



ATIVIDADE INIBIDÓRIA DA ADRENALINA SOBRE A ENZIMA UREASE DE *Canavalia ensiformis*

Alysson Januário Inácio da Freiria¹

Marcos Ruan Siqueira da Silva²

Nayara Clarete da Penha³

José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva⁴

Plínio Rodrigues dos Santos Filho⁵

Daniele Maria Marques⁶

Química ambiental

Resumo

As ureases são enzimas dependentes de íons de níquel produzidas por plantas, fungos e bactérias, que catalisam a rápida hidrólise da ureia para formar NH_3 e CO_2 . A associação da urease na degradação da ureia é muito importante para a agricultura. A adrenalina é uma das catecolaminas biologicamente importantes que ocorrem naturalmente. Esse composto é sintetizado *in vivo* a partir da tirosina. O objetivo deste trabalho foi determinar parâmetros cinéticos da urease de *Canavalia ensiformis* e avaliar a ação inibitória da catecolamina adrenalina sobre a taxa de hidrólise da ureia, catalisada pela mesma enzima, em diferentes concentrações. A atividade da urease foi avaliada através da variação de concentrações de ureia e consequente formação de amônio pelo método de indofenol. As diferentes concentrações de adrenalina (6,25; 12,5; 25 e 50 μM) foram incubadas com 12 mU de urease de *Canavalia ensiformis* (Jack bean, tipo III, Sigma Aldrich-Merck). O estudo cinético da enzima mostrou um comportamento cinético simples do tipo Michaelis-Menten, e as concentrações de adrenalina utilizadas foram eficientes para diminuir a taxa de hidrólise da ureia pela urease. A concentração de 50 μM de adrenalina gerou a maior porcentagem inibitória da hidrólise da ureia.

Palavras-chave: atividade enzimática, ureia, inibição enzimática, fertilizante.

¹Graduando em Farmácia – Bacharelado, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), alyssoninacio2001@gmail.com

²Graduando em Farmácia – Bacharelado, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), marcos.ruan@sou.unifal-mg.edu.br

³Doutoranda em Ciências Ambientais – PPGCA, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), nayara.clarete.p@gmail.com

⁴Prof. Dr. Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Departamento de Bioquímica, zemasfs@gmail.com

⁵Prof. Dr. Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Departamento de Bioquímica, plinosant@hotmail.com

⁶Pós-doutoranda no programa de Pós-graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), danimarques.mm@gmail.com



INTRODUÇÃO

As ureases são enzimas dependentes de íons de níquel produzidas por plantas, fungos e bactérias que catalisam a rápida hidrólise da ureia para formar NH_3 e CO_2 . Essa hidrólise ocorre a uma taxa cerca de 10^{14} vezes mais rápida do que a reação não catalisada para liberar amônia e carbamato, que se decompõe em bicarbonato e uma segunda molécula de amônia (SONG et al., 2022; MAZZEI; MUSIANI; CIURLI, 2020). A associação da urease na degradação da ureia é muito importante para a agricultura, visto que este fertilizante nitrogenado é amplamente utilizado (TAVARES et al., 2021).

A ureia é hidrolisada em amônio durante um curto período de tempo através da ação da urease, causando a volatilização do NH_3 e outras perdas de nitrogênio (N) no meio ambiente. Esse processo é afetado por vários fatores, como classe de solo, temperatura, umidade do solo e dosagem de fertilizante aplicada no solo. Isso resulta em uma menor utilização do nitrogênio proveniente da ureia, além de causar danos ambientais (CANTARELLA et al., 2018).

Quimicamente, a adrenalina recebe a nomenclatura de 4-(1-hidroxi-2-(metilamino)etil)-1,2-benzenodiol, segundo a IUPAC (AMORIM; ARAUJO; MONTENEGRO, 2007). A adrenalina é uma das catecolaminas biologicamente importantes que ocorrem naturalmente. Esse composto é sintetizado *in vivo* a partir da tirosina que é sequencialmente hidroxilada para formar diidroxifenilalanina (DOPA), descarboxilada para formar dopamina e N-metilada para formar epinefrina (adrenalina) (LANDSBERG, 2018). A adrenalina é um hormônio circulante, sintetizado e armazenado na medula adrenal e secretado por essa glândula. Este composto também atua como um neurotransmissor no sistema nervoso central (YOUNG; LANDSBERG, 1998).

Segundo pesquisas de Allen (2003) cloroplastos isolados de espinafre demonstram que a adrenalina e a dopamina podem mediar a redução fotossintética de oxigênio. Esses compostos podem funcionar como análogos químicos de um mediador natural proposto, ou fator redutor de oxigênio, que permite a redução de oxigênio para participar da transdução de energia na fotossíntese. A forma totalmente oxidada da adrenalina, adrenocromo, também atua como um mediador na absorção fotossintética de oxigênio, mas apenas



reduzindo o oxigênio a superóxido.

Até o momento, a N-(n-butil) tiofosforictriamida (NBPT) é o inibidor de urease mais ativo e amplamente utilizado mundialmente. No entanto, os efeitos tóxicos reprodutivos, neurotóxicos e hepatotóxicos em animais, e a degradação em ambiente ácido a levemente alcalino impedem o uso clínico do NBPT (NI et al., 2020; NKWONTA et al., 2021). Os inibidores de urease pouco tóxicos, estáveis e eficazes são de grande importância para a ciência atualmente. Além disso, o desenvolvimento de novos inibidores de urease tem atraído muita atenção nas indústrias alimentícia, agrícola e farmacêutica. Portanto, uma compreensão aprofundada de como esses inibidores atuam em relação à urease e inibem sua atividade fornecerá uma base para de novos inibidores de urease de alta eficiência (YANG et al., 2022).

O objetivo deste trabalho foi determinar parâmetros cinéticos da enzima urease de *Canavalia ensiformis* e avaliar a ação inibitória da catecolamina adrenalina sobre a taxa de hidrólise da ureia, catalisada pela mesma enzima, em diferentes concentrações.

METODOLOGIA

A atividade da urease foi avaliada através da variação de concentrações de ureia e consequente formação de amônio de pelo método do indofenol, como descrito por Nain-Perez et al. (2019). Os valores de velocidade máxima enzimática ($V_{máx}$) e constante de Michaelis-Menten (K_m) foram determinados para a urease utilizada, *Canavalia ensiformis* (Jack bean, tipo III, Sigma Aldrich-Merck). Neste ensaio, as concentrações de ureia testadas foram 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 208 mM, enquanto a concentração enzimática permaneceu constante em 12 miliunidades (mU).

Diferentes concentrações de adrenalina (6,25; 12,5; 25 e 50 μ M) foram incubadas com 12 mU de urease de *Canavalia ensiformis* em tampão fosfato 20 mM (pH 7.0) durante 30 minutos a 37 °C para estabelecer o equilíbrio entre fármaco/enzima em poços de placas de 96 poços. Após esse período a ureia na concentração de 60 mM foi adicionada, e a reação continuada por 30 minutos a 37 °C.

Decorrido o período de reação, 0,5 volumes de fenol 1 % (m/v) em nitroprussiato



de sódio (5 ppm) e 0,7 volumes de NaOH (0,5%, m/v) em 0,1% NaOCl (v/v) foram adicionados para promover a formação de indofenol e interromper a atividade enzimática, respectivamente. As reações foram mantidas a 37°C por 30 minutos para desenvolvimento da coloração e então a absorbância em 625 nm foi determinada, após 20 minutos das placas mantidas em temperatura ambiente para estabilização da coloração formada. Os valores de absorbância referentes à hidrólise da ureia foram comparados com aqueles na presença das diferentes concentrações de adrenalina, sendo calculadas as porcentagens inibitórias para cada concentração testada.

Os experimentos foram realizados em triplicatas. Para a análise dos dados e preparação dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GRAPHPAD, 2023). As médias de porcentagem inibitória foram analisadas através do software Sisvar (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível ($p < 0.05$) de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo cinético da urease de *C. ensiformis* mostrou um comportamento cinético do tipo Michaelis-Menten (Figura 1), corroborando com resultados já encontrados para ureases oriundas de outros organismos (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). O valor de velocidade máxima da atividade da enzima foi de 0,86 (Figura 1).

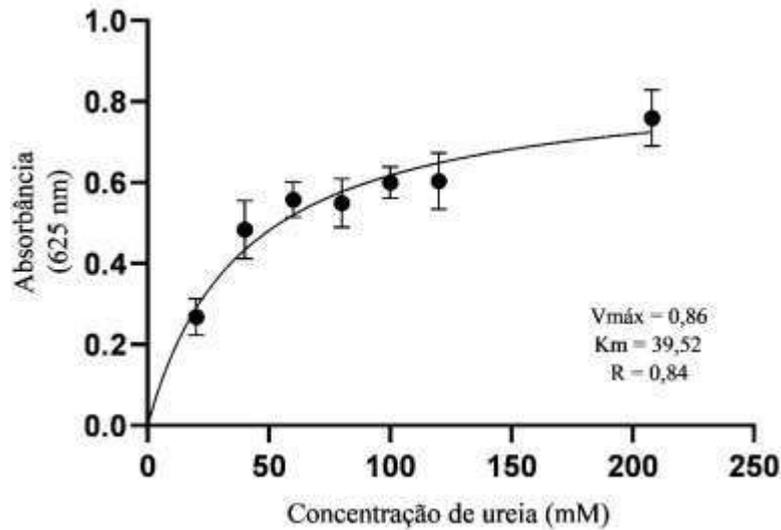


Figura 1. Cinética da urease de *C. ensiformis*.

Legenda: O gráfico mostra a hipérbole obtida por regressão não linear, que rendeu um K_m de 39,52 e $V_{máx}$ de 0,86. O coeficiente de determinação (R), apresentou um valor de 0,84.

Fonte: Autores (2023).

Além do conhecimento teórico da sobre aspectos bioquímicos da urease, o estudo do seu mecanismo catalítico é essencial para melhor conhecimento e controle de sua atividade (KRAJEWSKA; VAN ELDIK; BRINDELL, 2012). O valor constante de Michaelis-Menten encontrado para esta classe de urease (Figura 2) foi maior do que já relatado na literatura para a enzima de *C. ensiformis*, que ficam em torno de 1 à 4 mM de substrato. Porém, esta variação pode ocorrer devido as diferenças na pureza das enzimas testadas, condições temperatura, tampão, seu pH e concentração (KRAJEWSKA, 2009).

As concentrações de adrenalina utilizadas foram eficientes para diminuir a taxa de hidrólise da ureia pela enzima. Todas as diferentes concentrações diferiram entre si, demonstrando que quanto maior a quantidade de adrenalina, maior será a porcentagem inibitória da atividade da urease. Conseqüentemente, 50 μ M de adrenalina resultaram em uma inibição de cerca de 65%.

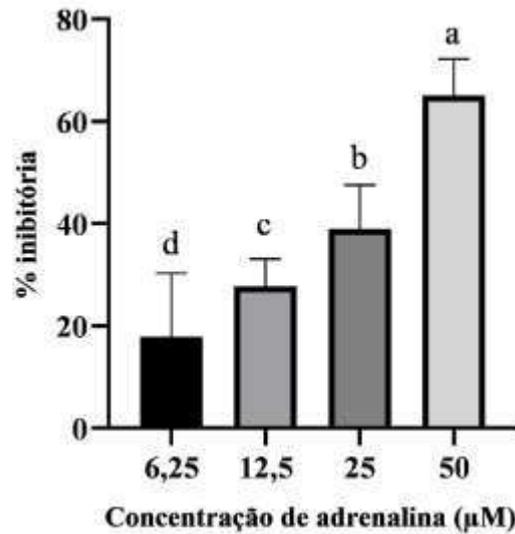


Figura 2. Porcentagem inibitória das diferentes concentrações de adrenalina testadas.

Fonte: Autores (2023).

Catecóis têm sido relatados como potentes inibidores covalentes de ureases, e atuam atividade modificando resíduos de cisteína na entrada de sítios ativos enzimáticos (MAŚLANKA et al., 2023). Ainda de acordo com Kafarski e Talma (2018), já existem estruturas formadas por complexos inibidos de urease de *Sporosarcina pasteurii* com um ligante catecol. A partir de modelagem molecular, constatou-se que o catecol está envolvido na complexação do íon níquel. Porém o mais importante para a inibição parece ser a interação com a cisteína localizada no retalho móvel que cobre o sítio ativo da enzima. Segundo MAZZEI et al. (2017), a molécula de catecol inativa a urease alterando o *flap* que modula a abertura e o fechamento do canal do sítio ativo, bloqueando-o na posição aberta.

De acordo com Zanatta (2015), a urease de *Canavalia ensiformis* induz modificações comportamentais em baratas, que envolvem mecanismos do sistema nervoso central e periférico. Resultado semelhante foi observado nestes insetos no trabalho de Heberle (2015). Como os principais neurotransmissores destes animais são as catecolaminas, é uma evidência de que esta classe de compostos pode interagir com a urease, assim como foi demonstrado neste trabalho, causando inibição do processo de hidrólise da ureia (GULLAN; CRANSTON, 2005).



Em comparação com a ureia, a ureia tratada com NBPT reduz as perdas de NH_3 em cerca de 53% (CANTARELLA et al., 2018). Conforme SILVA et al. (2017), o NBPT ocasiona uma redução média de 52% das perdas de N por volatilização de NH_3 . Desse modo, a adrenalina apresenta um maior potencial diminuição de perdas de nitrogênio para o meio ambiente, pois chegou a 65% de inibição da hidrólise da ureia.

CONCLUSÕES

De maneira geral, a função catalítica de *C. ensiformis* apresentou um comportamento similar ao relatado na literatura para esta enzima. A adrenalina se mostrou um inibidor eficiente da atividade desta enzima, com melhores resultados de acordo com o aumento das concentrações empregadas no presente estudo. Assim, a concentração de 50 μM gerou a maior porcentagem inibitória da hidrólise da ureia.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de uma bolsa de iniciação científica.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J. F. Superoxide as an obligatory, catalytic intermediate in photosynthetic reduction of oxygen by adrenaline and dopamine. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 7-14, Feb. 2003.

AMORIM, C. G.; ARAUJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Exploiting sequential injection analysis with lab-on-valve and miniaturized potentiometric detection. Epinephrine determination in pharmaceutical products. **Talanta**, [S.I.], 72, 1255–1260, 2007.

CANTARELLA, H. et al. Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: a review. **Journal of Advanced Research**, [S.L.], v. 13, p. 19-27, Sept. 2018.



FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GRAPHPAD PRISM. Version 8.0.1 for Windows, **GraphPad Software**, Boston, Massachusetts USA, 2023.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of entomology**. Blackweel Publishing Ltd. Estados Unidos. 2005.

HEBERLE, M. A. **Avaliação da atividade induzida pela Jack Bean Urease (JBU) sobre o sistema nervoso de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea***. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2015.

KAFARSKI, P.; TALMA, M. Recent advances in design of new urease inhibitors: a review. **Journal of Advanced Research**, [S.L.], v. 13, p. 101-112, Sept. 2018.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.L.], v. 59, n. 1-3, p. 9-21, July 2009.

KRAJEWSKA, B.; VAN ELDIK, R.; BRINDELL, M. Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of jack bean urease. Implications for the catalytic mechanism. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 1123-1134, Aug. 2012.

KAPPAUN, K.; et al. Ureases: historical aspects, catalytic, and non-catalytic Properties: a review. **Journal of Advanced Research**, [S.L.], v. 13, p. 3-17, Sept. 2018.

LANDSBERG, Lewis. Catecholamines. **Contemporary Endocrinology**, [S.L.], p. 1-14, 2018.

MAŚLANKA, M. et al. Inhibitory activity of catecholic phosphonic and phosphinic acids against *Helicobacter pylori ureolysis*. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 257, p. 115528, Sept. 2023.

MAZZEI, L. et al. Inactivation of urease by catechol: kinetics and structure. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S.L.], v. 166, p. 182-189, Jan. 2017.

MAZZEI, L.; MUSIANI, F.; CIURLI, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 829-845, Aug. 2020.

MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 451-480, Sept. 1995.

NAIN-PEREZ, A. et al. Antiureolytic activity of substituted 2,5-diaminobenzoquinones. **Chemistry & Biodiversity**, Belo Horizonte, v. 16, n. 12, p. e1900503, Dec. 2019.

NI, W-W. et al. N-monosubstituted thiosemicarbazide as novel urease inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular docking. **Future Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 18, p. 1633-1645, Sept. 2020.



NKWONTA, C. G. et al. Development of one-step non-solvent extraction and sensitive UHPLC-MS/MS method for assessment of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) and N-(n-butyl) phosphoric triamide (NBPT) in milk. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 10, p. 2890, May 2021.

SILVA, A. G. B. et al. Urease inhibitor NBPT on ammonia volatilization and crop productivity: A meta-analysis. **Agronomy Journal**, Madison, v. 109, p. 1–13, 2017.

SONG, W.-Q. et al. Recent Efforts in the discovery of urease inhibitor identifications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 95-107, Jan. 2022.

TAVARES, M. C. et al. Paper-based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors. **Talanta**, [S.L.], v. 230, p. 122301, Aug. 2021.

YANG, W. et al. An overview on the synthetic urease inhibitors with structure-activity relationship and molecular docking. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 234, p. 114273, Apr. 2022.

YOUNG, J. B.; LANDSBERG, L. Chapter 13. **Physiology of the sympathoadrenal system**. Williams textbook. Philadelphia: 9th ed. Saunders, 1998.

ZANATTA, A. P. **Avaliação dos efeitos neurocomportamentais induzidos pela urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789)**. 2015. 65 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2015.