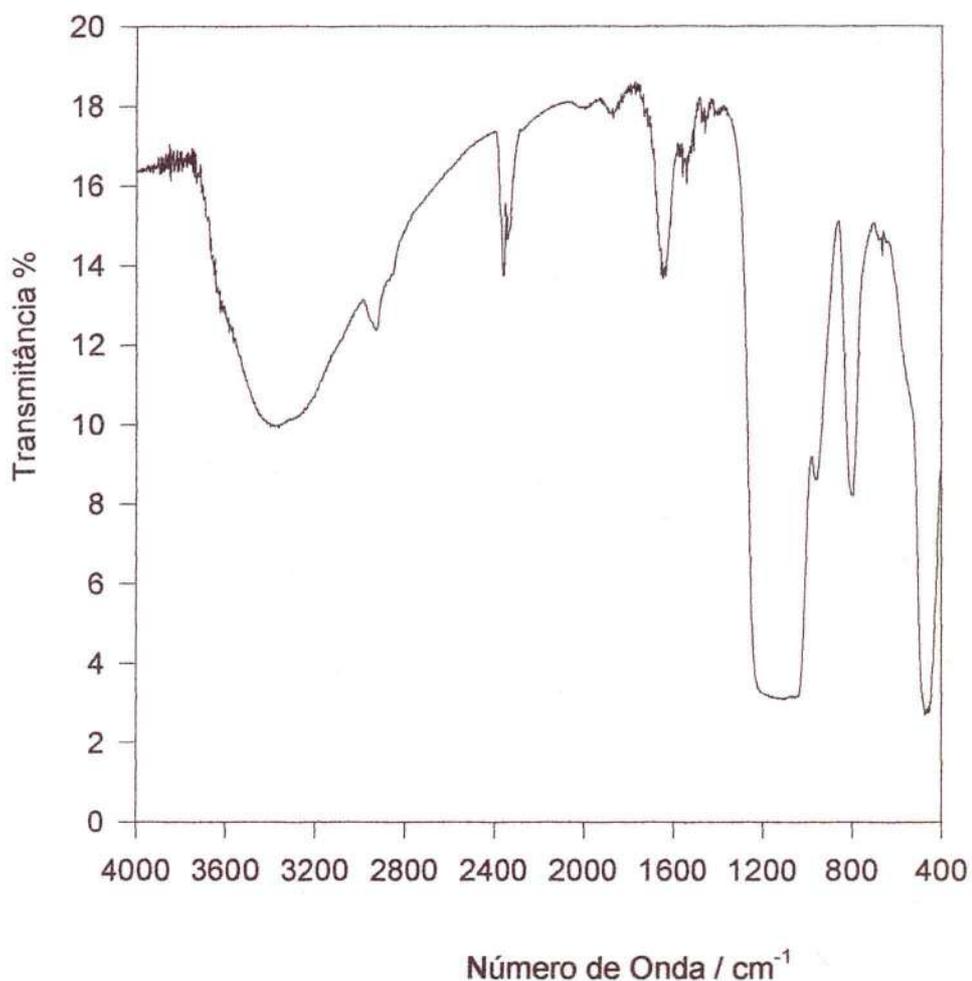


Figura 11: Espectro no infravermelho de sílica aminada com urease imobilizada obtido no espectrofotômetro Bomem - MB 100 Michelson série FTIR.

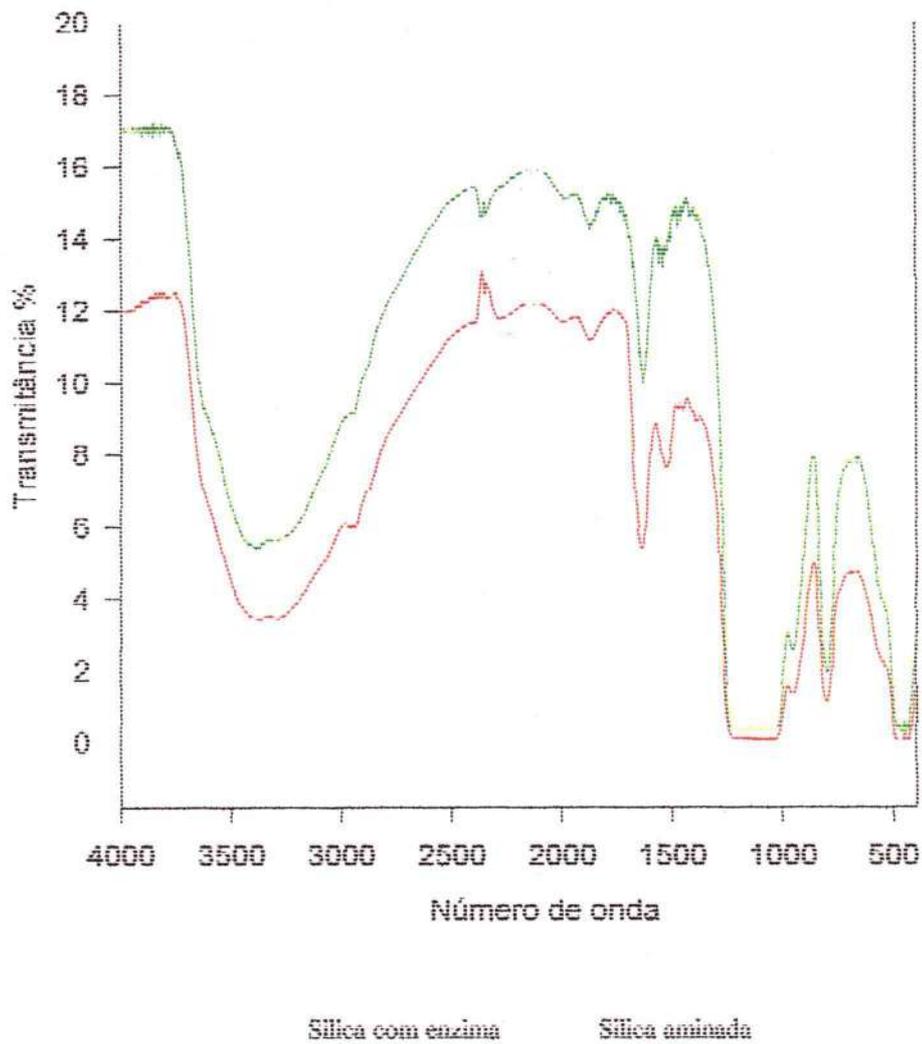


Figura 12: Espectro no infravermelho de sílica aminada e sílica/urease comercial obtido no espectrofotômetro Bomem - MB 100 Michelson série FTIR.

3.6- Adsorção de Cátion Metálico Divalente sobre Urease Imobilizada em Sílica Gel.

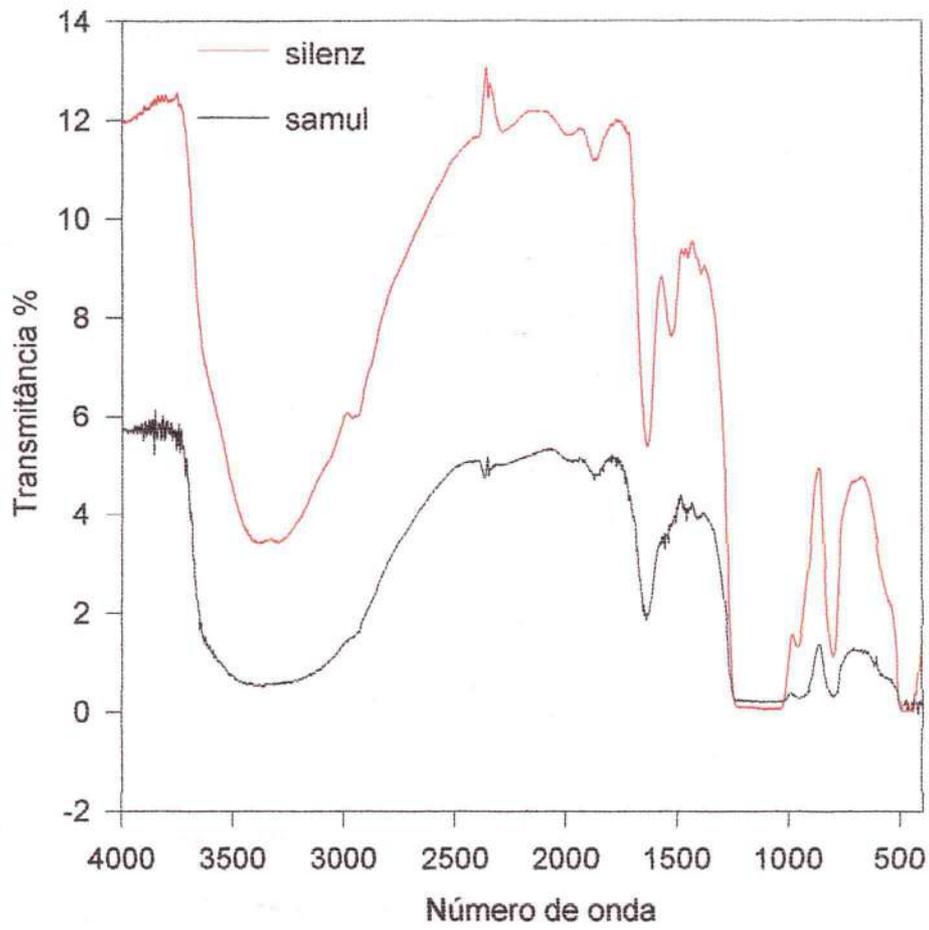
A adsorção de cátion metálico sobre a urease imobilizada em sílica gel aminada, utilizando-se a adsorção em coluna (figura 13), garantiu bons resultados para o cátion Co(II) conforme Quadro 01. O cátion Co(II) em solução alcoólica foi quantitativamente determinado por titulação colorimétrica com solução de EDTA 0,01M. A figura 14 mostra o espectro da sílica/urease e sílica/urease/metal (CoCl_2) adsorvido.

Figura 13: Adsorção em Coluna.

Quadro 01: Adsorção de CoCl_2 em Urease imobilizada em sílica Gel

Cátion	Vol.Metal (mL)	Sol. Padr. 10^{-2}	Nad 10^{-4}	Sol. Inicial 10^{-5}	Etanol 10^{-5}	H_2O 10^{-5}	Sol. HCl 10^{-5}	Sol.HCl 10^5
CoCl_2	5	3,361	1,68	1,50	2,29	1,45	2,15	1,70

Obs: Nestes solventes a retenção do metal foi de 19,67%. Como eluentes foram usados etanol, HCl 0,001 a 0,1M e água. O eluente mais eficaz foi HCl em pH 3.



Silenz = sílica / enzima urease

Samul = sílica / urease / metal

Figura 14: Espectro no IV de sílica/urease e sílica/urease/metal obtido no Espectrofotômetro Bomem - MB Michelson série FTIR.

3.7- Produção de Roteiros Práticos em Modelos Experimentais para o Ensino

Foram elaborados 8 roteiros de estudo sob a forma de modelos práticos experimentais envolvendo as aplicações da enzima urease livre e imobilizada.

A primeira parte compreende modelos experimentais que envolvem a demonstração de atividade enzimática, especificidade e fatores que contribuem para a diminuição e/ou perda da atividade enzimática.

A segunda parte compreende modelos experimentais que envolvem a demonstração de substâncias que inibem e/ou reverterem a inibição da atividade enzimática.

A terceira parte compreende modelos experimentais que envolvem a demonstração de métodos e técnicas utilizadas no processo de imobilização da enzima uréase nos suportes agar-agar e sílica gel e a adsorção de cátions metálicos divalentes sobre a uréase imobilizada e suas aplicações.

Cada um dos roteiros foi testado de acordo com o procedimento adotado, utilizando a enzima extraída da espécie **Vatairae macrocarpa** (Benth.) Ducke, que apresentou maior atividade ureásica.

3.7.1- Roteiros Práticos que envolvem a demonstração de atividade enzimática, especificidade e fatores que contribuem para a diminuição e/ou perda da atividade enzimática:

ROTEIRO PRÁTICO Nº 01

DEMONSTRAÇÃO DA ATIVIDADE DE UMA ENZIMA

OBJETIVO: demonstrar a atividade enzimática

INTRODUÇÃO

Enzimas são os catalizadores das reações químicas que ocorrem nos sistemas biológicos. Elas são catalizadores extraordinariamente efetivos e em geral produzem aumentos na velocidade das reações da ordem de 10^7 a 10^{14} muito maior que aquelas dos catalisadores sintéticos (na urease é de 10^{14}). As enzimas apresentam um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e ainda funcionam em soluções aquosas e em condições muito suaves de temperatura e pH.

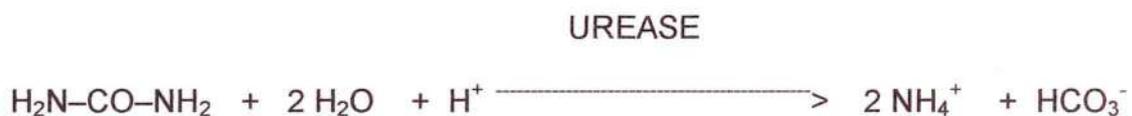
Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, as ribozimas, todas as enzimas até hoje estudadas são proteínas.

A atividade catalítica das enzimas depende da integridade da sua conformação protéica nativa. Para serem ativas, algumas enzimas não necessitam de nenhum outro grupo químico além dos seus resíduos de

aminoácidos. Outras requerem componentes químicos adicionais chamados cofatores. Um cofator pode ser um ou mais íons inorgânicos, tais como Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , K^+ (a urease requer Ni^{+2}), ou uma molécula orgânica complexa, a coenzima.

As reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos, ou contrair um músculo não ocorrem em velocidade útil sem catálise. Uma enzima contorna este problema fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma determinada reação é energeticamente mais favorável. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. A molécula se liga ao sítio ativo e quem sofre a ação da enzima é chamada de substrato.

A enzima urease (uréia amidohidrolase EC 3.5.1.5) catalisa a hidrólise da uréia transformando-a em amoníaco (NH_4^+) e carbonato (HCO_3^-), em meio ácido:



A ação enzimática da urease pode ser demonstrada fazendo-se a reação de uma pequena amostra do extrato bruto obtido de sementes de Leguminosas, com uma solução de uréia fracamente tamponada a pH 6,7 contendo o indicador vermelho de fenol. Sob a ação da enzima haverá a formação de amoníaco suficiente para sobrepujar a ação do tampão,

aumentando o pH, causando uma virada na cor da solução, que passará do amarelo para o lilás.

MATERIAL

Pó cetônico de semente de leguminosa contendo a enzima urease

Uréia P.A.

Tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,7

Vermelho de fenol

Propilenoglicol

Água destilada

Tubos de ensaio

Pipetas

Conta-gotas

Medidor de pH

PROCEDIMENTO

- 1- Preparar uma solução de uréia 0,4M em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,7 (ajustar com o uso do medidor de pH) e acrescentar o indicador vermelho de fenol;
- 2- Preparar 50 mL de solução de propilenoglicol (álcool) a 20%;
- 3- Misturar 20 mg do pó cetônico contendo a enzima (urease) em 3 mL da solução de propilenoglicol a 20%;
- 4- Pipetar 2 mL da solução de uréia em dois tubos de ensaio (A e B);

- 5- No tubo A acrescentar 3 gotas de solução de propilenoglicol a 20% (controle: reação não catalizada);
- 6- No tubo B acrescentar 3 gotas da solução de urease (teste: reação catalizada);
- 7- Misturar e observar a mudança de coloração após 3 minutos.
- 8- Se for possível, guardar o tubo A em local apropriado e observar após quanto tempo o mesmo atinge uma coloração semelhante à do tubo B.
- 9- Formar grupos para discussão dos resultados obtidos.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Conn, E. E. e Stumpf, P. K. Introdução à Bioquímica , 4ª edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1980.
- 2- Cotton, F. A. e Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry , 5ª edição, Editora Wiley Luteiscience, USA, 1988.
- 3- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M.M. Princípios de Bioquímica, 2ª ed. Editora Savier, São Paulo, 1995.
- 4- Stryer, L. Bioquímica , 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1996.

ROTEIRO PRÁTICO N° 02

DEMONSTRAÇÃO DO EFEITO DO CALOR E DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS SOBRE O COMPORTAMENTO DE UMA ENZIMA

PARTE 1: Efeito do Calor

PARTE 2: Efeito da variação na concentração de sais

OBJETIVO: observar o comportamento da enzima com relação à atividade catalítica quando a mesma é submetida ao calor e a outros agentes desnaturantes.

INTRODUÇÃO

As enzimas possuem todas as propriedades das proteínas e suas atividades catalíticas dependem da integridade da estrutura protéica. As enzimas são muito sensíveis à temperatura. Geralmente, temperaturas elevadas destroem sua capacidade catalítica, fenômeno conhecido como - Desnaturação. Também sofrem desnaturação em meios excessivamente ácidos ou alcalinos ou ainda quando expostas a concentrações muito baixas ou muito elevadas de sais. Ferver a enzima em água, incubar a enzima com agentes desnaturantes, expor a enzima a valores extremos de pH ou de salinidade, faz com que as cadeias polipeptídicas sejam desnaturadas ou rompidas e sua atividade catalítica seja abolida.

MATERIAL

Pó cetônico de semente de Leguminosas contendo a enzima urease

Uréia P.A.

Solução tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5

Solução de KCl 0.2, 1.0 e 1.8 M

Solução de NaCl 0.2, 1.0 e 1.8 M

Propilenoglicol

Vermelho de fenol

Água destilada

Lamparina a álcool

Tubos de ensaio

Pipetas

PROCEDIMENTO

PARTE 1

- 1- Preparar uma solução de uréia 0,4M em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5 com o indicador vermelho de fenol;
- 2- Preparar uma solução de propilenoglicol (álcool) a 20%;
- 3- Misturar 20mg do pó cetônico contendo a enzima (urease) em 3 mL da solução de propilenoglicol a 20%;
- 4- Numerar 9 tubos de ensaio;
- 5- Pipetar 1 mL de água destilada nos tubos 1 e 2;
- 6- Acrescentar 3 gotas da solução de urease aos tubos 1 e 2;

- 7- Colocar o tubo 2 próximo a uma chama e ferver o conteúdo de maneira suave por 1 minuto;
- 8- Pipetar 0,5mL da solução de uréia 0,4M para os tubos 1 e 2;
- 9- Aguardar 5 minutos e comparar o resultado do tubo 2 com o resultado do tubo 1.

PARTE 2

- 1- No tubo 3 pipetar 0,5mL de água destilada (controle);
- 2- Nos tubos 4, 5 e 6 pipetar 0,5mL da solução de KCl 0.2, 1.0 e 1.8M respectivamente;
- 3- Acrescentar 3 gotas da solução de urease a cada um dos tubos e aguardar 5 minutos;
- 4- Pipetar 0,5mL da solução de uréia para cada um dos tubos e aguardar 5 minutos;
- 5- Repetir o mesmo procedimento usando as soluções de NaCl nos tubos 7,8 e tubo 9;
- 6- Comparar os resultados obtidos com o tubo 3 (controle);
- 7- Analisar e discutir os resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Conn, E. E. e Stumpf, P. K. Introdução à Bioquímica , 4ª edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1980.
- 2- Heneine, I. F. Biofísica Básica. 2a. edição, Editora Atheneu, 1996.

- 3- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M.M. Princípios de Bioquímica, 2ª ed. Editora Savier, São Paulo, 1995.
- 4- Stryer, L. Bioquímica, 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1996.

ROTEIRO PRÁTICO N° 03

DEMONSTRAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE UMA ENZIMA

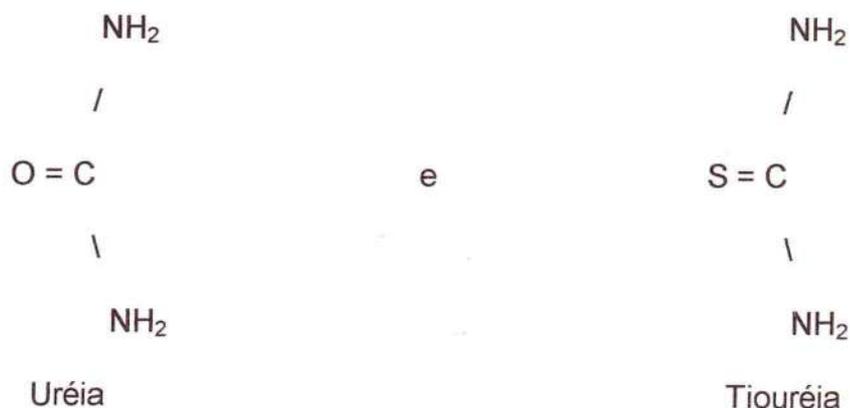
OBJETIVO: demonstrar a especificidade de uma enzima utilizando o par urease - uréia (enzima - substrato).

INTRODUÇÃO

As enzimas, proteínas catalisadoras das reações químicas nos sistemas biológicos, são altamente específicas tanto para a reação catalisada quanto na seleção de seus reagentes, que são chamados de substratos. Em geral uma enzima catalisa uma única reação ou um grupo de reações intimamente relacionadas.

Algumas enzimas têm especificidade quase absoluta pelo seu substrato e não interagem nem mesmo com moléculas muitíssimo semelhantes. A especificidade depende do arranjo preciso e exato dos átomos do substrato, que deve ter uma estrutura complementar para se ajustar ao local do sítio ativo da enzima. A urease, por exemplo, é específica pelo seu substrato - a uréia

(NH_2CONH_2). Podemos demonstrar isso, expondo-a a derivados da uréia, como por exemplo, a tiouréia (NH_2CSNH_2).



Pesquisas sobre a especificidade das enzimas pelos seus substratos levaram ao conceito de uma relação complementar do tipo “chave e fechadura” entre uma molécula do substrato e uma área determinada da superfície da molécula da enzima, o sítio ativo ou sítio catalítico, ao qual a molécula de substrato está ligado enquanto sofre a ação catalítica. De acordo com tais pesquisas, o substrato deve ter duas características distintas: a ligação química específica que pode ser atacada pela enzima e, geralmente, algum outro grupo funcional, grupo de ligação, o qual liga-se à enzima e posiciona a molécula de substrato no sítio ativo de forma apropriada para que a ligação suscetível fique localizada de maneira precisa em relação ao grupo catalítico da enzima.

Trabalhos recentes sugerem que os sítios ativos de algumas enzimas não são rígidos, sendo a forma dos mesmos modificada pela ligação do substrato, passando assim, a assumir forma complementar àquela do substrato somente após o substrato se ligar. Este processo é denominado adaptação induzida.

MATERIAL

pó cetônico de semente de Leguminosa contendo urease

solução de uréia 0,4M em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5 contendo vermelho de fenol

solução de tiouréia 0,4M em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5 contendo vermelho de fenol

tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5

propilenoglicol a 20%

tubos de ensaio

pipetas

conta-gotas

PROCEDIMENTO

1- Preparar uma solução de urease a 100 mg% em solução de propilenoglicol a 20%;

2- Marcar 2 tubos de ensaio;

3- Pipetar 2,5 mL da solução de uréia para o tubo 1 e acrescentar 5 gotas da solução de urease;

4- Pipetar 2,5 mL da solução de tiouréia para o tubo 2 e acrescentar 5 gotas da solução de urease;

5- Comparar o tubo 1 com o tubo 2 e explicar o ocorrido.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Cormelato, M.H. Imobilização de Enzimas no suporte Crisotila. Tese de Doutorado , Instituto de Química, UNICAMP , 1995.
- 2- Conn, E. E. e Stumpf, P. K. Introdução à Bioquímica, 4ª edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1980.
- 3- Cotton, F. A. e Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry , 5ª edição, Editora Wiley Luteiscience, USA, 1988.
- 4- Heneine, I. F. Biofísica Básica. 2a. edição, Editora Atheneu, 1996.
- 5- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M.M. Princípios de Bioquímica, 2ª ed. Editora Savier, São Paulo, 1995.
- 6- Stryer, L. Bioquímica , 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1996.

3.7.2- Roteiros Práticos que envolvem a demonstração de substâncias que inibem a atividade enzimática e/ou promovem a reversão da inibição:

ROTEIRO PRÁTICO N°04

DEMONSTRAÇÃO DA INIBIÇÃO DE UMA ENZIMA POR MERCURIAIS INORGÂNICOS E MERCURIAIS ORGÂNICOS

OBJETIVO: Demonstrar que algumas substâncias quando interagem com uma enzima podem diminuir ou abolir a atividade catalítica dessa enzima

INTRODUÇÃO

A maioria das enzimas pode ser inibida por agentes químicos específicos. A combinação de certos agentes químicos com enzimas induz inibição das reações catalisadas. Existem dois grandes tipos de inibidores enzimáticos: irreversíveis e reversíveis.

Muitas enzimas são inibidas reversivelmente por íons de metais pesados como Hg(II), Cu(II) e Ag(I) por exemplo, que podem reagir com grupos sulfidrila essenciais formando mercaptídeos:



A afinidade desses íons pelos grupos sulfidrila é tão grande que o mesmo pode ser usado para fazer a titulação quantitativa desses grupos sulfidrila (-SH).

Na inibição irreversível, o inibidor destroi ou se combina fortemente com um grupo funcional pertencente à enzima que é importante para sua atividade catalítica, sendo que a dissociação é muito lenta. Ao contrário da inibição irreversível, a reversível é caracterizada por um equilíbrio rápido entre o inibidor e a enzima. Existem dois tipos de inibidores reversíveis: competitivos e não competitivos. O inibidor competitivo é estruturalmente semelhante ao substrato e compete com este, pela ligação no sítio ativo mas, uma vez ligado não pode ser transformado pela enzima. Portanto, o inibidor competitivo diminui a velocidade de catálise porque reduz a proporção de moléculas de enzima que se ligam ao substrato. Na inibição não competitiva o inibidor liga-se à enzima mas em local diferente do sítio ativo e através desta ligação ele altera a estrutura conformacional da molécula da enzima produzindo uma inativação reversível do sítio catalítico. Esta ligação ocorre tanto com a enzima livre quanto com o complexo enzima-substrato, formando os complexos inativos enzima-inibidor e enzima-substrato-inibidor.

Os sítios ativos das enzimas são altamente específicos e devido a esta especificidade, são relativamente raros os inibidores competitivos. Os sítios ativos de algumas enzimas contêm grupos funcionais de resíduos de aminoácidos, que participam do processo catalítico como doadores ($-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) ou receptores ($-\text{S}^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_2$) de prótons, capazes de catalizar muitas reações orgânicas em sistemas aquosos, sendo essenciais para a atividade da enzima.

MATERIAL

Pó cetônico contendo urease

Solução de uréia 0,4M

Solução tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5

Vermelho de fenol ou azul de bromotimol

Cloreto de mercúrio 100mg%

Tintura de timerosal 100mg%

p-hidroxi-mercuribenzoato 100mg%

Fenil mercuriacetato 100mg%

Água destilada

Conta-gotas

Tubos de ensaio

Pipetas

Pipetador

PROCEDIMENTO

- 1- Preparar a uréia na solução tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5 e acrescentar o indicador (6 gotas para cada 100mL);
- 2- Pesar 100 mg do pó cetônico contendo urease e dissolver em 100mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5 com indicador;
- 3- Numerar 5 tubos de ensaio;
- 4- No tubo 1, colocar 1mL de água destilada, 3 gotas da solução contendo urease, e 1,5 mL da solução de uréia;

- 5- No tubo 2, colocar 1mL de água destilada, 3 gotas da solução contendo urease, 5 gotas da solução de cloreto de mercúrio e, após 1 minuto, acrescentar 1,5mL da solução de uréia;
- 6- Comparar o tubo 1 com o tubo 2 e explicar o ocorrido;
- 7- No tubo 3, colocar 1mL de água destilada, 3 gotas da solução contendo urease, 5 gotas da solução de p-hidroxi-mercuribenzoato e, após 1 minuto, acrescentar 1,5mL da solução de uréia;
- 8- No tubo 4, colocar 1mL de água destilada, 3 gotas da solução contendo urease, 5 gotas da solução de fenil mercuriacetato e, após 1 minuto, acrescentar 1,5mL da solução de uréia;
- 9- No tubo 5, colocar 1mL de água destilada, 3 gotas da solução contendo urease, 5 gotas de timerosal e, após 1 minuto, acrescentar 1,5mL da solução de uréia;
- 10-Comparar os tubos 3, 4 e 5 com os tubos 1 e 2. Explicar os resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Conn, E. E. e Stumpf, P. K. Introdução à Bioquímica, 4ª edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1980.
- 2- Cotton, F. A. e Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry, 5ª edição, Editora Wiley Luteiscience, USA, 1988.
- 3- Heneine, I. F. Biofísica Básica. 2a. edição, Editora Atheneu, 1996.
- 4- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M.M. Princípios de Bioquímica, 2ª ed. Editora Savier, São Paulo, 1995.

5- Shekhovtsova, T. N. The Use of Immobilized Enzymes for Determination of Metal Ions. Journal of Analytical Chemistry, v. 49, p 709-714, 1994.

6- Stryer, L. Bioquímica , 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1996.

ROTEIRO PRÁTICO Nº 05

DEMONSTRAÇÃO DA REVERSÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE UREÁSICA POR CLORETO DE MERCÚRIO

OBJETIVO: Demonstrar o efeito de algumas substâncias na reversão da inibição da atividade catalítica de enzimas.

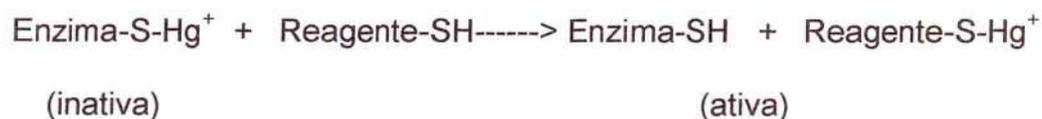
INTRODUÇÃO

O mercúrio (assim como As, Tl, Pb, Mn) é um metal que se une a grupos tiois (SH) vitais das proteínas . Assim sendo, várias são as enzimas que podem ser inibidas (in vivo e in vitro) pelo mercúrio, resultando disso o bloqueio de diferentes passos metabólicos.

Os grupos sulfidril (-SH) são essenciais para a atividade de algumas enzimas. Se forem oxidados a enzima se tornará inativa.



A reversão da inibição de grupos sulfidríla de algumas enzimas pode ser feita usando-se reagentes que apresentam grupos SH livres, como a Cisteína, o Ditioneitol ou o Mercaptoetanol.



O reagente retira o Hg^+ da Enzima e reduz o grupo SH, fazendo a enzima voltar à forma ativa.

MATERIAL

Pó cetônico contendo urease

Solução de uréia 0,4M em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,5 contendo vermelho de fenol

Propilenoglicol a 20%

Cloreto de mercúrio a 100mg%

Solução de 6-ditioneitol 0,01M (DTT)

Água destilada

Tubos de ensaio

Pipetas

Pipetador

PROCEDIMENTO

1- Preparar uma solução de urease a 100mg% em solução de propilenoglicol a 20%;

- 2- Marcar 2 tubos de ensaio (A e B);
- 3- No tubo A, misturar 1mL de água destilada e 3 gotas da solução contendo urease e 0,5mL da solução de uréia (controle);
- 4- No tubo B, misturar 1mL de água destilada e 3 gotas da solução contendo urease;
- 5- Acrescentar 5 gotas da solução de cloreto de mercúrio ao tubo B, agitar levemente e, após 1 minuto, acrescentar 1mL da solução de uréia;
- 6- Observar o resultado;
- 7- Acrescentar 5 gotas da solução de 6-ditiotreitol 0,01M ao tubo B;
- 8- comparar o tubo A com o tubo B e explicar o ocorrido.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Conn, E. E. e Stumpf, P. K. Introdução à Bioquímica 4ª edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1980.
- 2- Cotton, F. A. and Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry , 5ª edição, Editora Wiley Luteiscience, USA, 1988.
- 3- Heneine, I. F. Biofísica Básica. 2a. edição, Editora Atheneu, 1996.
- 4- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M.M. Princípios de Bioquímica, 2ª ed. Editora Savier, São Paulo, 1995.
- 5- Stryer, L. Bioquímica , 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1996.

3.7.3- Roteiros Práticos que envolvem a demonstração de métodos e técnicas de imobilização de enzimas e suas aplicações:

ROTEIRO PRÁTICO N° 06

IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE METAIS UTILIZANDO UMA ENZIMA (UREASE) IMOBILIZADA EM GEL AGAR-AGAR

OBJETIVOS: Identificar e determinar a presença de íons de metais em solução aquosa utilizando-se enzimas imobilizadas.

INTRODUÇÃO

Enzimas e sistemas enzimáticos são utilizados em vários setores da indústria, medicina, agricultura, análise clínica, dentre outros. Na Química, por exemplo, se utiliza a imobilização de enzimas na determinação de íons de metais. As maneiras de imobilização, os suportes e os reagentes utilizados são extremamente diversos.

Os métodos conhecidos de imobilização podem ser: Químicos - baseados na formação de ligações covalentes entre uma enzima e um suporte ou através de ligações cruzadas intermoleculares de moléculas de proteínas; Físicos - baseados numa frágil interação entre uma enzima fixada em um suporte ou a incorporação da enzima numa membrana ou matriz. Recentemente tem sido usado a combinação dos métodos, ou seja, a

imobilização tanto física quanto química, a qual consiste em imobilizar a enzima num polímero gel seguido de um tratamento com um agente ligante.

Existem 5 (cinco) principais métodos para imobilização de enzimas: oclusão, microencapsulamento, ligação covalente no suporte, ligação covalente cruzada e adsorção.

A imobilização melhora a capacidade de conservação e resistência para fatores externos da enzima, proporcionando a reutilização.

MATERIAL

Agar-agar 2,0g%

Tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 6,7

Pó cetônico contendo urease

Uréia 0,4M em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,7 contendo vermelho de fenol

Solução de cloreto de mercúrio a 100, 10, 1 e 0,1%

Solução de timerosal a 100, 10, 1 e 0,1%

Pipetas

Pipetador

Régua milimétrica

Placas de Petri

Água destilada

PROCEDIMENTO

- 1- Pesar 2,0g de agar-agar e 100mg do pó cetônico contendo urease e misturar em 100mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,7;
- 2- Aquecer levemente até o agar-agar se dissolver. Colocar em duas placas de Petri formando camadas de 4-5mm e deixar resfriar em temperatura ambiente;
- 3- Fazer 5 (cinco) orifícios circulares retirando o fragmento (adotar um código numérico) em cada placa;
- 4- No orifício 1, colocar 20-50 μ L de água destilada (controle);
- 5- Nos orifícios 2,3,4 e 5 colocar 20-50 μ L da solução de cloreto de mercúrio a 100, 10, 1 e 0,1% respectivamente;
- 6- Aguarda um tempo de 5-10 minutos;
- 7- Molhar as placas com solução de uréia 0,4M;
- 8- Aguardar um tempo de 5-15 minutos;
- 9- Observar se houve ou não a formação de manchas de inibição (coloração amarela) ao redor dos orifícios;
- 10-Medir o diâmetro das manchas ao redor dos orifícios;
- 11-Repetir o mesmo procedimento (seqüência do 4-10) para as soluções de timerosal a 100, 10, 1 e 0,1%.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Cormelato, M.H. Imobilização de Enzimas no suporte Crisotila. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1995.
- 2- Lob, Asfaha and Mottola, H.A. Continuous-Flow Analysis for Uric Acid Biological Fluids, with Immobilized Uricase in a Closed-Loop System., Anal. Chem., p.2332-2336, 1980.
- 3- Santos, M.R. de M.C. - Imobilização de Uréia, Metiluréia e 1,3-Dimetilluréia sobre Sílica Gel: Síntese, Caracterização, Quimissorção de Cátions Divalentes e Termoquímica, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1992.
- 4- Shekhovtsova, T. N. The Use of Immobilized Enzymes for Dertermination of Metal Ions. Journal of Analytical Chemistry, v. 49,p. 709-714, 1994.
- 5- Vinogradov, E.L; Gavryuchenkova, L.P.; Mal'Ko, E.T; Zaitsev, P.I.; Britsyna, N.S, e Vorob'ev, V.P. Film Carriers for Immobilization of Enzymes. UDC, p.683-688, Plenum Publishing Corporation, 1985.

ROTEIRO PRÁTICO Nº 07

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE EM SÍLICA GEL AMINADA (SIL-NH₂)

OBJETIVO: Utilizar técnicas de imobilização de enzimas, usando a sílica gel como suporte.

INTRODUÇÃO

A literatura contém inúmeros estudos sobre enzimas imobilizadas em vários suportes e com diferentes técnicas de imobilização^(1,2,4e5). Cormelato⁽¹⁾ mostrou a imobilização de urease em crisotila; Shekhovtsova⁽⁴⁾ mostrou a co-imobilização de urease em agar-agar para a determinação de íons de metais em água de dejetos e rios.

A sílica gel é usada como suporte no ancoramento de várias substâncias como enzimas, complexos metálicos e organometálicos, para uso principalmente em cromatografia, adsorção e catálise. A sílica gel quimicamente modificada com grupos organofuncionais, desperta grande interesse, principalmente relacionado a excepcional resistência mecânica e química apresentada pela matriz da sílica⁽³⁾.

MATERIAL

Pó cetônico contendo urease

Sílica gel aminada

Solução de trietilamina 0,05M

Etanol a 20%

Tampão fosfato de sódio 0,1M pH8,0

Solução de NaCl 1,0M

Solução de KCl 1,0M

Solução de NaHCO₃ 0,1M

Solução de glutaraldeído 1,0%

PROCEDIMENTO

PROCESSO DE ANCORAMENTO

Primeiro Processo

1ª etapa:

- 1- Misturar 25mL de solução de trietilamina 0,05M a 25mL de etanol 20% em temperatura ambiente;
- 2- Adicionar 2,0g de sílica gel aminada em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0;
- 3- Agitar a mistura em temperatura ambiente por 1,0 hora com etanol 20%, NaCl 1,0M e água bidestilada.

2ª etapa

- 1- Pesar 1,0g da matriz preparada na 1ª etapa e misturar com 50mg da enzima em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 e guardar por 12 horas à 0°C;

- 2- Filtrar a sílica imolizada por sucção em funil de placa porosa e lavar com KCl 1,0M e NaHCO₃ 0,1M;
- 3- Secar a sílica assim obtida em linha de vácuo por 6 horas ou por vácuo em trompa d'água;
- 4- Preparar pastilhas e tirar o espectro de absorção em FTIR.

Segundo Processo

1ª etapa:

- 1- Incubar 1,0g da sílica aminada em 25mL de solução de glutaraldeído a 1,0% por um período de 12 horas, a 0°C;
- 2- Após o período de incubação, lavar a sílica com uma solução de NaCl 1,0M e tampão fosfato de sódio 0,1M pH8,0.

2ª etapa:

- 1- Pesar 0,5g da sílica lavada e incubar em tampão fosfato de sódio 0,1M pH8,0 por 24 horas a 0°C;
- 2- Adicionar 25mL de trietilamina a outra metade da sílica, dando seqüência ao mesmo procedimento acima descrito.

3ª etapa:

- 1- Filtrar e lavar a sílica tratada com glutaraldeído (0,5g) sucessivas vezes com água bidestilada por sucção em funil de placa porosa;
- 2- Em seguida, adicionar 5mg de urease em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 com agitação em temperatura ambiente durante 24 horas;

- 3- Retirar o excesso da enzima com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 e uma solução de NaCl 1,0M em tampão fosfato de sódio e novamente com tampão fosfato de sódio;
- 4- Secar a sílica em linha de vácuo sem aquecimento por 6 horas ou por vácuo em trompa d'água;
- 5- Prepara pastilhas e tirar o espectro de absorção em FTIR.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Cormelato, M.H. Imobilização de Enzimas no suporte Crisotila. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1995.
- 2- Lob, Asfaha and Mottola, H.A. Continuous-Flow Analysis for Uric Acid Biological Fluids, with Immobilized Uricase in a Closed-Loop System. Anal. Chem. p.2332-2336, 1980.
- 3- Santos, M.R. de M.C. - Imobilização de Uréia, Metiluréia e 1,3-Dimetilluréia sobre Sílica Gel - Síntese, Caracterização, Quimissorção de Cátions Divalentes e Termoquímica, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1992.
- 4- Shekhovtsova, T. N.: The Use of Immobilized Enzymes for Dertermination of Metal Ions. Journal of Analytical Chemistry, v. 49, p.709-714, 1994.
- 5- Vinogradov, E.L; Gavryuchenkova, L.P.; Mal'Ko, E.T; Zaitsev, P.I.; Britsyna, N.S, and Vorob'ev, V.P. - Film Carriers for Immobilization of Enzymes. UDC, p.683-688, Plenum Publishing Corporation, 1985.

ROTEIRO PRÁTICO Nº 08

ADSORÇÃO DE CÁTIOS METÁLICOS SOBRE UREASE IMOBILIZADA EM SÍLICA GEL EM SOLVENTES ETANOL E ÁGUA

OBJETIVO: Determinar a capacidade de adsorção de metais sobre urease imobilizada utilizando métodos de titulação.

INTRODUÇÃO

A sílica gel desempenha importante papel na condição de adsorvente, em particular, na função de suporte, para uma grande variedade de substâncias, numa extensa aplicabilidade prática. Por apresentar propriedade de adsorver física e quimicamente espécies sobre suas superfícies, a sílica gel é amplamente utilizada em separação de misturas, como em catálise, cromatografia e troca iônica.

MATERIAL

Urease imobilizada em sílica gel aminada

Coluna cromatográfica

Solução de cátions divalentes (Co, Ni, Zn, Cu e Hg)

Etanol seco P.A.

Carbonato de sódio 0,1M

EDTA 0,1M

HCl 0,1 a 0,0001N

Hexametilenotetramina P.A.

Indicadores (murexida para os cátions Cu e Ni, xilenol orange para os cátions Co e Hg e eriocromo T para o cátion Zn)

Água bidestilada

Balões volumétricos de 25mL

Pipetas de 1, 2 e 5mL

Pipetadores

PROCEDIMENTO

Montagem da Coluna

- 1- Lavar a coluna e secar em estufa;
- 2- Pesar 0,5g da urease imobilizada e montar o sistema;
- 3- Lavar a coluna com 5mL de água bidestilada, etanol seco, carbonato de sódio 0,1M e água bidestilada, separadamente;
- 4- Padronizar previamente a solução do metal a ser percolado;
- 5- Percolar a solução do metal na coluna (volume e concentração desejados) e coletar a alíquota completando o volume para 25mL;
- 6- Percolar 5mL dos seguintes eluentes: etanol seco, HCl 0,0001 a 0,1N e água bidestilada, coletando um total de 10 alíquotas separadamente e completando-as para 25mL.

Determinação da Concentração do Metal

- 1- Separar 3 amostras de 1mL de cada alíquota coletada, colocando-as em 3 béquers;
- 2- Adicionar uma pequena quantidade de hexametenotetramina em cada béquer contendo as amostras e completar o volume para 20mL com água bidestilada;
- 3- Adicionar 5 gotas de HCl 0,1N e 2 gotas do indicador indicado para a solução do metal percolado (descrito em material);
- 4- Titular cada amostra com uma solução de EDTA 0,01M e anotar o volume gasto;
- 5- Tirar a média aritmética do volume de EDTA gasto nas 3 amostras de cada alíquota e determinar a quantidade de moles do metal;
- 6- Após determinação da quantidade de metal em cada alíquota, determinar a quantidade de metal que foi adsorvido na coluna;
- 7- Distribuir os dados obtidos numa tabela;
- 8- Lavar a coluna (descrito em processo de montagem) e percolar outra solução de metal;
- 9- Repetir o mesmo procedimento, tendo o cuidado de utilizar o indicador adequado a cada solução de metal percolado (decriso em material);
- 10-Fazer um quadro demonstrativo com todos os metais percolados;
- 11-Construir um gráfico com os dados obtidos ($N_f \times N_{ad}$).

BIBLIOGRAFIA

- 1- Santos, M.R. de M.C. Imobilização de Uréia, Metiluréia e 1,3-Dimetilluréia sobre Sílica Gel: Síntese, Caracterização, Quimissorção de Cátions Divalentes e Termoquímica, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1992.
- 2- Shekhovtsova, T. N. The Use of Immobilized Enzymes for Dertermination of Metal Ions. Journal of Analytical Chemistry, v. 49,p. 709-714, 1994.

4-DISCUSSÃO

A região nordeste é rica em espécies vegetais supostamente possuidoras de atividades biológicas e farmacológicas. Muitas espécies são produtoras de substâncias químicas, resinas, óleos essenciais, podendo apresentar propriedades farmacológicas.

A história do aproveitamento da espécies vegetais é muito antiga, e durante muito tempo algumas espécies que antes passavam despercebidas converteram-se mais recentemente, em objetos de pesquisa científica.

No presente trabalho fizemos um levantamento florístico da Fazenda Sono, situada no município de Demerval Lobão-PI, objetivando pesquisar a presença da enzima urease nas espécies arbóreas pertencentes às Leguminosas de uma região de cerrado do Piauí. De acordo com os resultados apresentados na tabela 01, foram identificadas um total de 30 espécies arbóreas distribuídas entre as famílias Mimosaceae, Caesalpiniaceae e Fabaceae cujas sementes foram avaliadas quanto a presença de atividade ureásica.

Os dados obtidos na pesquisa para atividade ureásica mostrados na tabela 02, indicam que: a maioria das espécies de Leguminosas estudadas apresentou resultado negativo para a presença de atividade ureásica; das

espécies arbóreas analisadas apenas as 7 espécies **Anadenanthera** sp, **Plathyenia reticulata** Benth. e **Piptadenia obliquo** (Pers.) Macbr. (Mimosaceae), **Copaifera luetzelburgii** Harms, **Copaifera** sp e **Senna** sp (Caesalpinaceae) e **Vatairea macrocarpa** (Benth) Ducke (Fabaceae) apresentaram atividade ureásica utilizando-se a uréia como substrato.

Verificamos que a atividade enzimática apresentada pelas sementes das referidas espécies é abolida quando submetida a altas temperaturas e inibida quando incubada com mercuriais orgânico (timerosal) e inorgânico (HgCl_2), mas que a perda de tal atividade é revertida com o uso de ditioneitol (DTT), reagente que tem a capacidade de restaurar a integridade de grupos sulfidril (SH), essenciais à atividade enzimática. Verificamos ainda que a mesma não é observada quando utilizamos a tiouréia (derivado da uréia) como substrato comprovando a especificidade da enzima. Segundo Soares e colaboradores⁽⁷⁾ a referida atividade é desempenhada por uma enzima termolábil pois é abolida totalmente pelo calor e depende da integridade de grupo(s) sulfidril(s), no que concordamos plenamente. Com isso, ampliamos o uso da enzima tanto na forma livre quanto imobilizada, conforme demonstram os modelos de unidades experimentais propostos (Roteiros Práticos de N^{os} 01 a 08).

Os procedimentos realizados e os resultados obtidos nos conduziram à produção de modelos práticos experimentais aplicáveis ao ensino nas áreas biomédica e química. A metodologia experimental utilizada ao longo de todo o desenvolvimento da pesquisa, nos forneceu subsídios para a produção dos modelos experimentais, surgidos da necessidade de se desenvolver mais o ensino em áreas experimentais. A produção desses modelos tem por objetivo assegurar um maior rendimento em sala de aula como complemento ao ensino

teórico, visando criar condições para que o aluno possa desenvolver a capacidade de pensar e agir para construir seus conhecimentos, uma vez que a partir da observação e da experimentação o aluno desenvolve habilidades e atitudes científicas, numa tentativa de integrar conhecimentos relativos ao ensino teórico-prático. Os modelos propostos apresentam uma linguagem simples e de fácil compreensão e envolvem a aplicação de um material que devido a promoção de reações coloridas, torna-se muito importante pois constitui um recurso visual riquíssimo, permitindo uma participação mais ativa e interativa neste tipo de estratégia.

A aplicação da enzima urease em modelos de unidades experimentais (roteiros práticos), utilizando-se a enzima natural (extraída de plantas da nossa região) tanto na forma livre quanto na forma imobilizada, com certeza contribuirá muito para uma maior eficiência no processo de ensino-aprendizagem. Destinados inicialmente ao ensino de 3º grau, os mesmos podem ser adaptados ao universo do 2º grau. Acreditamos que trabalhos dessa natureza redimensionam o ensino experimental na área das Ciências Químicas e Biomédicas.

Nosso estudo, além da contribuição para a produção de excelente material para a aplicação no ensino em áreas experimentais, possibilita o fornecimento de dados básicos para uma avaliação sobre um maior e melhor aproveitamento das espécies de cerrado.

Conforme foi explicitado anteriormente, as Leguminosas são importantes fontes de substâncias químicas, resinas e proteínas, as quais podem ser utilizadas por apresentarem propriedades biológicas ou simplesmente como

fontes adicionais nas dietas dos grupos de baixa renda ou como fonte de alimento para bovinos, caprinos e ovinos.

A maioria das espécies da área amostrada, é utilizada como forragem para o gado bovino e caprino. Algumas espécies são utilizadas como medicinal e na produção de madeira para construção de cercas e casas. A espécie **Vatairae macrocarpa** (Benth.) Ducke, com maior atividade ureásica dentre as espécies pesquisadas, flora no período de julho a agosto e frutifica no período de agosto a setembro com grande produção de frutos. Esta espécie é utilizada na medicina popular e apresenta grande potencial madeireiro, o que desperta o interesse por novos dados a seu respeito.

No decorrer do trabalho abordamos algumas dificuldades enfrentadas por muitos pesquisadores ao trabalhar com enzimas. Tais dificuldades são devido a diversos fatores, como a baixa estabilidade no curso das reações, a estocagem e a mudanças de condições da reação enzimática sob variações de temperatura, pH, além do alto custo. Muitos esforços no sentido de conseguir estabilizar a atividade das enzimas foram feitos simultaneamente, pelo uso de estabilizadores especiais e principalmente pelo desenvolvimento de métodos para imobilização de enzimas⁽³⁰⁻³⁴⁾.

Dificuldade na preparação de muitas enzimas numa forma purificada ou parcialmente purificada e seu alto custo correspondente é uma barreira para a aplicação de enzimas, embora a produção comercial de muitas preparações de enzimas como catalase, glicose oxidase, urease e outras, já tenha sido iniciada. Com a flexibilidade no uso de enzimas não purificadas na forma de homogeneizados, pó cetônico, é possível desse modo, tornar o preço consideravelmente mais baixo, e mais simplificado os métodos enzimáticos de

análise. Um achado importante foi a verificação de que amostras de urease de *Cratylia mollis* Mart. e *Cratylia floribunda* Benth., obtidas na forma de pó cetônico, mantêm a atividade enzimática há mais de sete anos, mantidas em refrigerador.

Atualmente, a urease é usada principalmente na determinação da uréia, um substrato específico, com objetivo biomédico bem como para monitoração da qualidade da água de piscina. Recentemente, métodos de imobilização de enzimas tem sido utilizado com o objetivo de empregá-las com a vantagem de aumentar a estabilidade, bem como reduzir o custo nas análises. Na química, a literatura cita inúmeros estudos sobre urease bem como outras enzimas imobilizadas em vários suportes e com diferentes técnicas de imobilização para a determinação de metais e inibidores enzimáticos.

A pesquisa principalmente da enzima urease natural e suas aplicações na forma livre e imobilizada, constituiu-se um dos objetivos deste trabalho. Nosso propósito foi a obtenção da enzima urease isolada de algumas espécies de Leguminosas numa vegetação, cujo potencial econômico precisa ser explorado, e a partir desse ponto, buscar novos métodos de utilização prática de enzimas. Neste trabalho foi utilizado o agar-agar e a sílica gel como suportes para a imobilização da urease. Para imobilização no suporte agar-agar foi utilizado o método de oclusão e técnica de Shekhovtsova⁽³¹⁾. Para a imobilização da urease em sílica gel foi utilizado o tratamento da sílica em três preparações: tratamento com trietilamina e tampão fosfato; tratamento com glutaraldeído e tampão fosfato e tratamento com glutaraldeído, tampão fosfato e trietilamina com o objetivo de verificar se o tratamento melhora o ancoramento da enzima na matriz da sílica gel. Esta idéia de utilizar o

tratamento da sílica com trietilamina e tampão fosfato vem de trabalho realizado por Vinogradov e colaboradores⁽³²⁾ no qual foi utilizado a benzoquinona; o tratamento com glutaraldeído e tampão fosfato vem de trabalho realizado por Cormelato⁽³⁰⁾ e o tratamento com trietilamina, glutaraldeído e tampão foi por nós realizado a fim de testar uma maior capacidade de ancoramento da enzima na matriz da sílica. Das três preparações foi observado que utilizando-se o tratamento com o glutaraldeído ocorre uma melhora na capacidade de adsorção da urease suportada.

Os dois suportes utilizados apresentaram eficientes resultados na imobilização da enzima urease. Os métodos e os procedimentos utilizados para a imobilização da urease são simples e dado a sua eficiência nos permite sugerí-los para imobilização de outras enzimas.

As técnicas espectrofotométricas são importantes na caracterização de superfícies e essa técnica foi utilizada com o objetivo de caracterizar a urease suportada em sílica através da obtenção de espectros no infravermelho. Análises dos espectros obtidos na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} num espectrofotômetro Bomem mostraram como principais sinais a região de 2975-2921 cm^{-1} , banda referente a estiramento C—H, a qual não aparece na sílica pura, aparece no espectro da sílica aminada e é acentuadamente aumentada na sílica-urease, conforme mostra a figura 09 e uma banda em 1534 cm^{-1} , correspondente a estiramento C—N, banda esta que está ausente na sílica pura, muito fraca na sílica aminada e mais intensa na sílica urease.

Nessa etapa, o nosso objetivo era testar técnicas que garantissem a imobilização e um aumento na estabilidade da enzima possibilitando o uso e a recuperação da enzima para utilização posterior. A recuperação da enzima no

suporte sílica gel foi bem evidenciada quando testada a sua capacidade de adsorção do cátion metálico Co(II). Conforme mostrado no Quadro 01 a adsorção foi testada percolando-se 5,0 mL em solução etanólica de CoCl_2 na concentração de $3,361 \times 10^{-2}$ M por uma coluna contendo 0,5g da sílica, em fluxo constante de $2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Neste solvente a retenção do metal foi de 19,67%. Como eluente foram utilizados solução de HCl 10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1} M e água. O eluente mais eficaz foi o HCl em pH 3. A enzima foi lavada e repetido o procedimento por mais uma vez.

A urease imobilizada nos suportes agar-agar e sílica gel mantêm uma certa atividade enzimática. No suporte sílica gel ela garante uma boa reutilização. No suporte agar-agar ela também pode ser reutilizada, mas uma boa parte da enzima é perdida por um processo de difusão. Esta difusão pode ser causada pela variação do tamanho dos poros intersticiais do polímero.

5- CONCLUSÃO

A urease natural livre ou imobilizada oferece condições de solucionar alguns problemas relacionados ao emprego de enzimas em nossos laboratórios. Primeiro, pela facilidade de extração, e aplicabilidade da enzima natural e segundo pela praticidade dos processos de imobilização utilizando-se suportes de fácil obtenção e baixo custo no mercado nacional. Estamos desenvolvendo modificações técnicas para o método de oclusão a ser publicado em trabalhos futuros.

Acreditamos que a ampliação do universo de aplicações práticas experimentais no Ensino nas áreas Biomédica e Química, através da investigação sobre a utilização de urease extraída de sementes de Leguminosas do cerrado piauiense, possibilitará mais um passo no sentido de se fornecer dados que viabilizem uma prática interdisciplinar.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABREU, M.C.; MASETTO, M. T. O Professor Universitário em Aula: prática e princípios teóricos. 8a. edição, MGEEditores Associados, São Paulo, 1990.
- 2- BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermae do Brasil. Viçosa, Imprensa Universitária, 1984.
- 3- POLHILL, R. M. ; RAVEN, P. H. Advances in Legumes Systematics. England: Min. Agr., Fisheries and Food, 1981.
- 4- CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2ª ed. New York: New York Botanical Garden, 1988.
- 5- BRÁS, B.C. DA C.; CAVALCANTI, M.S.M.; TORQUATO, R. ; COELHO, L.C.B.B. Purificação e Caracterização Parcial da Lectina de Sementes de *Bauhinia variegata*. 45ª Reunião Anual, SBPC, 13-G.1.1, p.706, 1993.
- 6- PEIXOTO, J.C.N.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Conjugação da Lectina de *Cratylia mollis* Mart. à Peroxidase e Avaliação do Conjugado. 45ª Reunião Anual, SBPC, 13-G.1.1, p.707, 1993.

- 7- NUNES, P.H.M.; FELIX, J.C.; SOARES, E.O. Urease Activity From *Cratylia mollis* Mart. Seed Partial Purification. Anais Brazilian-Sino Symposium of Chemistry and Pharmacology of Natural Products, P-122, 1989.
- 8- SOARES, M.G.C.B.; PESSOA, W.S.; COELHO, P. J. P. Pesquisa de Atividade Ureásica em Sementes de *Cratylia mollis* Mart e *Cenostigma gardnerianum* Tul. Anais do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p.161-8, 1989.
- 9- SOARES, M.G.C.B.; PESSOA, W.S. Urease activity in a flour extract from the native bean seed *Canavalia obtusifolia* DC. Brasilian Journal of Medical and Biological Research, 19 (44-5): 568 A, 1986.
- 10- NOGUEIRA, R.T.; IMAMURA, P. Estudo Fitoquímico da *Hymenaea courbaril* var *stilbocarpa*. Instituto de Química, UNICAMP, 19ª Reunião Anual, SBQ, PN129, 1996.
- 11- ALMEIDA, S. P. DE; SILVA, J.A. DE; RIBEIRO, J.F. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, cagaita e jatobá. EMBRAPA/CPAC, Planaltina-DF, 1987.
- 12- PIO CORREA, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e Das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984.
- 13- ANDRADE, N.M. Ácidos Graxos em Sementes de *Acacia* e *Mimosa* (Leg. Mimo.) - XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p.278-9, 1994.

- 14- SILVA, L.M.I.; MENESES, M.E.M.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H.; OLIVEIRA, E.H. Estudo Químico de óleos Essenciais de Plantas do Cerrado Piauiense. V Seminário de Iniciação Científica, UFPI/CNPq, p.55, Teresina, 1996.
- 15- CARLINI, E. L. A. Estudos de Ação Anti-úlceras Gástricas de Plantas Brasileiras: *Maytenus ilicifolia* e outras. Brasília, CEME/AFIP, 1988.
- 16- MARINHO, L. C. Estudo Químico e Farmacológico do Extrato e Alcalóides Quinolizodínicos Isolados de *Bowdichia virgilioides* Kunth. Dissertação de Mestrado, UFPB, 1991.
- 17- MENESES OLIVEIRA, R. DE C.; GOMES, I.F.; CARVALHO, R. B.; NUNES, P.H.M. *Stryphnodendron coriaceum* Benth.: Efeito Protetor do Extrato da Casca contra Úlcera Gástrica Experimental por Indometacina em Rato. 47ª Reunião Anual, SBPC, D.2-479, 1995.
- 18- NUNES, P.H.M.; GOMES, I.F.; CARVALHO, R.B. DE; MENESES-OLIVEIRA, R.DE C. *Stryphnodendron coriaceum* Benth.: efeito do extrato aquoso e hidroalcoólico da casca em úlcera gástrica experimental. XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 10.013, Caxambu-MG, 1996.
- 19- CARVALHO, R.B.; NUNES, P.H.M.; GOMES, I.F.; OLIVEIRA, R.C.M. *Stachytarpheta cayennensis* e *Stryphnodendron coriaceum* Benth.: Efeito dos Extratos Aquosos em Úlcera Gástrica Experimental e na Cicatrização de Feridas Cirúrgicas. V Seminário de Iniciação Científica, UFPI/CNPq, p.59, Teresina, 1996.

- 20- CASTRO, A. A. J. F. Comparação Florístico-Geográfica (Brasil) e Fitossociológica (Piauí - São Paulo) de Amostras de Cerrado. Tese de doutorado, UNICAMP, 1994.
- 21- CASTRO, A. A. J. F. Florística e Fitossociologia de um cerrado marginal brasileiro, parque estadual de Vaçununga, Santa Rita do Passa Quatro Dissertação de Mestrado , Departamento de Botânica, UNICAMP, 1987.
- 22- VIEIRA, R. F. Banco de Germoplasma de Plantas Medicinais do Cerrado. XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, P-210, 1994.
- 23- JENRICH, H. Vegetação Arbórea e Arbustiva nos Altiplanos das Chapadas do Piauí Central: características, ocorrência e empregos. GTZ Brasil/Alemanha, 1989.
- 24- RIZZINI, C.T. Árvores e Arbustos do Cerrado. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v.38, p.63-77, 1971.
- 25- RIZZINI, C. T. Contribuição ao conhecimento das floras nordestinas. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v.28, p.137-93, 1976.
- 26- OLIVEIRA, M. E. A. Vegetação e Flora de uma Área de Transição Caatinga-Carrasco em Padre Marcos - PI. Dissertação de Mestrado , UFPE, 1995.
- 27- LEHNINGER, A. L. Princípios de Bioquímica . Editora Savier, São Paulo, 1986.
- 28- STRYER, L. Bioquímica. 3ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1992.
- 29- CONN, E. E. E STUMNPF, P. K. Introdução à Bioquímica. 4ª edição, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1980.

- 30- CORMELATO, M. H. Imobilização de Enzimas no suporte Crisotila. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1995.
- 31- SHEKHOVTSOVA, T. N. The Use of Immobilized Enzymes for Determination of Metal Ions. Journal of Analytical Chemistry, v. 49, p.709-14, 1994.
- 32- VINOGRADOV, E. L.; GAVRYUCHENKOVA, L.P.; MAL'KO, E.T.; ZAITSEV, P.I.; BRITSYNA, N.S; VOROB'EV, V. P. Film Carriers for Immobilization of Enzymes. UDC, p.683-88, Plenum Publishing Corporation, 1985.
- 33- LOB, A.; MOTTOLA, H. A. Continuous-Flow Analysis for Uric Acid Biological Fluids, with Immobilized Uricase in a Closed-Loop System. Anal. Chem. v.52, p.2332-6, 1980.
- 34- COTTON, F. A.; WILKINSON, G. Advanced Inorganic Chemistry, 5ª edição, Editora Wiley Luteiscience, USA, 1988.
- 35- PENTEADO, J. F. *Helicobacter pylori*, a bactéria responsável por gastrites e úlceras. Revista Digest coletânea, Ano 1, N°2, p.23-5, 1995.
- 36- BARBOSA, A. J. A. *Helicobacter pylori*: a bactéria do estômago. Revista Ciência Hoje v.14, p.38-45, 1992.
- 37- CATANEO, A. C.; ROSSI, C., CATANEO, A.; NOVELLI, E.L.B.; PINTO, V.A.O. Atividade de Urease e Níveis de Arginina em Feijoeiros Pulverizados com Biureto. 45ª Reunião Anual, SBPC, G.1.1, p.714, 1993.
- 38- SUMNER, J. B. The isolation an crystallization of the enzymen urease. Journal of Biological Chemistry, v. 69, p.435, 1926.

- 39- NAOUM, P.C. Eletroforese: Técnicas e Diagnósticos. 1ª edição, Livraria Editora Santos, São Paulo, 1990.
- 40- SANTOS, M. R. DE M. C. Imobilização de Uréia, Metiluréia e 1,3-Dimetilluréia sobre Sílica Gel - Síntese, Caracterização, Quimissorção de Cátions Divalentes e Termoquímica . Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1992.
- 41- FILGUEIRAS, S. T., BROCHADO, A. L., NOGUEIRA, P.H; GUALA II, G.F. Caminhamento: um método expedito para levantamentos florísticos qualitativos. Cadernos de Geociências, IBGE, vol.12, p.39-43, 1994.
- 42- NILLKOL´SKAYA, E.B., EVTYUGIN,G.A.; SHEKHOVTSOVA, T.N. Problems and Prospects of Application of Enzymes to Environmental Analysis. Zhurnal Analiticheskoi Khimii, vol. 49, p.452-61, 1994.
- 43- ASSUMPÇÃO, R.M.V.; MORITA, T. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: padronização, preparação, purificação. Editora Edgard Blücher , USP, 1986.

ANEXO I

Lista das famílias e espécies presentes na Fazenda Sono, situada no município de Demerval Lobão - PI. As famílias estão ordenadas segundo o sistema filogenético de Cronquist (1981).

FAMÍLIA / ESPÉCIES	NOME VULGAR	HÁBITO / Nº TEGB
MORACEAE		
<i>Brosimum</i> sp	Inharé	Árvore
CACTACEAE		
<i>Cereus peruvianus</i> Mill.	Mandacaru	
DILLENIACEAE		
<i>Curatela americana</i>	Lixeira	Árvore 8326
CARYOCARACEAE		
<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	Piquí	Árvore
CLUSIACEAE		
<i>Platonia insignis</i> Mart.	Bacuri	Árvore
TILIACEAE		
<i>Luehea divaricat a</i> Mart.	Açoita Cavalo	Arbusto
STERCULIACEAE		
<i>Guazuma</i> sp	Mutamba	Arbusto
MALVACEAE		
LECYTHIDACEAE		
<i>Lecythis pisonis</i> Cam.	Sapucaia	Árvore

FLACOURTIACEAE

Casearia sp ? Arbusto

MIMOSACEAE

Anadenanthera sp Angico preto Árvore 9525
 Enterolobium ellipticum Benth. Tamboril Árvore
 Parkia plathycephala Benth. Faveira, F. de Bola Árvore
 Piptadenia obliquo (Pers.) Macbr. Rama Bezerra Árvore
 Piptadenia sp. Angico branco Árvore
 Pithecolobium acutifolium Benth. Bordão de Velho Árvore
 Plathymentha foliolosa Candeia Árvore 9521
 Stryphnodendron coriaceum Benth. Barbatimão Árvore 9529
 Pithecellobium foliolosum Benth. Arapiraca, Rosca Árvore

CAESALPINIACEAE

Caesalpinia ferrea Mart. Jucá, Pau ferro Árvore
 Cassia grandis L. Canafístula Árvore 8224
 Cenostigma macrophyllum Tul Caneleiro Árvore
 Copaifera luetzelburgii Podoi Árvore
 Dimorphandra gardineriana Tul. Fava Danta Árvore 9526
 Hymenaea courbaril var. stilbocarpa Jatobá Árvore
 H. stigonocarpa Mart. Jatobá Árvore
 Hymenaea sp Jatobá Árvore 9528/8324
 Martiodendron parvifolium (Benth.) Gleason Quebra machado Árvore 9524
 Peltogyne sp Jatobá Árvore 8323/9519
 Sclerolobium paniculatum Vog. Pau Pombo Árvore

FABACEAE

Andira retusa Kunth. Angelim Árvore
 Bowdichia virgilioides Kunth. Sucupira Árvore 9434
 Dioclea sp Mucunã Trepadeira
 Dypterix alata Vog. Banha de galinha Árvore
 Machaerium acutifolium Vog. Violete Árvore 9527

Machaerium sp	Jacarandá	Árvore
Vatairea macrocarpa (Benth.) Ducke	Amargoso	Árvore
MYRTACEAE		
Psidium sp	Araçá	Arbusto
COMBRETACEAE		
Bucherravia capitata (Vahl.) Eichl.	Mirindiba	Árvore
Banisteriopsis sp	Mofumbo	Arbusto
Compretum leprosum	Mofumbo	Arbusto
Combretum sp.	Mofumbo	Arbusto
Terminalia fagifolia Mart.	Chapadeiro	Árvore
OLACACEAE		
Ximenia americana L.	Ameixa brava	Arbusto
OPILIACEAE		
<i>Agonandra brasiliensis</i> Meiers	Marfim	Árvore
EUPHORBIACEAE		
Croton sp	?	Arbusto
MALPIGHIACEAE		
Byrsonima crassifolia	Murici	Arbusto 8325
VOCHYSIACEAE		
Calisthene fasciculata	Capitão de Campo	Arvoreta 8327
Qualea parviflora Mart.	Pau-terra da folha miúda	Árvore
Q. grandiflora Mart.	Pau-terra da folha larga	Árvore
SAPINDACEAE		
Magonia glabrata St. Hil.	Tinguí	Árvore
ANACARDIACEAE		
Anacardium microcarpum	Cajuí	Árvore
A. occidentale	Cajú	Árvore
Myracrodruon urundeuva Fr. All.	Aroeira	Árvore
Astronium sp	Gonçalo Alves	Árvore
APOCYNACEAE		
<i>Hancornia</i> sp	Mangabeira	Arbusto

VERBENACEAE

Vitex flavens

Mamacachorra Arbusto

BIGNONIACEAE

Anemopaegma glaucum

Catuaba Arbusto

Tabebuia sp.

Pau d'arco amarelo Árvore

Tecoma violacea Hub.

Pau d'arco roxo Árvore

RUBIACEAE

Tocoiena formosa var. tomentosa

Jenipapinho Árvore

POLYGONACEAE

Triplaris sp

Pajeú Árvore / 8223