

SISTEMA EM FLUXO PARA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE URÉIA EM PLASMA DE SANGUE ANIMAL EMPREGANDO LEGUMINOSA COMO FONTE NATURAL DA ENZIMA UREASE**Gilmara C. Luca**

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

Boaventura F. Reis

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário, 303, CP 96, 13400-970 Piracicaba - SP

Recebido em 21/3/00; aceito em 6/7/00

FLOW SYSTEM FOR SPECTROPHOTOMETRIC UREA DETERMINATION IN ANIMAL BLOOD PLASMA EMPLOYING LEGUMINOUS PLANT AS NATURAL UREASE ENZYME SOURCE. A spectrophotometric flow injection analysis (FIA) procedure employing natural *urease* enzyme source for the determination of urea in animal blood plasma was developed. Among leguminous plants used in the Brazilian agriculture, the *Cajanus cajan* specie was selected as *urease* source considering its efficiency and availability. A minicolumn was filled with leguminous fragments and coupled to the FIA manifold, where urea was on-line converted to ammonium ions and subsequently it was quantified by spectrophotometry. The system was employed to determine urea in animal plasma samples without any prior treatment. Accuracy was assessed by comparison results with those obtained employing the official procedure and no significant difference at 90 % confidence level was observed. Other profitable features such as an analytical throughput of 30 determinations per hour, a reagent consumption of 19.2 mg sodium salicylate, 0.5 mg sodium hypochloride and a relative standard deviation of 1.4 % (n= 12) were also obtained.

Keywords: urea determination, leguminous plant *urease* source, flow analysis, animal blood plasma

INTRODUÇÃO

A determinação de uréia em fluidos biológicos é um importante parâmetro para diagnósticos clínicos do funcionamento renal, além de ser um dos indicativos da condição nutricional dos animais¹. Em vista disso, métodos empregando variadas técnicas de detecção²⁻⁷, têm sido propostos no intuito de simplificar e aumentar a sensibilidade na determinação desse analito. Na grande maioria destes métodos⁴⁻⁷, sejam eles espectrofotométricos, potenciométricos, condutométricos ou amperométricos, a enzima *urease* tem sido empregada, na forma de solução, ou imobilizada em pequenos reatores. Nesses casos, a uréia é hidrolisada produzindo amônio, que é então monitorado direta ou indiretamente, dependendo da técnica de detecção empregada.

O emprego de reações enzimáticas em química analítica tem sido amplamente explorado, principalmente devido à sensibilidade e alta seletividade de tais reações⁸. Os procedimentos analíticos empregam soluções de enzima purificada ou a mesma imobilizada em suportes apropriados, como esferas de vidro com porosidade controlada, celulose, fibras de nylon entre outros⁹. A escolha do suporte depende da enzima envolvida, bem como da forma com que esta será imobilizada. Em geral, enzimas imobilizadas apresentam uma maior estabilidade, maior eficiência e menor custo, quando comparadas ao emprego de enzimas em solução, e por esta razão, tem crescido o número de trabalhos empregando enzimas imobilizadas ou sugerindo metodologias para imobilização das mesmas⁷.

Uma outra maneira de se utilizar enzimas é empregando fontes naturais das mesmas¹⁰, nas quais algumas enzimas apresentam-se naturalmente disponíveis. Com relação à enzima *urease*, selecionada para o desenvolvimento deste trabalho, podemos encontrá-la em uma variedade de leguminosas como *Canavalia ensiformis*, *Canavalia gladiata*, *Glycine max*, *Crotalaria juncea*, utilizadas como alimentos ou como adubos verdes na agricultura, e desta forma, facilmente encontradas no comércio. Explorando essas potencialidades, as leguminosas

Canavalia ensiformis e *Canavalia brasiliensis* foram utilizadas como fontes naturais da enzima *urease* para o desenvolvimento de procedimentos em fluxo visando a determinação condutométrica¹¹ de uréia em soro de sangue humano, e potenciométrica¹² em fertilizantes, respectivamente.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um procedimento espectrofotométrico em fluxo para a determinação de uréia em plasma de sangue animal, empregando fonte natural de *urease*, e a quantificação dos íons amônio produzidos através da reação de Berthelot. As potencialidades do emprego de algumas leguminosas foram avaliadas no sentido de se selecionar a espécie mais adequada para a proposta analítica.

PARTE EXPERIMENTAL**Instrumentação**

O módulo de análises era constituído de uma bomba peristáltica Ismatec IPC4; tubos de Tygon de diferentes diâmetros internos; um espectrofotômetro Femto 382, equipado com cela de fluxo (100 µL de volume interno, 12 mm passo ótico); um banho com temperatura controlada Fanem 100; um registrador potenciométrico ECB RB201; um injetor comutador em acrílico¹³. Bobinas de reação e linhas de transmissão foram feitas em tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno.

Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico e água destilada e deionizada.

Solução contendo 60,0 mmol L⁻¹ de salicilato de sódio e 3,40 mmol L⁻¹ de nitroprussiato de sódio, preparada dissolvendo-se quantidades apropriadas dos respectivos sais C₇H₅NaO₃ e Na₂[Fe(CN)₅NO] em solução tampão fosfato 60,0 mmol L⁻¹ (pH ≈ 6,8). Esta solução era armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração quando não usada.

Solução contendo 9,0 mmol L⁻¹ de hipoclorito de sódio, preparada a partir de diluição do produto comercial, em uma solução contendo 170,0 mmol L⁻¹ de hidróxido de sódio. Esta solução era preparada semanalmente e armazenada em frasco de polietileno.

Solução estoque de uréia contendo 100,0 mmol L⁻¹, preparada dissolvendo-se 0,6006 g de uréia ((NH₂)₂CO - Merck) em 100,0 mL de água. Soluções de trabalho contendo 0,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 e 12,00 mmol L⁻¹ de uréia em 140,0 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio, foram preparadas a partir de diluições da solução estoque.

Preparo da minicoluna

A minicoluna contendo fonte natural da enzima foi preparada empregando-se um tubo de Tygon de 70 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno, e preenchendo-se com 160,0 mg de fragmentos da leguminosa. Foram colocados pedaços de lã de vidro nas extremidades da coluna para evitar deslocamento dos fragmentos através das linhas de transmissão. Os fragmentos foram obtidos removendo-se a pele dos grãos e cortando-os em pequenos pedaços, os quais foram classificados granulometricamente (0,5 – 1,0 mm) com o uso de peneiras.

Amostras

As amostras de sangue animal (e.g. bovinos, eqüinos e ovinos) foram coletadas utilizando-se sistema a vácuo em frascos contendo heparina sódica, centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos para separação do plasma, e mantidas sob refrigeração (~5 °C).

Procedimento

O sistema desenvolvido para determinação espectrofotométrica de uréia em plasma animal é mostrado na Figura 1a. Na posição indicada, enquanto a alça de amostragem (L) é preenchida com a solução da amostra, o reagente R₂ é recuperado, e somente a solução transportadora (R₁) flui através do percurso analítico, passando através da coluna (E) preenchida com os fragmentos da leguminosa. Nesta posição, flui também através do ponto de confluência x, um fluxo de água, que foi adicionado visando acelerar a limpeza do sistema. Com o deslocamento da parte central do injetor comutador, a alça de amostragem é inserida no percurso analítico, sendo transportada pelo reagente R₁. O reagente R₂ passa a fluir através do ponto de confluência x, substituindo o fluxo de água. A uréia presente na amostra é hidrolisada, produzindo íons amônio, enquanto a solução da amostra passa através da coluna (E). Os íons amônio produzidos reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, catalisados pelo nitroprussiato de sódio, e o produto formado é monitorado espectrofotometricamente a 600 nm. O próximo ciclo analítico inicia deslocando-se a parte central do injetor para a posição original.

Alguns experimentos foram conduzidos inicialmente no sentido de se estabelecer as melhores condições para a reação enzimática. Foram estudados parâmetros como vazão de bombeamento da solução R₁, temperatura, tamanho dos fragmentos, influência da intensidade iônica e condicionamento dos fragmentos da leguminosa. Esses experimentos foram conduzidos empregando-se o sistema mostrado na Figura 1b. Nesse caso, a amostra é bombeada continuamente através da coluna (E), preenche a alça de amostragem (L) e seu excesso é descartado. Sobre essas condições, a alça de amostragem é preenchida com a solução contendo íons amônio gerados enzimaticamente pela hidrólise da uréia. Quando a parte central do injetor é comutada para a posição alternativa, a solução da amostra, selecionada pela alça de amostragem, é inserida no percurso analítico e recebe a adição dos reagentes cromogênicos.

Empregando essa estratégia, as condições para o desenvolvimento da reação de Berthelot são mantidas constantes, alterando-se apenas o parâmetro estudado para o desenvolvimento da reação enzimática.

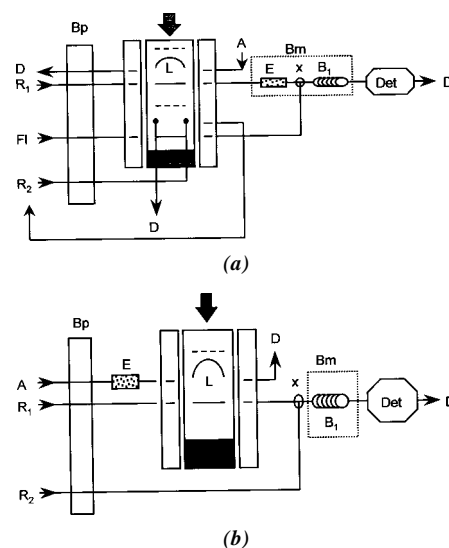


Figura 1. Diagrama de Fluxos dos Sistema. a: empregado na determinação de uréia. Os três retângulos indicam o injetor comutador e a área sombreada indica a posição alternativa do mesmo. Bp = bomba peristáltica; L = alça de amostragem (15 cm de comprimento e 0,8 mm d.i.); E = coluna enzimática; x = ponto de confluência; B₁ = bobina de reação (150 cm de comprimento e 0,8 mm d.i.); Bm = banho com temperatura controlada a 38 °C; Det = espectrofotômetro a 600 nm; A = amostra (2,4 mL min⁻¹); Fl = fluxo de água para limpeza; R₁ = solução de salicilato; R₂ = solução de hipoclorito sódico; D = descarte. Com exceção da solução da amostra, os demais fluidos foram bombeados à uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. As setas indicam a direção de bombeamento. b: empregado para estudo da reação enzimática. Vazão de bombeamento da solução da amostra = 1,0 mL min⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da reação enzimática

No sistema proposto a reação de hidrólise da uréia pela enzima *urease* ocorre enquanto a solução da amostra passa através da coluna contendo fragmentos da leguminosa. Desta forma, a quantidade de uréia hidrolisada depende do tempo de residência da solução da amostra através da coluna. Considerando este fato, estudos foram conduzidos variando-se a vazão de bombeamento da solução da amostra em 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,2 mL min⁻¹. Quando a vazão de bombeamento diminuiu de 1,2 para 0,1 mL min⁻¹, foi verificado um aumento de aproximadamente 150% no sinal analítico (Figura 2). A vazão de bombeamento foi fixada em 1,0 mL min⁻¹ como um compromisso entre sensibilidade e velocidade analítica. Este parâmetro pode ser empregado para ajustar a faixa de resposta do procedimento, alterando o limite de detecção, quando necessário.

O efeito de variações da temperatura sobre a reação enzimática foi avaliado mantendo a coluna contendo os fragmentos da leguminosa imersa em um banho com temperatura controlada. A temperatura do banho foi variada de 21 para 45 °C, o que resultou em um aumento final de 30% no sinal analítico. Desde que a reação de Berthelot é também dependente da temperatura, esta foi fixada em 38 °C para o desenvolvimento da reação enzimática. Temperaturas mais elevadas foram evitadas, pois poderiam favorecer a liberação de gás das soluções formando pequenas bolhas, as quais são indesejáveis em sistemas de fluxo.

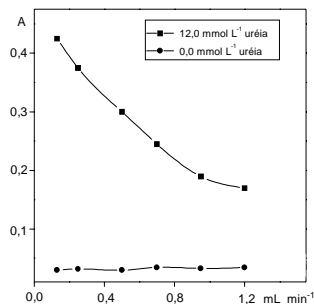


Figura 2. Efeito da vazão na eficiência da hidrólise da uréia. A = absorbância. Resultados obtidos com o sistema da Figura 1b.

A influência do tamanho das partículas da leguminosa sobre a eficiência da reação enzimática foi verificada preenchendo a coluna com fragmentos de cerca de 0,5; 0,8 e 1,5 mm. Embora tenha sido observado um aumento de 35% dos sinais quando o tamanho da partícula variou de 1,5 para 0,5 mm, este foi fixado em 0,8 mm. Esta dimensão foi escolhida, pois com a passagem do fluxo, partículas menores sofriram o processo de compactação em uma das extremidades da coluna, prejudicando a repetibilidade das medidas.

Observou-se durante os experimentos que a eficiência de conversão de uréia a íons amônio aumentava com o tempo de uso da coluna. Preparou-se uma coluna contendo a leguminosa e iniciou-se a avaliação da eficiência de conversão registrando-se os sinais obtidos (Tabela 1). Trabalhou-se durante 2 horas sem prévio condicionamento da coluna. Após deixar o sistema desligado por 2 horas, reiniciou-se as inserções por um período de 4 horas de trabalho, e assim sucessivamente até que a magnitude dos sinais começou a diminuir. Toda vez que o sistema era desligado, a coluna era preenchida com água e as extremidades eram fechadas. Os sinais obtidos durante as inserções da amostra apresentavam pouca variação, mas quando desligava-se o sistema por intervalos de tempo, intercalando-se inserções de amostra (tempo em uso) e sistema desligado (condicionamento), pode-se observar um aumento gradativo na absorbância registrada. Acredita-se que este efeito era causado pela hidratação das partículas que ocorria pela passagem das soluções através da coluna. O aumento de sinal observado quando a coluna era deixada em repouso corrobora esta suposição. Quatro colunas idênticas foram, então, preparadas e cada uma condicionada com uma solução de NaCl nas concentrações 0,10; 0,20; 0,50 e 1,0 mol L⁻¹, respectivamente. Pode-se observar através da Figura 3 que colunas preenchidas com soluções de NaCl em concentrações superiores a 0,5 mol L⁻¹ apresentaram melhor eficiência de conversão. Este efeito provavelmente deve-se ao fato de que em meio salino mais levado, as células absorvem mais água para estabelecer o equilíbrio osmótico. Entretanto, uma maior absorção pode provocar o rompimento da membrana celular, conseqüentemente, diminuindo o tempo de vida da coluna. A concentração da solução de NaCl foi fixada em 0,25 mol L⁻¹ e o condicionamento era realizado mantendo-se a coluna nesse meio durante 12 horas antes de se iniciar o procedimento. Essas condições foram escolhidas tendo em vista eficiência de conversão obtida, e a estabilidade da coluna.

A disponibilidade da enzima nas leguminosas pode variar dependendo da variedade da mesma, da espécie, do tempo, e das condições de armazenamento dos grãos. Dessa forma, realizou-se uma comparação entre as variedades disponíveis visando selecionar aquela que melhor respondesse à proposta analítica. Os resultados são mostrados na Tabela 2. Apesar da variedade *Canavalia gladiata* apresentar melhor eficiência no processo enzimático, a espécie *Cajanus cajan L. Milsp* foi selecionada para o procedimento. Nesse caso, dois fatores foram considerados: a facilidade para adquirir a fonte de enzima;

e também o fato de que para a determinação de uréia em plasma de sangue animal, alta sensibilidade não era fator limitante. Salienta-se que, para avaliar as diferentes leguminosas, as colunas eram preparadas e submetidas às mesmas condições de preparo e condicionamento. Isto pode ter sido responsável pelas diferentes respostas obtidas, já que cada leguminosa possui características físico-químicas próprias.

Tabela 1. Efeito do tempo de condicionamento. Resultados obtidos com o sistema da Figura 1a empregando-se uma única coluna.

Condicionamento (horas)	Tempo em uso (horas)	Número de medidas	Sinal* (A)
0	2	24	0,22
2	4	94	0,42
12	2	44	0,57
12	2	32	0,49
4	2	46	0,26

* média de sinais obtidos com uma solução contendo 10,00 mmol L⁻¹ de uréia, após o respectivo período de condicionamento.

Tabela 2. Comparação entre as diferentes leguminosas. Resultados obtidos com o sistema da Fig.1a.

Nome científico	Nome popular	Conversão*(%)
<i>Canavalia ensiformis DC</i>	feijão de porco (branco)	16
<i>Canavalia gladiata</i>	feijão de porco (vermelho)	61
<i>Glycine max l. merril</i>	soja	8
<i>Cajanus cajan l. milsp</i>	feijão guandu	18
<i>Crotalaria juncea</i>	crotalária	9
<i>Vigna</i>	feijão de corda	5

* os números referem-se à conversão de uréia a íons amônio

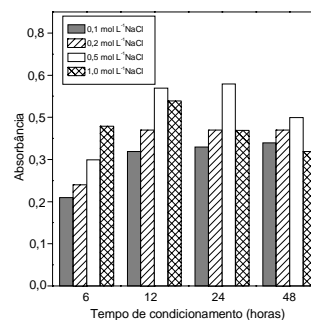


Figura 3. Efeito da intensidade iônica no condicionamento da coluna. Resultados obtidos empregando-se uma solução contendo 12,0 mmol L⁻¹ de uréia e o sistema da Figura 1a.

Determinação de uréia

No sistema em fluxo empregado para a determinação de uréia em plasma de sangue animal (Figura 1a), o intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação era de 30 s. Com este intervalo de tempo, observou-se uma resposta linear para a faixa de concentração entre 2,00 e 12,0 mmol L⁻¹ de uréia ($y = 8,786 + 6,821x$; y = absorbância e x = concentração). Testes efetuados desligando-se a bomba peristáltica quando o sinal chegava ao máximo, indicaram que nas condições estabelecidas, a magnitude máxima do sinal transiente correspondia a 70% do valor obtido com a reação em equilíbrio. Para aumentar a velocidade analítica sem variar o intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação,

foi adicionado ao ponto de confluência x um fluxo intermitente de água (Figura 1a). Este fluxo de água visava diminuir o intervalo de tempo necessário para limpeza do sistema. Sob essas condições, o intervalo de tempo gasto para completar um ciclo analítico foi diminuído em 33%, possibilitando que 30 determinações pudessem ser realizadas por hora.

Uma vez definidas as condições operacionais do sistema, um conjunto de amostras de plasma bovino, ovino e equino foram analisadas (Figura 4) e os resultados comparados com o método oficial¹ de análises para fluidos biológicos (Tabela 3). A análise estatística dos resultados (teste *t-pareado*) demonstrou que não há diferença significativa em nível de 90% de confiança.

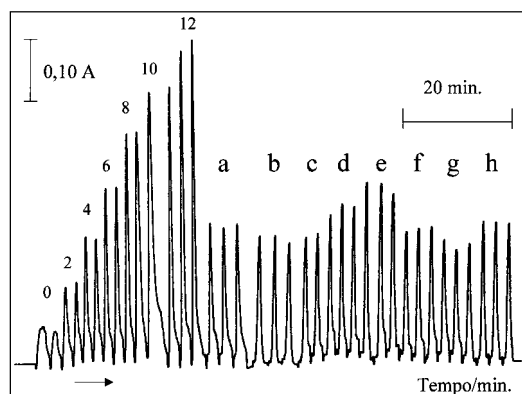


Figura 4. Registro de rotina. Sinais obtidos empregando sistema da Figura 1a. Da esquerda para a direita os sinais em triplicata correspondem a um conjunto de soluções de referência (0,00 a 12,00 mmol L⁻¹ de uréia) e amostras de sangue animal. A: Absorbância. A seta indica a seqüência analítica.

Tabela 3. Resultados. Resultados obtidos com o sistema da Figura 1a.

Amostra*	Método Oficial** (Kit) (mmol L ⁻¹)	Sistema Proposto** (mmol L ⁻¹)
1	6,85 ± 0,16	7,09 ± 0,13
2	4,05 ± 0,02	3,36 ± 0,12
3	2,82 ± 0,20	2,80 ± 0,09
4	2,63 ± 0,04	2,71 ± 0,01
5	2,67 ± 0,12	2,68 ± 0,02
6	3,13 ± 0,08	3,60 ± 0,02
7	3,02 ± 0,67	2,92 ± 0,02
8	3,67 ± 0,05	3,42 ± 0,07
9	3,73 ± 0,07	3,43 ± 0,05
10	5,53 ± 0,01	5,22 ± 0,02
11	7,03 ± 0,26	6,70 ± 0,06
12	7,09 ± 0,04	7,84 ± 0,01
13	5,74 ± 0,12	5,64 ± 0,02
14	4,46 ± 0,06	4,73 ± 0,13
15	5,78 ± 0,10	5,94 ± 0,02

*Amostras 1 a 4, 5 a 9 e 10 a 15 correspondem respectivamente a plasma de sangue ovino, bovino e equino; ** n = 3.

Outros aspectos favoráveis observados foram desvio padrão relativo de 1,4% (n=12) e baixo consumo de reagentes (0,5 mg de hipoclorito de sódio, 14,0 mg de hidróxido de sódio,

19,2 mg de salicilato de sódio e 2,0 mg de nitroprussiato de sódio) por determinação.

Com relação à eficiência da enzima, observou-se uma diminuição de 5% na magnitude dos sinais obtidos durante um dia de trabalho (~180 inserções), e para minimizar este efeito, as soluções de referência eram analisadas a cada duas horas de trabalho. Quando não em uso, a coluna era preenchida com uma solução 0,25 mol L⁻¹ de NaCl, as extremidades eram fechadas para evitar o deslocamento da solução, e mantida sob refrigeração (~5 °C). Operada nestas condições era possível trabalhar durante 7 dias.

CONCLUSÃO

A leguminosa *Cajanus cajan* L. Milsp pode ser empregada satisfatoriamente como uma potencial fonte da enzima *urease*, apresentando boa eficiência para a determinação de uréia em plasma de sangue animal. Outras espécies (Tab. 2) podem também ser usadas, devendo ser observadas as condições de hidratação de cada uma para melhor disponibilização da enzima.

A coluna contendo a enzima apresentou boa estabilidade, caracterizada por um tempo de vida de uma semana, o qual é suficiente para uso prático.

Como principais vantagens do procedimento proposto destacam-se a disponibilidade da enzima, seu baixo custo, e a pequena manipulação das amostras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FAPESP, CNPq, PRONEX, CAPES, aos pesquisadores da Seção de Ciências Animais – CENA/USP pelas amostras de plasma e pelo Kit de reagentes do método de referência, e ao doutorando Celso R. Almeida pelas valiosas sugestões no início do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Nutricional Metabolite Kit Protocols, Animal Production Unit, Joint FAO/IAEA, Seibersdorf, Austria, 1993.
- Narinesingh, D.; Pope, A.; Ngo, T. T.; *Talanta* **1992**, *39*, 1233.
- Anton, S.; Gutierrez, M. C.; Gomez-Henz, A.; Perez-Bendito, D.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *230*, 145.
- Rosário, S. A.; Cha, G. S.; Meyerhoff, M. E.; Trojanowicz, M.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2418.
- Krawczyk, T. K.; Trojanowicz, M.; *Talanta* **1994**, *41*, 1229.
- Solich, P.; Polásek, M.; Karlíček, R.; *Anal. Chim. Acta* **1989**, *218*, 151.
- Taylor, D.; Nieman, T. A.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *186*, 91.
- Baldwin, E.; *A Natureza da Bioquímica*; Trad.; Ao Livro Técnico, Rio de Janeiro, 1972, p. 46.
- Ricardo, C. P. P.; Teixeira, A. R. N.; *Enzima*, Plátano Editora S.A., Lisboa, 1983.
- Vieira, I. D.; Fatibello-Filho, O.; *Analyst* **1998**, *123*, 1809.
- Faria, L. C.; Pasquini, C.; Oliveira-Neto, G.; *Analyst* **1991**, *116*, 357.
- Júnior, L. R.; Oliveria-Neto, G.; Lima, J. L. F. C.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Silva, V. L.; *Anal. Sci.* **1997**, *13*, 589.
- Martelli, P. B.; Reis, B. F.; Korn, M.; Rufini, I. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 479.