



Catalisando a Hidrólise da Uréia em Urina

Vanessa Vivian de Almeida, Elton Guntendorfer Bonafé, Flávia Braidotti Stevanato, Nilson Evelázio de Souza, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Makoto Matsushita e Jesuí Vergílio Visentainer

Neste artigo, é proposto um experimento simples realizado com material de fácil aquisição para ilustrar a hidrólise da uréia em urina catalisada pela urease extraída de sementes de melancia.

► semente de melancia, urina, uréia ◀

Recebido em 4/9/06, aceito em 1/4/08

Na natureza, constatamos transformações químicas ocorrendo o tempo todo ao nosso redor. Enquanto algumas dessas transformações acontecem rapidamente (como a explosão da dinamite), outras são mais demoradas como, por exemplo, a formação do petróleo. Podemos destacar ainda as

transformações que se desenvolvem numa velocidade moderada, como a deterioração dos alimentos por bactérias. Por sua vez, a velocidade das reações de degradação de alimentos de origem vegetal (como frutas e verduras) pode ser mais ou menos rápida, dependendo de fatores existentes no meio como, por exemplo, atividade

de água, temperatura e composição do alimento.

A Cinética Química é uma ciência que estuda a velocidade das reações químicas e os fatores que as influenciam. Dentre os diversos fatores que interferem na velocidade de uma reação (temperatura, concentração de reagentes, superfície de contato, entre outros), podemos destacar a presença de catalisadores.

Catalisadores são substâncias que aumentam a velocidade das reações químicas e não são consumidos durante o processo, sendo regenerados no final. Eles atuam diminuindo a barreira de energia necessária aos reagentes para que ocorra a transformação química, como mostra a Figura 1. Essa energia é chamada de energia de ativação, ou seja, é a energia mínima necessária para que os reagentes possam se transformar em produtos. Caso a reação ocorra sem a presença de um catalisador, a energia de ativação é maior, diminuindo assim a velocidade da reação.

Ao atingir a energia de ativação, é formado o complexo ativado, que é uma estrutura intermediária entre os reagentes e os produtos, com

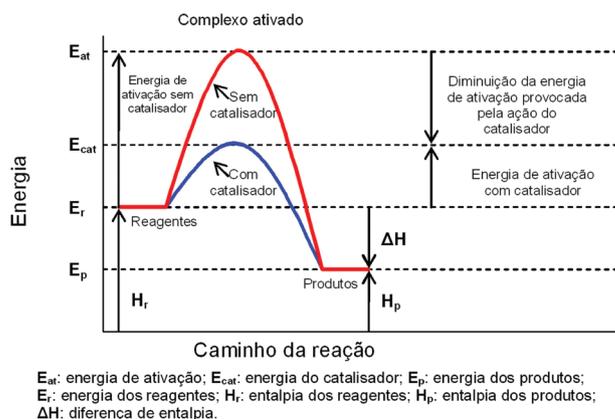


Figura 1: Efeito do uso de catalisadores na velocidade da reação química.

A seção "Experimentação no ensino de Química" descreve experimentos cuja implementação e interpretação contribuem para a construção de conceitos científicos por parte dos alunos. Os materiais e reagentes usados são facilmente encontráveis, permitindo a realização dos experimentos em qualquer escola. Neste número, a seção apresenta dois artigos.

ligações intermediárias entre as dos reagentes e as dos produtos. O complexo ativado apresenta uma energia mais alta para a molécula ou o elemento original. Esse aumento de energia, chamado de entalpia de ativação ΔH , representa exatamente a energia necessária para quebrar as ligações na molécula e formar o complexo ativado, que se decompõe posteriormente nos produtos.

Sendo catalisadores celulares poderosos, as enzimas são proteínas especializadas em acelerar reações biológicas e geralmente atuam especificamente em um dado substrato. O substrato liga-se à enzima num sítio especial desta, chamado sítio ativo, onde ocorre a reação enzimática. Essa é a região da enzima que possui certos aminoácidos que se ligam ao substrato por ligações não covalentes (Motta, 2006).

Características da urease

A urease é uma enzima que, em meio aquoso, catalisa a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono (Figura 2) e ocorre em algumas sementes, tais como soja, melão, melancia, entre outras. Algumas enzimas requerem um componente não protéico para sua atividade denominado cofator. O cofator enzimático da urease é o íon metálico Ni^{2+} (Ciurli e cols., 1999), portanto, a presença

de íons de níquel ativa o sítio da urease e é essencial tanto para a atividade funcional como para a integridade estrutural dessa enzima.

Além de ter sido a primeira enzima isolada na forma cristalina, em 1926, a urease é uma substância extensamente estudada, devido à sua aplicabilidade na agricultura e na medicina. Atualmente a urease é utilizada em procedimentos de diagnósticos clínicos, na determinação de uréia em fluídos biológicos como urina e sangue. A hidrólise da uréia, empregando essa enzima como biocatalisador, na temperatura de 20°C , é até 10^{14} vezes mais rápida que a hidrólise realizada em meio ácido a uma temperatura de 60°C (Souza e Fatibello-Filho, 2006).

A urina humana é constituída de 2 a 5% em uréia. Essa é a forma utilizada pelo metabolismo do organismo para eliminar os resíduos nitrogenados indesejáveis produzidos a partir das proteínas. Atualmente, a uréia é utilizada como suplemento na alimentação de animais, na agricultura (como fertilizante), na fabricação de plásticos, na indústria farmacêutica, entre outros (Peruzzo e Canto, 1999).

Influência do meio sobre a atividade enzimática

A estrutura e a forma do sítio ativo das enzimas são decorrentes da estrutura tridimensional da enzima e podem

ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isso torna a atividade enzimática dependente do meio em que se encontra, notadamente do pH e da temperatura.

Efeito do pH sobre a atividade enzimática

Geralmente as enzimas são ativas em uma estreita faixa de pH e, na maioria dos casos, há um pH ótimo definido. A Figura 3 apresenta a curva do efeito do pH na atividade enzimática. Podemos verificar que o pH ótimo da enzima é definido pelo máximo da curva. Um estudo sobre purificação de urease obtida de sementes de melancia verificou que essa enzima possui atividade ótima em pH 8,0 (Mohamed e cols., 1999).

O efeito do pH sobre a atividade enzimática se deve às variações no estado de ionização dos componentes do sistema e à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas, contêm inúmeros grupos ionizáveis e existem em diferentes estados de ionização. Por isso, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH.

É importante destacar, contudo, que a estabilidade da enzima ao pH ótimo depende inclusive de muitos fatores como temperatura, força iônica, concentração de íons metálicos, concentração de substratos ou cofatores da enzima, contaminantes (metais pesados e fluoreto, acima de $2,0\text{ mg/dL}$, são inibidores da urease), entre outros (Bioclin, 2006).

Efeito da temperatura sobre reações enzimáticas

O efeito da temperatura sobre a cinética de reação enzimática é resultado de dois eventos simultâneos.

O primeiro evento é caracterizado pelo aumento na velocidade da reação catalisada em resposta ao aumento da temperatura do sistema. A elevação da temperatura provoca o aumento da energia cinética das moléculas componentes do sistema. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a estrutura espacial da enzima.

No segundo evento, temperaturas mais altas levam à desnaturação enzi-

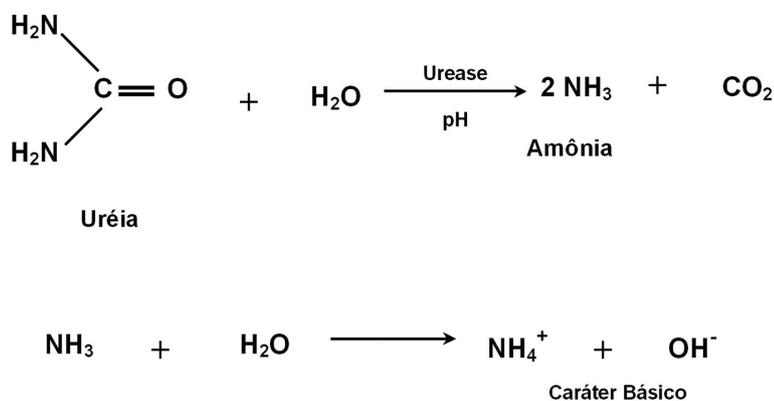


Figura 2: Reação de decomposição da uréia e caráter básico da amônia em meio aquoso.

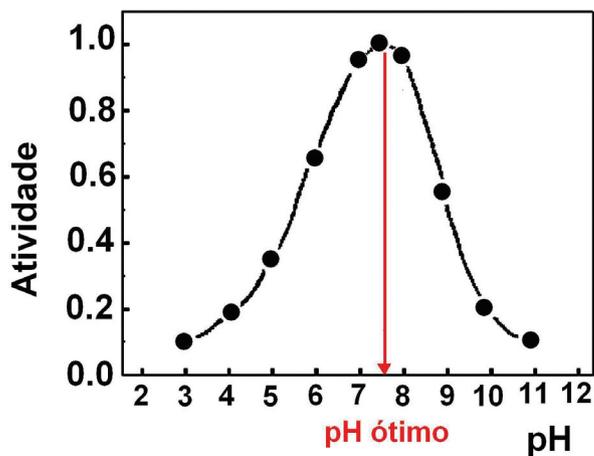


Figura 3: Curva do efeito do pH na atividade enzimática.

mática por alterarem as ligações que conservam a estrutura tridimensional da enzima. Após o rompimento das ligações de hidrogênio, que são termolábeis, desencadeia-se uma série de alterações na estrutura enzimática, levando a uma nova conformação ou a um estado conformacional indefinido.

A maioria das proteínas (incluindo as enzimas) é passível de desnaturação irreversível a temperaturas acima de 40°C ou 50°C, porém a temperatura ótima de uma enzima é um termo sem significado até que seja registrado o tempo de sua exposição a essa temperatura, assim como a composição do meio em análise, pH e força iônica, por exemplo (Morris, 1972). No estudo sobre urease extraída de sementes de melancia, Mohamed e colaboradores (1999) acompanharam o comportamento dessa enzima submetida à temperatura de 40°C durante 30 minutos em pH 7,5 e verificaram que não houve perda significativa da atividade enzimática. A mesma enzima, submetida a 80 °C por 5 minutos, teve perda total da atividade catalítica.

O experimento proposto neste artigo utiliza materiais de fácil acessibilidade e ilustra a reação de decomposição da uréia em urina humana, catalisada por urease obtida de sementes de melancia. Contudo, a utilização de urina deve ser tratada com devida atenção pelo professor, pois se trata de um substrato que apresenta diferenciados valores de pHs e concentração de sais. A reação

deve ser lenta caso o meio reacional interfira no sítio ativo enzimático, devido à ionização de aminoácidos na molécula que provoquem mudança da conformação da enzima.

Material e reagentes

- Estante para tubos de ensaio
- 4 tubos de ensaio
- Pipeta 5,0 mL
- Extrato de repolho roxo
- Sementes de melancia
- Solução aquosa de uréia 1,0% (a uréia pode ser facilmente adquirida em lojas de produtos agropecuários)
- Urina humana
- Liquidificador
- Filtro de papel
- Funil
- Erlenmeyer
- Álcool etílico (comercial)

Procedimento

- Para identificação, enumerar 4 (quatro) tubos de ensaio.
- Adicionar aproximadamente 100 mL de água e cerca de 40 sementes de melancia em um liquidificador e triturar por 15 segundos. Filtrar a mistura e recolher a parte líquida. Dividir a fração líquida em duas partes iguais e levar uma delas a ferver a 100°C por 1 minuto (inativação enzimática). Deixar em repouso para atingir a temperatura ambiente.
- Para a obtenção do extrato de repolho roxo, triturar no liquidificador 3 folhas de repolho roxo

picadas com aproximadamente 100 mL de álcool etílico comercial. Filtrar a mistura e utilizar o extrato alcoólico como indicador ácido-base. A extração das antocianinas (pigmentos da classe dos flavonóides, responsáveis pelas cores azul, violeta, vermelho e rosa de flores e frutas e indicadores ácido-base naturais) pode inclusive ser realizada por imersão da folha de repolho roxo em etanol, seguido de repouso por 24 ou 48 horas (Terci e Rossi, 2002; Couto e cols., 1998).

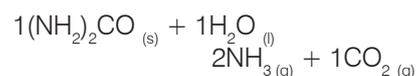
- Tubo 1** – No tubo de ensaio número 1, adicionar 1,0 mL de extrato de repolho roxo, 2,0 mL de urina recém-coletada e acrescentar 1,0 mL da fração líquida resultante da trituração de sementes de melancia em água (sem ferver). Agitar e observar a cada 10 minutos.
- Tubo 2** – No tubo de ensaio número 2, adicionar 1,0 mL de extrato de repolho roxo, 2,0 mL de urina recém-coletada e acrescentar 1,0 mL do líquido resultante da trituração de sementes de melancia (fervido). Agitar e observar a cada 10 minutos.
- Repetir os procedimentos (acima) para os tubos 3 e 4, substituindo a urina pela solução de uréia a 1%.

Resultados e discussão

Tubos de ensaio 1 e 3

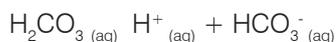
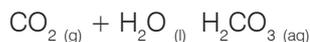
A enzima urease (ativa), em meio aquoso e em contato com o substrato, decompõe a uréia em amônia (NH₃) e dióxido de carbono (CO₂).

Pela estequiometria dessa reação química, verifica-se que a decomposição de um mol de uréia, em meio aquoso, origina a formação de dois mols de NH₃ e um mol de CO₂, conforme a reação:



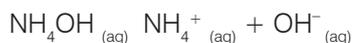
Sabe-se que o gás carbônico está presente na atmosfera e advém

naturalmente da respiração de animais, da decomposição de resíduos orgânicos e indiscriminadamente da queima de combustíveis fósseis. Além de ocasionar o efeito estufa, o gás carbônico (e outros gases poluentes) acidificam as águas das chuvas. O caráter ácido da molécula de CO_2 , em água, se deve à formação do ácido carbônico:



Em razão da presença de CO_2 no meio reacional, poderíamos esperar que houvesse uma variação do pH do meio para níveis inferiores ao pH 7,0 (neutro). Contudo, a mudança de coloração do indicador (passando de violeta para verde) indicou que o pH da solução aumentou para um nível igual ou superior ao pH 11,0 (indicando um pH maior do que sete – solução básica). A Tabela 1 apresenta a variação de cores do extrato de repolho roxo em diferentes pHs.

Podemos atribuir, portanto, o aumento do pH da solução à presença de amônia que, em meio aquoso, se ioniza, disponibilizando para a solução íons hidroxilas (OH^-):



Como a reação de decomposição da amônia libera quantidade de amônia duas vezes superior à quantidade de gás carbônico, o caráter predominante do meio reacional será básico, o que confere a coloração verde, observada nos tubos de ensaio 1 e 3.

Tubos de ensaio 2 e 4

Como a fração líquida da mistura de água e sementes de melancia foi submetida ao aquecimento, a enzima urease foi inativada pelo calor. Portanto, a reação representada na Figura 1 pode ocorrer, contudo, em menor velocidade. Não havendo liberação da hidroxila (OH^-) em solução, o pH resultante não será alterado, portanto, não é esperado mudança na coloração do indicador utilizado.

Tabela 1: Mudanças de cores do extrato de repolho roxo nas faixas de pH.

COR	FAIXA DE pH
Vermelho	1-4
Violeta	5-8
Azul	9-10
Verde	11-12
Amarelo	> 13

Fonte: Bernardino e cols., 2000.

Os resultados esperados nesse experimento podem ser observados na Figura 4.

Notas

De acordo com o *site* Diagnósticos da América (2006), normalmente o pH urinário varia entre 5,0 a 7,0. Valores elevados podem ser encontrados em dietas com grande ingestão de vegetais e frutas cítricas, na presença de cálculos renais e infecção das vias urinárias. Valores baixos de pH podem ser encontrados devido à perda de potássio, dieta rica em proteínas, infecção das vias urinárias por *Escherichia coli*, uso de anestésicos e de ácido ascórbico, assim como de outras drogas.

Questões propostas

1. Apresente suas observações sobre o aspecto visual das so-

luções observadas nos tubos de ensaio.

2. Se durante a decomposição da uréia é formado, além da amônia, dióxido de carbono, sendo este um dos responsáveis pela acidez das chuvas, qual a razão do meio ficar básico? Proponha uma explicação para o fenômeno.
3. De acordo com o experimento e as observações feitas, como você poderia definir uma enzima? Pesquise a definição de enzima e compare-a com sua resposta.

Vanessa Vivian de Almeida (va_vivian@yahoo.com.br), licenciada e bacharel em Química pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), mestre em Química (UEM), é professora do Ensino Médio no Colégio Estadual Pedro Viriato Parigot de Souza, em Marialva - PR. **Elton Guntendorfer Bonafé** é aluno do curso de licenciatura em Química (UEM). **Flávia Braidotti Stevanato** é bacharel em Química (UEM) e mestre em Química (UEM). **Nilson Evelázio de Souza**, licenciado em Química (UEM), mestre em Ciência de Alimentos (UEL), doutor em Química (UNICAMP), é docente do Departamento de Química da UEM. **Jeane Eliete Laguilha Visentainer**, graduada em Farmácia Bioquímica (UEM), mestre em Ciências Biológicas (UEM), doutora em Ciências Médicas (UNICAMP), é docente do Departamento de Análises Clínicas (UEM). **Makoto Matsushita**, licenciado em Química (UEM), doutor em Ecologia de Ambientes Aquáticos (UEM), é docente do Departamento de Química da UEM. **Jesuí Vergílio Visentainer**, licenciado em Química (UEM), mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFV), doutor em Ciência de Alimentos (UNICAMP), é professor do Departamento de Química da UEM.

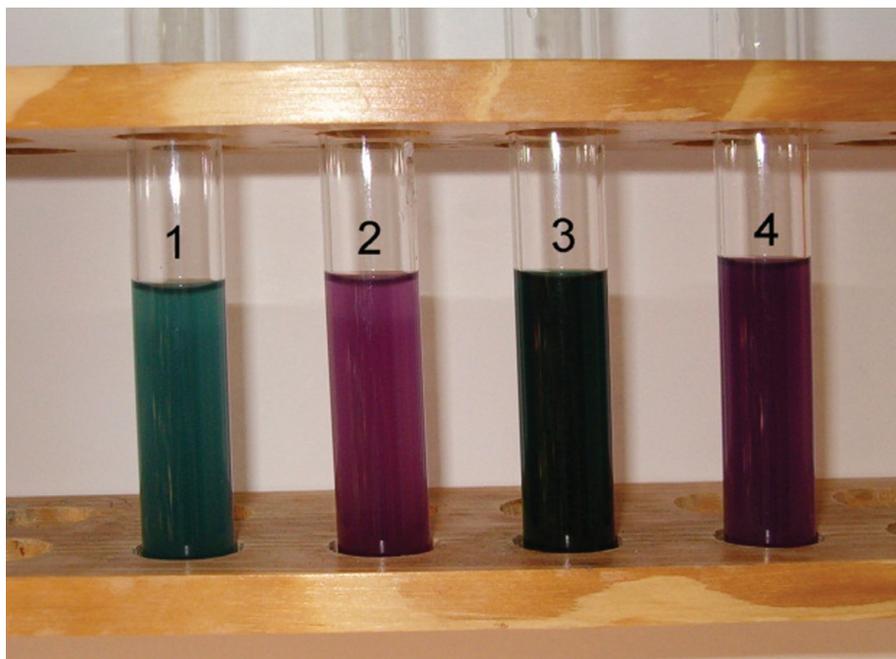


Figura 4: Resultados esperados nesse experimento.

Referências

- BERNARDINO, A.M.R.; PEREIRA, A.S.; ARARIPE, D.R.; SOUZA, N.A. e AZEVEDO R.V.D. *Antocianinas - papel indicador de pH e estudo da estabilidade da solução de repolho roxo*, 2000. Disponível em <<http://www.sbg.org.br/ranteriores/23/resumos/0256/index.html>>. (Acesso em 2000).
- BIOCLIN. Uréia Cinética, 2006. Disponível em <www.bioclin.com.br/iuso/ureiacinetica.pdf>. (Acesso em 2006).
- CIURLI, S.; BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W.R.; WILSON, K.S.; MELETTI, S. e MANGANI, S. Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 190-192, p. 331-355, 1999.
- COUTO, A.B.; RAMOS, L.A. e CAVALHEIRO, E.T.G. Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química. *Química Nova*, v. 21, n. 2, p. 221-227, 1998.
- DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA. *Urina*, 2006. Disponível em <http://www.diagnosticsdaamerica.com.br/exames/urina_elementos_anormais.shtml>. (Acesso em 2006).
- MOHAMED, T.M.; MOHAMED, M.A.; MOHAMED, S.A. e FAHMY, A.S. Purification of urease from water melon seeds for clinical diagnostic kits. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 215-223, 1999.
- MORRIS J.G. *Físico-Química para Biólogos*. Trad. M. N. Cipolli. São Paulo: Polígono, 1972.
- MOTTA, V.T. *Bioquímica Básica – Enzimas*, 2006. Disponível em <<http://www.laboratorioautolab.com/infomed/fulltext/3enzimas.pdf>>. (Acesso em 2006).
- PERUZZO, T.M. e CANTO, E.L. *Coleção base: Química*. São Paulo: Moderna, 1999.
- SOUZA, F.S. e FATIBELLO-FILHO, O. Obtenção, caracterização e purificação da enzima urease de feijão guandu (*Cajanus cajan* L. Milsp). Congresso de Iniciação Científica, 14, 2006, São Carlos. *Anais de Eventos da UFSCar*, v. 2, p.731, 2006.
- TERCI, D.B.L. e ROSSI, A.V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.

Para saber mais

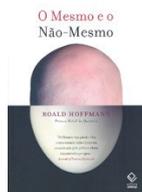
- FONSECA, M.R.M. *Interatividade química: cidadania, participação e transformação: volume único*. São Paulo: FTD, 2003.
- SILVA, E.R.; NÓBREGA, O.S. e SILVA, R.H. *Química: transformações e aplicações*. São Paulo: Ática, 2001.
- <http://www.ciagri.usp.br/~luagallo/Enzimas2.htm>. (Acesso em dezembro 2006).
- http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectos_gerais.pdf. (Acesso em dezembro 2006).

Abstract: *Catalyzing urea hydrolysis in urine*. In this article it is proposed a simple essay carried out with material of easy acquisition to show the urea hydrolysis from human urine catalyzed by urease extracted of watermelon seeds.

Keywords: watermelon seeds, urine, urea

Resenha

O mesmo e o não-mesmo



O autor, Roald Hoffmann, é professor de ciências médicas na Universidade de Cornell. Nasceu em uma cidade da Polônia em 1937, hoje pertencente à Ucrânia, vindo de uma família de origem judia. Imigrou para os EUA em 1949, tendo se bacharelado pela universidade de Columbia e se doutorado pela universidade de Harvard em 1960, onde trabalhou orientado pelo Nobel de Química, William Lipscomb. Em 1981, dividiu o prêmio Nobel de Química com Kenichi Fukui.

O livro *O mesmo e o não-mesmo* tem 341 páginas e é dividido em dez capítulos. Nessas páginas, Hoffmann vai desenvolvendo suas argumentações tentando explicar a um público hipoteticamente leigo sobre o que os químicos fazem e o que ele considera que seja o objetivo epistemológico da ciência Química.

Uma explicação sobre o motivo do título:

“[...] quer um ser humano racional possa ser ambivalente em relação aos produtos químicos, neles vendo coisas benéficas e prejudiciais, não é um sinal de irracionali-

dade, mas de humanidade. A utilidade e o perigo são os dois pólos de uma dualidade [...]. Dano ou proveito, dano ou proveito, são apenas uma das polaridades que tornam a química interessante.” (p. 14)

O coração da atividade da ciência Química é criar moléculas. Existem catalogadas cerca de 10 milhões de novas moléculas que não existiam nesse nosso mundo natural (p.125). A quantidade aproximada de nitrogênio fixado pelo processo Haber-Bosch é equivalente a todo o nitrogênio fixado por processos biológicos em todos os tempos (p. 287). Cerca de ¼ do PIB dos países industrializados é produzido pela indústria Química (p. 260). Sem dúvida, a Química mexe de maneira indelével com a natureza e com o destino das pessoas. Se todo esse nitrogênio não fosse fixado, não haveria certamente alimento para todos. Se esses milhões de novas moléculas não existissem, nossa vida seria diferente, para pior ou melhor? Hoffmann argumenta que a ciência e a tecnologia mudaram o mundo para melhor (com poucas conseqüências ruins). E vai mais além afirmando que a Química tem uma natureza *democratizante*. O mundo brutal e hostil do passado foi transformado para melhor de maneira a proporcionar uma vida com

mais qualidade para um maior número de pessoas.

O livro de Hoffmann também traz outras discussões importantes como o tema da redução da Química (item quatro), o qual ele se coloca como contrário, argumentando que o que a Química faz é substancialmente diferente do que a Física faz. Discute também a idéia de representação e realidade e afirma que o mais relevante nessa discussão é a comunicação entre os químicos, não exatamente saber se o que representamos é a realidade.

Por fim, acreditamos que esse livro deva ser uma leitura obrigatória para todos os químicos: professores de nível médio, formadores de professores, professores universitários e pesquisadores em geral. No entanto, o desejo de Hoffmann é que seu livro atinja os leigos em Química, o cidadão comum que, de posse de informações e reflexões contidas nesse livro, possa formar uma opinião mais qualificada sobre o que é que a ciência Química faz e, assim, poder fazer seu próprio julgamento.

Nelson Rui Ribas Bejarano (UFBA)

HOFFMANN, Roald. *O mesmo e o não-mesmo*. São Paulo: Ed. UNESP, 2007. 344p. ISBN: 9788571397613.