

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA UREASE DE SOJA PARA APLICAÇÕES ANTIMICROBIANAS

ÂNGELO, Elisangela Andrade¹; PIMENTEL, Arethusa Lobo²; SEIXAS, Flávio Augusto Vicente²

¹IFPR, Umuarama, PR; ²Depto. de Bioquímica, UEM, Umuarama, PR.

As ureases (EC.3.3.1.5) são enzimas hidrolíticas dependentes de níquel, que catalisam a quebra da ureia em amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente em ambiente neutro em amônia e dióxido de carbono. Além da função enzimática, as ureases apresentam ação inseticida e fungitóxica, independentes de sua função catalítica. A atividade fungitóxica geralmente ocorre em níveis micromolares e já foi observada em diferentes ureases vegetais. A soja (*Glycine max*) apresenta duas isoformas principais da urease: a ubíqua, presente em praticamente todos os tecidos da planta, e a embrionária, encontrada nas sementes. O fato da uréase ser uma proteína vegetal faz com que ela possa ser utilizada como conservante natural de alimentos, pois não há relatos de qualquer tipo de toxicidade por parte dos componentes da semente de soja, na alimentação de humanos ou de animais. Tendo em vista as potenciais aplicações antimicrobianas das ureases, o presente trabalho tem por objetivo estudar a ação fungitóxica da urease de soja e de polipeptídeos derivados da mesma sobre fungos filamentosos e leveduriformes patogênicos que afetam humanos e animais. Para isso, 15 gramas de semente de soja foram trituradas e lavadas com clorofórmio para remoção dos lipídeos. O extrato desengordurado foi utilizado para extração de proteínas por meio de agitação constante com tampão fosfato 20mM + 1mM β -mercaptoetanol, pH 7,5 à 4 °C por 12 horas. A fração protéica solúvel foi separada por meio de centrifugação à 30.000 g por 30 minutos. O extrato foi pré-purificado por meio de passagem em coluna de filtração em gel de Sephadex G25. A fração com atividade ureolítica foi extraída e concentrada para passagem em coluna de troca aniônica Q-HP (Ge Lifesciences) em sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). Como resultados, a extração em tampão se mostrou um excelente método de obtenção da enzima nativa, com manutenção da atividade ureolítica inalterada no extrato protéico durante dois meses. A passagem do extrato em resina de filtração em gel apresentou quatro picos distintos, onde somente o primeiro continha atividade ureolítica, o qual foi isolado e concentrado. A purificação por cromatografia de troca aniônica apresentou cinco picos de eluição em gradiente de 0,0, 0,1, 0,2, 0,3 e 1,0M de NaCl, sendo que as frações com atividade ureolítica foram eluídas com 0,1 e 0,3M de sal. Uma vez isoladas duas frações contendo duas enzimas diferentes com atividade ureolítica as mesmas serão testadas em experimentos de Concentração Inibitória Mínima com fungos filamentosos e leveduriformes para avaliar a atividade fungitóxica de cada uma. Os resultados poderão apresentar uma alternativa natural ao uso de fungicidas em alimentos.

Palavras-chave: Fungitóxico, produtos naturais, fungos patogênicos.

Agradecimentos: CAPES, CNPq, Fundação Araucária, FINEP.