

## PURIFICAÇÃO DE UREASES DE SEMENTES DE *Zygia cauliflora*

Kemily Nunes da SILVA<sup>1</sup>  
José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>2</sup>  
Larissa Ramos CHEVREUIL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;  
<sup>2</sup>Orientador CDAM/INPA; <sup>3</sup>Colaboradora CDAM/INPA.

### INTRODUÇÃO

A família botânica Fabaceae é um dos grupos vegetais que apresenta amplo destaque na composição da flora da região Amazônica (Gonçalves *et al.* 2002; Marques *et al.* 2010). De modo geral, espécies pertencentes à essa família tem sido bastantes utilizadas visando o isolamento de metabólitos com atividade biológica, possibilitando a descoberta de novos compostos de origens orgânicas para a indústria de cosméticos, farmacêutica, alimentícia e madeireira (Barbosa *et al.* 2006; Chevreuil *et al.* 2011). O fato é que as Fabaceae são reconhecidamente concentradoras de proteínas e, as sementes por suas características de estocagem, são fontes importantes de moléculas nitrogenadas como as proteínas (Balasubramanian *et al.* 2013).

As ureases (EC 3.5.1.5) são metaloenzimas, níquel dependentes, responsáveis por catalisar a hidrólise da ureia, liberando amônia e carbamato, o qual espontaneamente se decompõe para formar dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia (Balasubramanian *et al.* 2013; Martinelli *et al.* 2014; Gupta *et al.* 2015). A unidade básica das ureases isoladas de plantas é de uma única cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos e massa molecular de 90 kDa, onde a forma mínima dessa enzima expressando atividade enzimática é de um trímero de 270 kDa (Follmer 2008; Carlini e Ligabue-Braun 2016). Essas proteínas podem ser encontradas em diferentes tecidos vegetais como folhas, caules, raízes e sementes. Em plantas, as ureases apresentam-se em duas formas, como ureases ubíquas, presente em todos os tecidos do vegetal e está associada diretamente ao processo de nutrição, ao passo que a urease embrião-específica, está presente apenas nas sementes, e assume, principalmente, a função de defesa da planta contra o ataque de insetos e patógenos (Polacco e Winkler 1984; Witte 2011).

No que diz respeito à defesa vegetal, as ureases tem se destacado quanto à sua ação biológica contra fungos, sendo esta atividade descrita como ocorrendo em doses micromoleculares a nível intracelular, o que torna essas proteínas de 2 a 3 ordens de grandeza mais potentes do que quaisquer outras proteínas antifúngicas conhecidas de origem vegetal, ocasionando lesões na membrana celular dos microorganismos (Postal *et al.* 2012; Galvani *et al.* 2015).

Estudos envolvendo a atividade de ureases e suas possíveis ações antifúngicas já estão bem estabelecidos para sementes de espécies agrônômicas como *Canavalia ensiformis* e *Glycine max* (Becker-Ritt *et al.* 2007). Contudo, permanece uma lacuna quanto ao conhecimento do potencial bioquímico e/ou biotecnológico das ureases provenientes de sementes de espécies de Fabaceae pertencentes à flora Amazônica, onde a bioprospecção e purificação de ureases é o primeiro passo para promover o uso mais adequado de espécies florestais tendo em vista questões biotecnológicas a partir de diferentes materiais biológicos. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo identificar a atividade ureolítica e purificar as ureases presentes em sementes de *Zygia cauliflora*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo e as análises foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímicos Vegetais (LFBV-INPA). As sementes de *Zygia cauliflora* foram coletadas no município de São Gabriel da Cachoeira – Amazonas, sendo 00° 12' 57,0" S e 66° 46' 94,4" O as coordenadas da área.

As sementes foram trituradas em moinho analítico (M20/MILL/Universal, Sovereign Brasil) até a obtenção de material finamente pulverizado, o qual foi submetido à extração em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 (5% p/v) (Tampão A) sob homogeneização em banho de gelo durante 2 h. A suspensão foi centrifugada a 15.000 g durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante teve o pH ajustado para 7,5, obtendo-se, então, o extrato proteico. A concentração de proteínas foi estimada a partir da incubação das amostras (20 a 100 µL) com 3,0 mL do reagente de Bradford (Sigma) durante 10 min à temperatura ambiente (26 ± 3 °C), utilizando-se a Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão. O teor de proteínas solúveis foi determinado por meio de leituras espectrofotométricas a  $\lambda = 595$  nm (UV/Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). Esse extrato proteico, inicialmente, foi submetido à precipitação em acetona gelada (28% v/v) e a suspensão foi mantida em repouso durante 2 h à temperatura ambiente (26 ± 3° C). Posteriormente, o material foi centrifugado a 15.000 g durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, resultando no extrato bruto.

O extrato bruto, anteriormente obtido, (3 mL) foi homogeneizado em resina Q-Sepharose (5 mL) e submetidos à agitação em banho de gelo durante 30 min. Após esse período, a mistura foi filtrada em filtro poroso e a resina lavada, consecutivamente, com 150 mM NaCl, 300 mM NaCl e 500 mM NaCl em Tampão A (fosfato de sódio 50 mM pH 7,5). As frações obtidas foram concentradas em cartuchos centriprep (Vivaspin 20/50 kDa MWCO, GE Healthcare).

Adicionalmente, o extrato bruto foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-50 em coluna de vidro (0,85 x 25,5 cm), a um fluxo de 30 mL.h<sup>-1</sup> em tampão A. A cromatografia foi monitorada a partir de leituras espectrofotométricas a  $\lambda = 280$  nm (UV/Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences) e frações com atividade ureolítica foram concentradas em cartuchos centriprep (Vivaspin 20 50 kDa MWCO, GE Healthcare). As frações obtidas dessa cromatografia e que apresentaram atividade ureolítica foram, posteriormente, submetidas à cromatografia de troca iônica em resina de Q-Sepharose e CM-Sepharose. Ambas as cromatografias foram realizadas em coluna de plástico (10 mL), a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, utilizou-se tampão de eluição contendo, respectivamente, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, 300 mM NaCl, 400 mM NaCl, 500 mM NaCl e 1 M NaCl em tampão A.

A atividade de ureases, tanto para os extratos quanto para as frações obtidas, foi determinada a partir da medida colorimétrica da amônia liberada, utilizando o método do fenol-nitroprussiato-hipoclorito e uma curva padrão com sulfato de amônio (Weatherburn, 1967). Para determinar a atividade de ureases, incubou-se 100 µL de amostra com 5 mL da solução A contendo fenol e nitroprussiato de sódio, seguida de forte agitação. Posteriormente, 5 mL da solução B contendo hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio foi adicionado, retomando nova agitação. As reações foram incubadas a 37 °C durante 20 min e, então, realizadas leituras espectrofotométricas a  $\lambda = 625$  nm (UV/Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). Uma unidade de atividade de urease corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de amônia por minuto em pH 7,5 a 37 °C.

Os géis de poli(acrilamida) (géis de concentração e separação) foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8%. O gel de concentração a 5% foi preparado em

tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o gel de separação 15%, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20%. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10%. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 1% de SDS, 10% de glicerol e 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol e, posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 min. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1%, a 200 volts, 15 mA/gel, durante 2 h. Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue dissolvido em ácido acético 0,1%; etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v) durante 2 h e descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v). Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega (10 – 225 kDa).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto de sementes de *Z. cauliflora* foi submetido à diferentes metodologias de preparo de amostra (precipitação por acetona) e isolamento de proteínas (cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular) na tentativa de se obter uma urease pura ou, pelo menos, parcialmente pura (Tabela 1). Após a aplicação dessas diferentes metodologias observou-se perda total da atividade de ureases em comparação ao obtido no extrato bruto (Tabela 1), ao passo que a concentração de proteínas foi reduzida à metade após a precipitação por acetona e em 15 e 47 vezes após cromatografia de troca iônica em Q-sepharose a 150 e 500 mM de NaCl e 300 mM de NaCl, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Etapas de tratamento da amostra para purificação de ureases de sementes de *Z. cauliflora*

Amostra	Concentração de proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade de urease (mU mg de proteína <sup>-1</sup> )
Extrato proteico	4,7 ± 0,33	0,2 ± 0,01
Precipitado acetônico	2,1 ± 0,20	Nd
150 mM NaCl	0,3 ± 0,20	Nd
Q-sepharose 300 mM NaCl	0,1 ± 0,05	Nd
500 mM NaCl	0,3 ± 0,30	Nd

Nd: Não detectada.

Após tentativas sem sucesso na purificação das ureases, o extrato bruto foi, então, submetido à cromatografia de exclusão molecular, aplicando-se a técnica clássica de cromatografia líquida em bancada, resultando em um único pico (Figura 1).

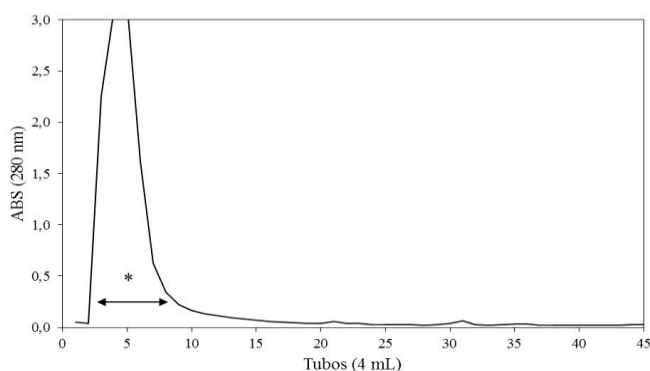


Figura 1. Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50 do extrato proteico de sementes de *Z. cauliflora*. \*Frações submetidas à detecção da atividade de ureases.

As frações que compõe este pico foram submetidas, separadamente, à detecção de ureases, sendo possível observar atividade em quatro frações, com destaque para a de número 5, a qual apresentou alta atividade ureolítica, sendo 10 vezes superior ao encontrado no extrato bruto (Tabela 2). No que diz respeito à concentração de proteínas, a fração número 3 foi a que apresentou maior conteúdo proteico, contudo, não foi observado atividade de ureases (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de proteínas e atividade de ureases nas frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50 do extrato proteico de *Z. cauliflora*.

Frações	Concentração de proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade de urease (mU mg de proteína <sup>-1</sup> )
3	13,8 ± 1,2	Nd
4	3,8 ± 1,1	0,33 ± 0,02
5	2,2 ± 0,2	2,03 ± 0,18
6	1,0 ± 0,5	0,11 ± 0,13
7	4,3 ± 4,5	0,05 ± 0,00

Nd: Não detectado.

Na tentativa de purificar as ureases de forma mais eficiente, as frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular (Figura 1) foram submetidas a cromatografias de troca iônica em Q-Sepharose e CM-Sepharose, aplicando-se a técnica clássica de cromatografia líquida em bancada (Tabela 3). Após a aplicação das frações com atividade ureolítica nessas diferentes resinas, foi observado um único pico, sendo ele nas frações não retidas; ou seja, não houve interação da proteína com a resina.

Tabela 3. Concentração de proteínas e atividade de ureases nas frações provenientes da cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose e CM-Sepharose das frações contendo atividade ureolítica obtidas da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50 do extrato proteico de *Z. cauliflora*.

Amostra	Concentração de proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade de urease (mU mg de proteína <sup>-1</sup> )
Fração com atividade de urease	2,7 ± 0,3	2,01 ± 0,7
Q-Sepharose	Não retido	0,06 ± 0,8
	100 mM NaCl	*
	200 mM NaCl	*
	300 mM NaCl	*
	400 mM NaCl	*
	500 mM NaCl	*
	1 M NaCl	*
CM-Sepharose	Não retido	0,09 ± 0,7
	100 mM NaCl	*
	200 mM NaCl	*
	300 mM NaCl	*
	400 mM NaCl	*
	500 mM NaCl	*

Nd: Não detectada. \* Frações não submetidas à quantificação de proteínas.

Ureases isoladas de sementes são comumente obtidas aplicando-se diferentes métodos voltados à purificação de proteínas, dentre eles, os mais utilizados consistem em precipitação por acetona e sulfato de amônio em diferentes concentrações e cromatografias líquidas de exclusão molecular, troca iônica e afinidade, como por exemplo, as ureases de sementes de *Pisum sativum* obtidas após as etapas de precipitação em acetona com 50% de saturação, DEAE-celulose e Sephacryl S-200 (El-Hefnawy *et al.* 2014). Ao passo que, ureases de sementes de *Canavalia gladiata* foram isoladas apenas com uma etapa cromatográfica em resina de agarose-urea (cromatografia de afinidade), com grau de pureza de 14 vezes e rendimento de 83% (Saem *et al.* 2015). As ureases presentes em sementes de *Z. cauliflora* perderam atividade após a aplicação de algumas metodologias clássicas de purificação de proteínas, contudo, os resultados da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50 sugere que esta deva ser uma etapa inicial para a obtenção de ureases puras a partir de sementes de espécies florestais.

## CONCLUSÃO

Sementes de *Zygia cauliflora* apresentaram alta atividade ureolítica a partir da obtenção de uma fração com atividade ureolítica, proveniente da cromatografia de exclusão molecular, novos experimentos combinando diferentes técnicas podem ser estabelecidas utilizando como ponto de partida a exclusão molecular na tentativa de se obter uma molécula pura de ureases proveniente de sementes de leguminosas arbóreas da flora Amazônica.

## REFERÊNCIAS

- Balasubramanian, A.; Durairajpandian, V.; Elumalai, S.; Mathivanan, N.; Munirajan, A.K.; Ponnuraj, K. 2013. Structural and functional studies on urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 58: 301-309.
- Barbosa, A.P.; Palmeira, R.C.F.; Nascimento, C.S.; Feitosa, D.S.; Cunha, M.S.C. 2006. Leguminosas Florestais da Amazônia Central I. Prospecção de compostos presentes na casca de espécies arbóreas. *Revista Fitos*, 1: 47-57.
- Becker-Ritt, A.B.; Martinelli, A.H.S.; Mitidieri, S.; Feder, V.; Wassermann, G.E.; Santi, L.; Vainstein, M.H.; Oliveira, J.T.A.; Fiuza, L.M.; Pasquali, G.; Carlini, C.R. 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, 50: 971-983.
- Carlini, C.R.; Ligabue-Braun, R. 2016. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon*, 110: 90-109.
- Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Schimpl, F.C.; Souza, C.S.C.R.; Souza, L.A.G.; Pando, S.C. 2011. Prospecção de inibidores de serinoproteínases em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. *Acta Amazonica*, 41: 163-170.
- EL-Hefnawy, M.E.; Sakran, M.; Ismail, A.I.; Aboelfetoh. 2014. Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating *Pisum sativum* L. seeds. *BMC Biochemistry*, 15: 15-23.
- Follmer, C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69: 18-28.
- Galvani, G.L.; Fruttero, L.L.; Coronel, M.F.; Nowicki, S.; Demartini, D.R.; Defferrari, M.S.; Postal, M.; Canavoso, L.E.; Carlini, C.R.; Settembrini, B.P. 2015. Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the

- central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850: 255-262.
- Gonçalves, J.F.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.M.; Rodrigues, L.F.; Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 139–142.
- Gupta, S.; Kathait, A.; Sharma, V. 2015. Computacional sequence analysis and structure prediction of jack bean urease. *International Journal of Advanced Research*, 3(2): 185-191.
- Marques, D.D.; Sartori R.A.; Lemos, T.L.G.; Machado, L.L.; Souza, J.S.N. Monte, F.J.Q. 2010. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazonica*, 40(1): 227-230.
- Martinelli, A.H.S.; Kappaun, K.; Ligabue-Braun, R.; Defferrari, M.S.; Piovesan, A.R.; Stanisçuaski, F.; Demartini, D.R.; Belo, C.A.D.; Almeida, C.G.M.; Follmer, C.; Verli, H.; Carlini, C.R.; Pasquali, G. 2014. Structure - function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840: 935-944.
- Postal, M.; Martinelli, A.H.S.; Becker-Ritt, A.B.; Ligabue-Braun, R.; Demartini, D.R.; Ribeiro, S.F.F.; Polacco, J.C.; Winkler, R.G. 1984. Soybean leaf urease: a seed enzyme? *Plant Physiol*, 74: 800–803.
- Saem, A.S.M.; Hossain, M.D.T.; Chandan, D.H.N.; Mottaleb, M.A.; Alam, M.T. 2015. Single-step purification of urease from *Canavalia gladiata* seeds. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2): 845-849.
- Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39: 971-974.
- Witte, C.P. 2011. Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180: 431-438.