

INGRID KELY DA SILVA SANTANA

**ATIVIDADE DE UREASES EM SOLOS E AVALIAÇÃO DE
POTENCIAIS INIBIDORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

INGRID KELY DA SILVA SANTANA

**ATIVIDADE DE UREASES EM SOLOS E AVALIAÇÃO DE
POTENCIAIS INIBIDORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 27 de julho de 2011.

Prof. Antônio Jacinto Demuner
Coorientador

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof. Reinaldo Bertola Cantarutti
(Orientador)

*“À minha família, minha fortaleza, minha
força nos momentos de dificuldades,
fonte inesgotável de inspiração”*

Dedico.

**Eu aprendi ... que todos querem viver no topo da montanha, mas
toda felicidade e crescimento ocorre quando você está a escalando-a.**

(Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Chego ao final desta tese muito a agradecer a muitas pessoas que marcaram essa jornada e de forma geral minha vida.

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por tudo de bom que nela fez quando em Tuas mãos eu a entreguei Pai.

Ao povo brasileiro pela oportunidade de receber de forma gratuita e com qualidade o conhecimento necessário a minha formação acadêmica.

A Universidade Federal de Viçosa, principalmente ao Departamento de Solos (DPS), por tudo que me foi oferecido durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À encantadora Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ, pela minha sólida formação, pelo acolhimento, pela lição de vida, pelos grandes amigos adquiridos.

À minha querida mãe, por todo seu carinho, apoio, incentivo, e o seu sacrifício para que eu pudesse chegar até aqui hoje.

Ao orientador Dr. Reinaldo Bertola Cantarutti, pelos ensinamentos, paciência e compreensão das minhas dificuldades e limitações.

Ao professor Edson Marcio Mattiello, pelo auxílio imprescindível em todas as fases deste trabalho.

Ao professor Antônio Jacinto Demuner e Sebastião Tavares de Rezende, pela co-orientação, sugestões e apoio científico, que muito colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Júlio César Lima Neves, Roberto Ferreira de Novais e Victor Hugo Alvarez V., pelas valiosas contribuições para este trabalho e pela grande e importante participação na minha formação, durante este curso e, principalmente, pelo exemplo de dedicação e fertilidade do solo.

Aos demais professores do DPS, pelos ensinamentos e dedicação, em especial aos que estabeleci maior contato durante este curso: Genelício Crosué, Hugo Ruiz, Maurício Fontes e Jaime Mello.

Aos laboratoristas e funcionários Carlos Fonseca, Cláudio, Jorge Orlando, Sr. Bené, Sr. Cardoso, Brás, Lula, Pedro Lelis, Luciana, Claudinha, Sônia, Leiliane, pela ajuda e paciência.

A estagiária e prima, Patrícia Cardoso Matias pela ajuda e dedicação nas atividades, pelos questionamentos, aprendizagem e amizade. Aos demais familiares, avós, tios e primos pela alegria, simplicidade e carinho. Em especial à minha querida tia Eny do Carmo (in memória) e ao André Caran que graças a eles decidi fazer agronomia.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo apoio e convívio: Aline Fontes, Bárbara Elias, David Faria, Emanuel, Fernanda Caparelli, Fernanda Schulthais, Francianny, Jailson, Jeferson, Karoline Depulpo, Loane, Maola, Paul Lama, Samuel Valadares. Em especial à Rita Freitas e Evair Siebeneichler pela disponibilidade, amizade e apoio nas análises laboratoriais.

Aos amigos de turma de trabalho, principalmente de mesmo pai, Alan Fialho, Diogo Mendes, Federico Cotta, Gelton Guimarães, Lucíola, Luiz Filho, Marco Antônio, e Ordiley, em que podia contar com qualquer tipo de ajuda, “cataremprestado” reagentes, soluções e vidrarias.

Ao Leonardo Sanguinetti, que com seu amor, tornou-se importante e presente nessa fase de minha vida em Viçosa. Nada teria sido tão especial sem seu apoio, incentivo e companheirismo.

Um agradecimento especial à amiga Patrícia Fernandes, por ter conhecido e descobrir o verdadeiro sentido da amizade sincera e de grande companheirismo. Minha alma gêmea.

Agradeço por fim, mas com um grau de importância maior, aos meus sempre mestres, orientadores e amigos Dr. Everaldo Zonta, Dr. Fabiano Balieiro e Dr. José Carlos Polidoro que, cada qual com a sua maneira, me guiaram até essa jornada. Talvez vocês não saibam a dimensão da importância do apoio de vocês, pelos exemplos de dedicação e de profissionais que almejo ser.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

INGRID KELY DA SILVA SANTANA, filha de Eduardo Batista de Oliveira Santana e Ana Lúcia da Silva, natural de Viçosa - MG, nasceu no dia 24 de julho de 1982.

Em 2004 iniciou o curso de graduação em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se em agosto de 2009.

Em agosto de 2009 iniciou o curso de mestrado em Solos e Nutrição de Plantas na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em julho de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRAT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
LITERATURA CITADA.....	3

Capítulo 1. Atividade de ureases em solos sob diferentes condições de uso.

Resumo.....	5
Abstrat	7
Introdução.....	9
Material e métodos.....	12
Resultados e discussão.....	16
Conclusão.....	20
Literatura citada.....	21

Capítulo 2. Piridinonas e iminas como inibidoras de ureases no solo.

Resumo.....	24
Abstrat.....	26

Introdução.....	28
Material e métodos.....	30
Resultados e discussão.....	33
Conclusão.....	38
Literatura citada.....	39
Conclusão geral.....	42

RESUMO

SANTANA, Ingrid Kely da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Atividade de ureases em solos e avaliação de potenciais inibidores.** Orientador: Reinaldo Bertola Cantarutti. Corientadores: Antônio Jacinto Demuner, Edson Marcio Mattiello e Sebastião Tavares de Rezende.

A urease é a enzima que catalisa a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amônia. Os inibidores de ureases são empregados para minimizar a volatilização de NH_3 a partir da hidrólise da ureia. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade das ureases no solo de cultivo agrícola em sistema de plantio direto e convencional, de pastagem e de eucalipto e avaliar o potencial de compostos do grupo iminas e piridinonas na inibição da atividade das ureases no solo. Foram conduzidos dois ensaios. No primeiro a incubação foi conduzida em temperaturas de 30 e 4 °C. Os tratamentos corresponderam a um fatorial [(4 x 10) + 4], sendo quatro solos (pastagem, SPC, SPD e eucalipto); 10 tempos de incubação (2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120 e 168 h) mais um controle para cada solo no ensaio a 30 °C. No ensaio com temperatura de 4 °C foram oito tempos de incubação até 72 horas, portanto o fatorial foi [(4 x 8) + 4]. O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. No segundo ensaio os tratamentos corresponderam a um fatorial [(11 x 4) + 1] x 5, sendo 11 compostos (cinco iminas, cinco piridinonas e um PMA); quatro doses (0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 μmol); mais o tratamento sem inibidor em cinco tempos de incubação a 30 °C (6, 12, 24, 48 e 72 h). O delineamento foi em blocos ao acaso com cinco repetições. A atividade das ureases no solo foi avaliada determinando-

se a ureia remanescente nos diferentes tempos de incubação. Para isto utilizou-se a ureia extraída pela solução mista de KCl 2 mol L^{-1} e 5 mg L^{-1} de acetato de fenilmercúrio (PMA). A ureia no extrato foi quantificada por meio de método espectrofotométrico (527 nm) com uso de diacetil monoxime (DAM) e thiosemicarbazide (TSC) em meio ácido. Os solos apresentaram diferenciado potencial de hidrólise da ureia com efeito da temperatura de incubação. O solo de pastagem apresentou maior atividade ureolítica, seguido do solo do SPC, SPD e de eucalipto. As conformações avaliadas das iminas e piridinonas não foram efetivas na inibição da atividade das ureases. Apesar da não significância, as conformações das piridinonas avaliadas foram mais efetivas na inibição da atividade das ureases. A piridinona 10, com a aplicação de $1,0 \text{ } \mu\text{mol}$, mostrou-se mais ativa, resultando um tempo de 25 h de incubação para hidrolisar 90 % da ureia adicionada ao solo. Outras conformações das iminas e piridinonas deverão ser sintetizadas e avaliadas o seu potencial inibidor.

ABSTRACT

SANTANA, Ingrid Kely da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Ureases activity in soil and potencial inhibitors evaluation.** Advisor: Reinaldo Bertola Cantarutti. Co-Advisors: Antônio Jacinto Demuner, Edson Marcio Mattiello and Sebastião Tavares de Rezende.

The urease is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of urea to carbon dioxide and ammonia. The inhibitors are used to minimize the volatilization of NH_3 from hydrolysis of urea. The present study proposes to evaluate the activity of urease in crop, tillage and conventional system from pasture and eucalyptus and evaluate the compounds potential of imine and pyrimidinone groups in inhibitions of activity of urease in soil. Two experiments were conducted. On the first one the incubation was conducted in 30 and 4 °C. The treatments match of a factorial [(4 x 10) + 4], were four soils (pasture, SPC, SPD and eucalyptus), ten times of incubation (2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120 and 168 hours) further the control for each soil to the assay of 30 °C. In the assay with the temperature of 4° C were eight times of incubation until 72 hours, therefore factorial was [(4 x 8) + 4]. The delimitation was completely randomized with five repetitions. On the second essay the treatments match to a factorial [(11 x 4) + 1] x 5) with 11 compounds (5 imine, 5 pyrimidinone and one PMA), four doses (0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 μmol); further the treatment with inhibitor in five times of incubation 30 °C (6,

12, 24, 48 e 72 h). The delimitation was divided in blocks at random with five repetitions. The urease activity in soil was evaluated determining the remaining of urea in different time of incubation. The urea was extracted through mixed solution of $\text{KCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$ and 5 mg L^{-1} of phenylmercury acetate (PMA). The urea in the extract was quantified by spectrophotometer method (527 nm) using diacetyl monoxime (DAM) and thiosemicarbazide (TSC) in acid. The soils presented different potential of urea hydrolysis with temperature effect of incubation. The pasture soil presented higher activity ureolytic, followed by SPC, SPD and eucalyptus soil. The conformations evaluated of imine and pyrimidinone weren't effective in the activity inhibition of ureases. Although no significance, the conformations of pyrimidinone analized were more effective in the activity urease inhibition. The pyrimidinone 10, with the application of $1,0 \text{ } \mu\text{mol}$, show the higher activity resulting in the time of 25 hours of incubation to hydrolise 90 % of ureia added to the soil, Other conformations of imine and pyrimidinone should be synthesized and evaluated their inhibitor potential.

INTRODUÇÃO GERAL

A ureia é um composto nitrogenado que possui 46 % de N na forma amídica. Mais de 90 % da produção mundial são destinados ao uso como fertilizante. A produção de ureia a partir de amônia e gás carbônico, produzidos numa mesma unidade, torna o produto menos oneroso que os demais fertilizantes nitrogenados. Além disso, possui teor de N bem mais alto, comparativamente aos demais produtos, o que resulta menor custo de transporte e de estocagem por unidade de N.

O consumo brasileiro de N em 2010 foi de 2,855 milhões de tonelada, sendo que 2,179 milhões (76 %) foram importados (Associação..., 2011). Para atender esta demanda foram consumidos 3,32 milhões de ureia, que correspondeu a 51 % do consumo de fertilizantes nitrogenados. Apesar do maior consumo a eficiência agrônômica da ureia é comprometida pela elevada volatilização de NH_3 . Considerando que, em média, 60 % do N aplicado na forma de ureia são volatilizados como NH_3 , estima-se que em 2010 ocorreu perda equivalente a 2,49 milhões de toneladas de ureia. Tomando-se que o custo médio de venda ao consumidor naquele ano foi de US\$ 466,79 por tonelada (Associação..., 2011) tal perda corresponderia a 1,162 bilhões de dólares.

A volatilização de NH_3 a partir da ureia é mais acentuada em solos com baixo teor de matéria orgânica e de argila, baixa CTC, pH mais elevado, sendo ainda afetado pela qualidade e quantidade da cobertura morta (Corsi, 1994; Al-Kanani et al., 1991; Silva et al., 1995 & Sangoi et al., 2003). Com aplicação superficial da ureia, a amônia volatilizada pode alcançar 80 % do

nitrogênio aplicado no solo (Lara Cabezas et al., 1997), o que compromete a sua eficiência agrônômica e aumenta a quantidade de NH_3 na atmosfera.

A adubação com N-fertilizante sempre é realizada no sentido de se obter aumento em produtividade e aumento na eficiência de uso do nutriente. Considerando as perdas do N da ureia por volatilização de NH_3 e imobilização, torna-se fundamental o estudo com inibidores de ureases, reduzindo custos e aumentando a eficiência de adubação.

Alternativas industriais também são utilizadas para aumentar a eficiência de utilização da ureia. Várias substâncias têm sido estudadas com o objetivo de controlar a atividade da enzima urease e com isso reduzir a volatilização de amônia (Domínguez et al., 2008; Krajewska, 2009).

Os inibidores de ureases são substâncias que reduzem a velocidade de conversão de ureia em NH_3 , o que permite maior percolação da ureia. Como resultado, obtém-se redução da concentração de NH_3 na superfície do solo e, conseqüentemente, as perdas por volatilização. Dentre os inibidores, os mais efetivos são substâncias análogas à ureia, como fosforodiamidatos e fosfortriamidatos. O NBPT (tiofosfato de N-butiltriamida) é um composto que apresenta características de solubilidade e difusibilidade similares às da ureia e vem mostrando os melhores resultados, sendo o único utilizado comercialmente na área agrícola com a denominação de “Agrotain”. No entanto, a eficiência do NBPT tende a ser menor em solos ácidos e em altas temperaturas, quando há maior atividade de urease, dissolução mais rápida dos grânulos e maior evaporação da solução do solo, o que provoca a movimentação da ureia e da amônia em direção à superfície (Cantarella, 2008). Além disso, depois de adicionado à ureia, o NBPT tende a perder eficiência com o tempo de armazenamento (Hendrickson & Douglass, 1993; Tao et al., 2006).

O interesse por inibidores das ureases não se restringe à área agrícola; é também de extrema importância sua aplicação médica, por prevenir doenças nos tratos gástrico e urinário (Follmer, 2010).

LITERATURA CITADA

- AL-KANANI, T.; MACKENZIE, A.P. & BARTHAKUR, N.N. Soil water and ammonia volatilization relationships with surface-applied nitrogen fertilizer solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 55:1761-1766, 1991.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS – ANDA. Estatísticas. 2011. Disponível em: www.anda.org.br. Acesso em: 01 de jul. 2011.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; CONTIN, T. L. M.; DIAS, F. L. F.; ROSSETO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R. B. & QUAGGIO, J. A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. *Sc. Agric.*, 65:397-401, 2008.
- CORSI, M. Ureia como fertilizante na produção de forragem. In: Peixoto, A.M.; Moura, J.C. de; Faria, V.P., eds. *Uréia fertilizante*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1994. 239-267 p.
- DOMÍNGUEZ, M.J.; SANMARTÍN, C.; FONT, M.; PALOP, J.A.; SAN FRANCISCO, S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F. & GARCÍA-MINA, J.M. Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 56:3721–3731, 2008.
- FOLLMER, C. Ureasas as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J. Clin. Pathol.*, 63:424-430, 2010.

- HENDRICKSON, L.L. & DOUGLASS, E.A. Metabolism of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25:1613–1616, 1993.
- KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 59:9-21, 2009.
- LARA-CABEZAS, W.A.R.; KORNDORFER, G.H. & MOTTA, S.A. Volatilização de nitrogênio da amônia na cultura de milho: I. Efeito da irrigação e substituição parcial da uréia por sulfato de amônio. *R. Bras. Ci. Solo*, 21:481-487, 1997.
- SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; LECH, V.A. & RAMPAZZO, C. Volatilização de N-NH₃ em decorrência da forma de aplicação de uréia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. *Ciência Rural*, 33:687-692, 2003.
- SILVA, A. J.; LIMA JÚNIOR, M. A.; FERREIRA, N. C. M. & FRAGA; V. DA S. Perdas de amônia por volatilização proveniente da uréia aplicada a solos dos trópicos úmidos. *R. Bras. C. Solo*, 19:141-144, 1995.
- TAO, L.; YUANLIANG, S.; XUEWEN, L. & GUOLIN, L. Degradation and its affecting factors of NBPT in soil. *Chinese J. Ecol.*, 25:1082-1086, 2006.

CAPÍTULO 1

Atividade das ureases no solo com diferentes condições de uso

RESUMO

SANTANA, Ingrid Kely da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Atividade de ureases em solos sob diferentes condições de uso.** Orientador: Reinaldo Bertola Cantarutti. Coorientadores: Antônio Jacinto Demuner, Edson Marcio Mattiello e Sebastião Tavares de Rezende.

As ureases presentes nos solos são provenientes da síntese realizada por microrganismos, principalmente por bactérias, e de resíduos vegetal e animal. A atividade das ureases aumenta com a elevação da umidade, da temperatura e do pH do solo, e ainda, é influenciada pelo tipo de vegetação e a quantidade do material orgânico incorporado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade das ureases nos solos de cultivo agrícola em sistema de plantio direto e convencional, de pastagem e de eucalipto. Para o ensaio de hidrólise amostras de 2,5 g foram tratadas com 10 mg de ureia e submetidas a incubação por 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120 e 168 h a 30 e 4 °C, que foi iniciada de forma escalonada para que fosse concluída simultaneamente. A incubação a 4 °C foi até 72 h. A ureia remanescente foi extraída com solução mista de KCl 2 mol L⁻¹ e 5 mg L⁻¹ de acetato de fenilmercúrio (PMA) e determinada por meio do método espectrofotométrico (527 nm). Os solos apresentaram diferenciado potencial de hidrólise da ureia

com efeito da temperatura de incubação. A baixa temperatura limitou a síntese e, ou a atividade das ureases em razão da diminuição da atividade dos microrganismos ureolíticos. O solo de pastagem apresentou maior atividade ureolítica, levando apenas 11 e 21 horas para hidrolisar 50 % da ureia adicionada no solo. O solo de SPC e de SPD hidrolisou 50 % da ureia em 25 e 24 h, respectivamente, mas para hidrolisar 90 % da ureia o solo de SPD levou 52 h, enquanto que o SPC isso ocorreu em 33 h. O solo de eucalipto apresentou menor atividade hidrolítica a 30 °C, resultando um maior tempo, 47 e 95 h, para hidrolisar 50 e 90 % da ureia, respectivamente. No entanto, na incubação a 4 °C a hidrólise no solo do SPD e de eucalipto foi mais intensa que no solo do SPC. Conclui-se que o solo de pastagem apresenta maior atividade ureolítica, seguido do solo do sistema de plantio convencional, do sistema de plantio direto e de eucalipto.

ABSTRACT

SANTANA, Ingrid Kely da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Ureases activity in soil under different use conditions**
Advisor: Reinaldo Bertola Cantarutti. Co-Advisors: Antônio Jacinto Demuner, Edson Marcio Mattiello and Sebastião Tavares de Rezende.

The ureases present in soil are realized by microorganism syntheses, principally bacteria and vegetable residue and animal. The urease activity increase with the elevation of humidity, temperature, soil pH and the kind of vegetation and the quantity of organic matter incorporated. The aim of this study was evaluate the activity of ureases in soil as crop, tillage and conventional system from pasture and eucalyptus. To the essays of hydrolysis samples of 2,5 g were treated with 10 mg of urea and submitted to incubation for 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120 and 168 h in 30 and 4 °C, that was initiated of staggered form to conclude simultaneously the experiments. The incubation at 4 °C was until 72 h, The urea remaining was extracted through mixed solution of KCl 2 mol L⁻¹ and 5 mg L⁻¹ phenylmercury acetate (PMA) and quantified by spectrophotometer method (527 nm). The soils presented different potential of hydrolysis of urea with incubation temperature effect. The low temperature limited the synthesis and, or the activity of ureases in case of the decrease of ureolytic microorganisms activity. The soil pasture presented higher ureolytic activity, with only 11 and 21 hours to hydrolyze 50 % of the urea that was added in the soil. The SPC and SPD hydrolyzed 50 % of the urea in 25 and 24 hours, respectively, but to hydrolyze 90 % of urea in SPD soil took 52 hours whereas in SPC soil occurred on 33 hours. The eucalyptus soil presented lower

hydrolytic activity at 30 °C, resulting in a larger time, 47 and 95 hours to hydrolyze 50 and 90 % of urea, respectively. However, in the incubation of 4 % the hydrolysis in SPD and eucalyptus soil were more intense than in the SPC soil. It is concluded that the pasture soil presented higher ureolytic activity, followed by the conventional tillage system and eucalyptus soil.

INTRODUÇÃO

Ureases (ureia amido hidrolases) são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono. Dentre as enzimas que constitui o grupo, incluem-se as glutamases e amidases. As ureases são amplamente distribuídos na natureza, sendo, produzidos, principalmente por micro-organismos e também, estão presentes em resíduos vegetais e animais (Freney & Black, 1998; Witte, 2011). O pH ótimo para a atividade das ureases situa-se entre 7 e 8 (Krajewska, 2009).

De acordo com a origem, a composição estrutural da urease é variável, o que justifica a concepção da existência de ureases. As ureases são constituídas por subunidades catalíticas: UreA, UreB e UreC. Cada subunidade corresponde a uma cadeia polipeptídica (sequência de aminoácido) de domínio alfa, beta e gama, respectivamente (Sirko & Brodzik, 2000). O alto grau de similaridade entre as sequências de aminoácidos indica que todas são variantes de uma mesma proteína ancestral, o que resulta em isoformas com mecanismos catalíticos similares de hidrólise da ureia (Ciurli et al., 1999).

A urease de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) foi a primeira enzima a ser cristalizada (Sumner, 1926). Sua unidade estrutural básica constitui-se de uma única subunidade com 840 aminoácidos. Nas plantas, a urease é um hexâmero de seis cadeias idênticas e localiza-se no citoplasma. Já as ureases bacterianas são multímeros de duas ou três subunidades distintas, como por exemplo, a urease das bactérias *Helicobacter pylori*, *Klebsiella aerogenes* e *Bacillus pasteurii*. O sítio ativo de todas as ureases

possui dois átomos de níquel e quatro moléculas de água próximas a eles, em coordenação com resíduos de histidina e lisina (Dixon,1980; Jabri et al. 1995).

A hidrólise da ureia no solo resulta em rápida produção de NH_3 e CO_2 . A amônia pode ser convertida em NH_4^+ , de acordo com a atividade de H^+ . Em razão da formação do íon NH_4^+ , a hidrólise da ureia causa elevação do pH, principalmente ao redor das partículas do fertilizante, favorecendo a volatilização de NH_3 (Rodrigues & Kiehl, 1986; Ouyang et al. 1998).

Quando a ureia é aplicada na superfície do solo, a perda de nitrogênio por volatilização da NH_3 pode alcançar 80 % do total aplicado (Lara-Cabezas et al., 1997), o que compromete a sua eficiência agrônômica e aumenta a quantidade de NH_3 na atmosfera. A presença de palhada, além de reduzir o contato da ureia com o solo, favorece maior atividade microbiana, o que resulta em maior produção de ureases e, conseqüentemente, maior hidrólise e produção de NH_3 (Barreto & Westerman, 1989; Sangoi et al., 2003). Além disso, há elevada atividade de ureases na palhada em razão da ureia produzida pelo catabolismo da arginina na senescência do tecido vegetal (Witte, 2011).

A atividade das ureases aumenta com a elevação da umidade, da temperatura e do pH do solo (Longo & Melo, 2005; Krajewska, 2009; Tasca et al., 2011). É também influenciada pelo tipo de vegetação e pela quantidade de material orgânico incorporado. O efeito do material orgânico na atividade das ureases dependerá da sua disponibilidade como fonte energética para os microrganismos e da facilidade de sua mineralização. No sistema de plantio direto (SPD), por exemplo, a ausência de revolvimento do solo e a deposição de restos vegetais de alta relação C/N estimulam a atividade das ureases, em razão da maior diversidade de micro-organismos e da atividade de enzimas (Lanna et al., 2010). Quando se emprega o sistema convencional de preparo do solo (aração + gradagem), existe uma distribuição mais uniforme do material orgânico e dos nutrientes nas camadas superficiais, o que estimula uma rápida mineralização e, por conseguinte, reduz a manutenção de complexos enzimas-ácidos húmicos nos colóides orgânicos dos solos (Alvarez et al., 1995). Segundo Santos et

al. (1991), a hidrólise da ureia pode ser atenuada de acordo com o tipo de vegetação, em razão da ação inibitória de compostos orgânicos exsudados pelo sistema radicular ou oriundos da decomposição dos restos vegetais.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade das ureases em solo de cultivo agrícola em sistema de plantio direto e convencional, em solo de pastagem e de eucalipto.

MATERIAL E MÉTODOS

Os solos de cultivo agrícola em sistema de plantio direto, sistema de plantio convencional e de pastagem foram coletados em áreas de unidades experimentais da UFV, em Viçosa, MG e o solo de eucalipto em uma fazenda no município de Paula Cândido, MG. O solo de cultivo agrícola é um Argissolo Vermelho-Amarelo câmbico fase terraço e os solos de pastagem e de eucalipto são Argissolos Vermelho-Amarelo. As amostras de solos foram coletadas nos primeiros cinco centímetros, secas ao ar e passadas por peneira com malha de 2 mm. O histórico de uso e principais características das áreas são apresentadas no quadro 1 e as características químicas e físicas dos solos no quadro 2.

Quadro 1. Características dos sistemas de uso das áreas em que foram coletadas as amostras de solo

Solo	Sistema de uso
Pastagem (PA)	Pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> implantada em 1973, e atualmente integra o Sistema de Produção de Gado de Corte do DZO/UFV. Manejada com pastejo contínuo semi-intensivo com bovino e sem adubações e calagem frequentes.
Sistema de plantio convencional (SPC)	Plantio de milho e feijão em sucessão para fins experimentais ou de produção por mais de 10 anos, com irrigação por meio de um pivô central. O preparo do solo predominante foi uma aração e duas gradagens. O controle de plantas espontâneas tem sido feito com herbicidas de pré-emergência e de contato. A calagem e as adubações foram de acordo com as particularidades dos experimentos ou da produção comercial.
Sistema de plantio direto (SPD)	Área contígua à do SPC. Cultivada há mais de 10 anos em SPD com cultivo de milho no verão sucedido por feijão no inverno (safrinha) para fins experimentais ou de produção, com irrigação por meio de um pivô central. O controle das plantas daninhas tem sido feito com herbicida de pré e pós-emergência para o milho e pós-emergência para o feijão. A calagem e as adubações foram de acordo com as particularidades dos experimentos ou da produção comercial.
Eucalipto (PE)	Floresta implanta em 1997. O plantio foi realizado no espaçamento 3 x 2 m, com adubação de plantio recomendada para a cultura e o preparo do solo consistiu de uma aração e uma gradagem.

Quadro 2. Características químicas e físicas da camada de 0-5 cm dos solos em diferentes sistemas de uso

Solo ⁽¹⁾	pH _{H2O}	P ⁽²⁾	K ⁽²⁾	Al ³⁺ ⁽³⁾	Ca ²⁺ ⁽³⁾	Mg ²⁺ ⁽³⁾	H+Al ⁽⁴⁾	V	MO ⁽⁵⁾	Areia	Silte	Argila
		mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³			%	dag kg ⁻¹	g kg ⁻¹		
PA	5,79	5,3	198	0	3,42	1,89	4,7	56	6,40	580	60	360
SPC	5,7	19	141	0	2,03	0,99	3,2	51	2,43	450	90	460
SPD	6,78	38,6	168	0	5,4	1,96	1,7	82	4,61	320	180	500
PE	4,57	6,6	49	1,33	1,26	0,46	10	16	7,68	520	50	430

⁽¹⁾ PA: Pastagem; SPC: Sistema de plantio convencional; SPD: Sistema de plantio direto; PE: Eucalipto
⁽²⁾ Extrator Mehlich-1; ⁽³⁾ Extrator KCl 1 mol L⁻¹; ⁽⁴⁾ Extrator CaOAc pH 7,0; ⁽⁵⁾ Walckey-Black

Para o ensaio de hidrólise da ureia utilizou-se o método de Bremner (1982). Amostras de 2,5 g de solo (< 1 mm) foram transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL, e receberam um volume de água ultra pura para elevar a umidade até 70 % da capacidade de campo. Após vinte e quatro horas, adicionaram-se 10 mg de ureia (0,5 mL de uma solução 20 g L⁻¹). Os tubos com solo foram preparados de forma escalonada para que os tempos de incubação de 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120 e 168 h fossem concluídos simultaneamente. Também foram acrescentados tubos com solo sem adição de ureia (testemunha) para cada tempo de incubação. A incubação foi conduzida em duas temperaturas, 30 e 4 °C, sendo que nessa última condição, a incubação foi até 72 horas.

Ao final da incubação determinou-se a ureia remanescente. Para isso, adicionaram-se aos tubos 25 mL de uma solução de KCl 2 mol L⁻¹ contendo 5 mg L⁻¹ de acetato de fenilmercúrio (PMA). Os tubos foram agitados por uma hora e obteve-se o extrato por meio de filtração em papel de filtro com poros de 8 µm. A ureia no extrato foi quantificada por meio de método espectrofotométrico (527 nm), com uso de diacetil monoxime (DAM) e tiosemicarbazida (TSC) em meio ácido (H₂SO₄ e H₃PO₄) de acordo com Bremner (1982).

A ureia hidrolisada (U_{hidr}) foi estimada por: $U_{hidr} = 10 + U_0 - U_{rem_i}$, em que: 10 mg é a quantidade de ureia adicionada, U₀ é a quantidade de ureia natural do solo para cada tempo de incubação (testemunha) e U_{rem_i} é a

quantidade de ureia remanescente ao fim de cada tempo “i” de incubação. A ureia hidrolisada foi expressa em relação entre a quantidade de ureia adicionada ao solo (mg mg^{-1}).

Os tratamentos consistiram da combinação fatorial entre os quatro usos dos solos, 10 tempos de incubação mais um controle (sem adição de ureia) para cada solo [(4 x 10) + 4] no ensaio a 30 °C. No ensaio com temperatura de 4 °C foram oito tempos de incubação, portanto o fatorial foi [(4 x 8) + 4]. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Os dados de hidrólise da ureia (U_{hidr}) foram submetidos à análise de variância. Foram ajustadas equações de regressão para variação da U_{hidr} de acordo com o tempo de incubação.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os solos apresentaram diferente potencial de hidrólise da ureia, sendo esse potencial fortemente influenciado pela temperatura de incubação (Figura 1). A hidrólise da ureia foi mais acentuada na maior temperatura (Figura 1a).

Na temperatura de 4 °C, a hidrólise foi mais intensa no solo de pastagem e do SPD, o que evidencia a influência da quantidade, qualidade e contínuo aporte de resíduos orgânicos (Figura 1b), conforme constatado por Longo & Melo (2005) e Lanna et al. (2010).

Verificou-se que 90 % da ureia foi hidrolisada em 23, 33 e 51 h no solo de pastagem, do SPC e do SPD, respectivamente, enquanto que o solo de eucalipto isto ocorreu em 94 h (Quadro 3). Estudos em condições de campo demonstram que o pico de volatilização de NH_3 a partir da ureia ocorre entre dois e quatro dias após a aplicação (Tasca et al., 2011; Grohs et al., 2011).

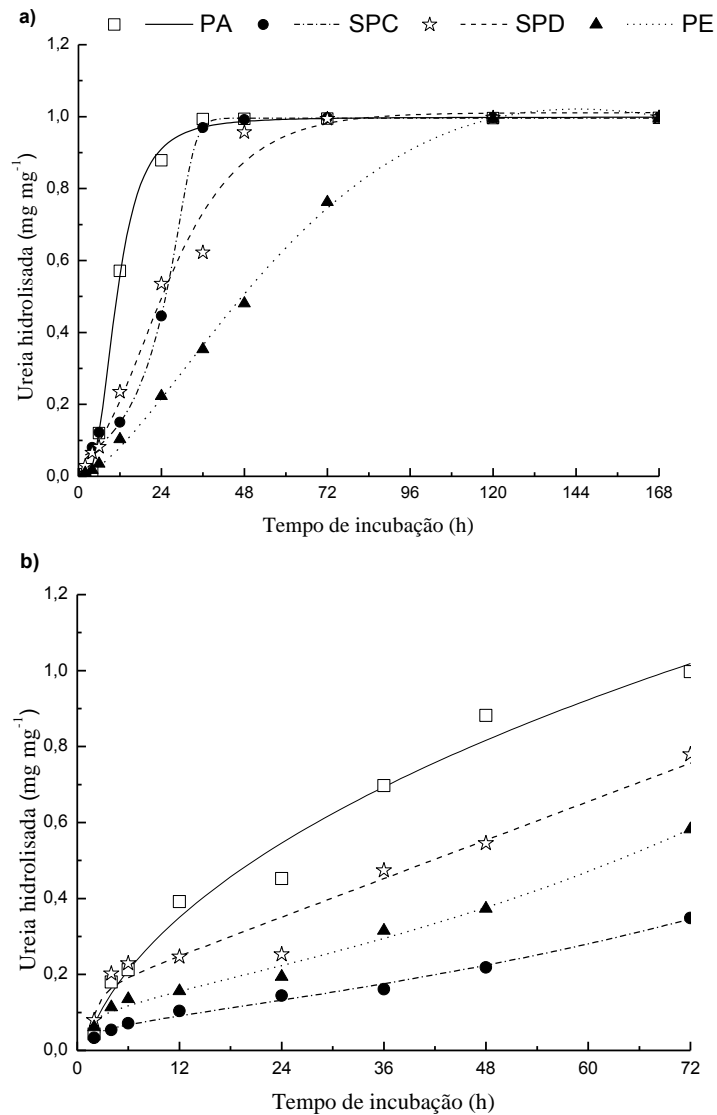


Figura 1. Ureia hidrolisada (mg mg⁻¹) de acordo com o tempo de incubação (h) em amostras de solo de pastagem (PA), de sistema plantio convencional (SPC), de sistema plantio direto (SPD) e de plantio de eucalipto (PE) incubadas com 10 mg de ureia a 30 (a) e 4 °C (b).

O solo de pastagem apresentou maior atividade ureolítica, levando apenas 11 e 21 horas para ocorrer a hidrólise da metade quantidade de ureia adicionada ao solo (Quadro 3). Esta rápida hidrólise evidenciou elevada atividade ureolítica que pode ser atribuída à contínua adição de ureia por meio das excreções dos bovinos em pastejo, o que estimula a produção da urease. Além disso, na pastagem há contínuo aporte de resíduos vegetais. Esses fatores estimulam o aumento da diversidade dos microrganismos e da

atividade enzimática.

O solo de SPC e de SPD hidrolisou 50 % da ureia em 25 e 24 h, respectivamente, enquanto que para hidrolisar 90 % da ureia o solo de SPD apresentou um tempo maior (52 h) comparado com o SPC que levou apenas 33 h (Quadro 3). Apesar do solo do SPD apresentar maior teor de matéria orgânica, tal resultado evidencia a importância da qualidade dos resíduos para a maior diversidade de microrganismo e maior atividade das ureases, considerando que em ambos sistemas utilizou-se a sucessão de plantio milho-feijão.

O solo de eucalipto apresentou a 30 °C a menor atividade hidrolítica (Figura 1a), resultando um maior tempo para hidrolisar 50 % da ureia (47 horas). A menor atividade da urease pode ser atribuída à uma baixa atividade microbiana decorrente da natureza dos resíduos do eucalipto, o que é evidenciado pelo maior teor de matéria orgânica (Quadro 2), e ainda em razão da menor fertilidade do solo. Facci et al. (2008) também encontrou baixa atividade de urease em solos de eucalipto, o que atribuíram à menor diversidade de microrganismos causado por compostos orgânicos exsudados pelo sistema radicular, ou oriundos da mineralização dos restos vegetais.

Na incubação a 4 °C, no entanto, a hidrólise no solo do SPD e de eucalipto foi mais intensa do que no solo do SPC. Considerando que a baixa temperatura limita a atividade microbiana e a síntese de ureases, tais resultados podem ser atribuídos a uma maior proteção das ureases presentes nos solos do SPD e de eucalipto, por meio da interação com a fração humificada da matéria orgânica.

Quadro 3. Equações de regressão para a quantidade de ureia hidrolisada (mg mg⁻¹) de acordo com o tempo de incubação em amostras de solo de pastagem (PA), de sistema plantio convencional (SPC), de sistema plantio direto (SPD) e de plantio de eucalipto (PE) incubadas com 10 mg de ureia a 30 e 4 °C, correlação entre valores estimados e observados (R²) e tempo (h) para hidrolisar 50 e 90 % da ureia

Solo	Equação	R ²	50 %	90 %
Temperatura 30 °C				
			----- h -----	
PA	$\hat{y} = (-27,075 + X^{3,01}) / (1353,8 + X^{3,01})$	0,999	11	23
SPC	$\hat{y} = 0,996 / (1 + (e^{17,4 - 0,53X})^{0,173})$	0,999	25	33
SPD	$\hat{y} = 1,011 * e^{-e^{(1,25 - 0,066X)}}$	0,999	24	52
PE	$\hat{y} = 0,00165^X X^{0,006}$	0,999	47	95
Temperatura 4 °C				
PA	$\hat{y} = 0,023^{(1/X)} X^{0,54}$	0,999	21	58
SPC	$\hat{y} = 0,035^X X^{0,33}$	0,999	95	132
SPD	$\hat{y} = 0,15 + 0,008X - 0,29/X^2$	0,999	42	89
PE	$\hat{y} = 0,0648^X X^{0,29}$	0,999	64	98

CONCLUSÃO

Conclui-se que o solo de pastagem apresenta maior atividade ureolítica, seguido do solo do sistema de plantio convencional, do sistema de plantio direto e de eucalipto.

A hidrólise total da ureia a 30 °C, ocorre em 36, 48, 72 e 120 h no solo de pastagem, do SPC, do SPD e eucalipto, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- ALVAREZ, R.; DÍAZ, R.A.; BARBERO, N.; SANTANATOGLIA, O.J. & BLOTTA, R. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from three tillage systems. *Soil Till. Res.*, 33:17-28, 1995.
- BARRETO, H.J. & WESTERMAN, R.L. Soil urease activity in winter wheat residue management systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53:1455-1458, 1989.
- BREMNER, J. M. Nitrogen-Urea. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H. & KEENEY, D. R., eds. *Methods of soil analysis, Number 9 (Parte 2)*. Madison, Am. Sci. of Agronomy/Soil Sci. Soc. Am., 1982. p.699-709.
- CIURLI, S.; BENINI, S.; RYPNIEWSKI, R. W.; MILETTI, S. & MANGANI, S. Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coord. Chem. Rev.*, 190:331-355, 1999.
- DIXON, N.E.; RIDDLES, P.W.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R.L. & ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Can. J. Biochem.*, 58:1335–1344, 1980.
- FACCI, L.D.; FREITAS, S.S. & DE MARIA, I.C. Atividade de urease e microrganismos amonificadores sob diferentes usos de solo. In: CONGRESSO FERTBIO, 2008, Londrina-PR.

- FRENEY, J. R. & BLACK, A. S. Importance of ammonia volatilization as a loss process. In: Wilson, J. R. (Ed). Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems. CAB International, Wallingford, p.156-173. 1998.
- GROHS, M.; MARCHESAN, E.; SANTOS, S. D.; MASSONI, P. F. S.; SARTORI, G. M. S. & FERREIRA, R. B. Resposta do arroz irrigado ao uso de inibidor de urease em plantio direto e convencional. Ciênc. agrotec., Lavras, 35:336-345, 2011.
- JABRI, E.; CARR, M.B.; HAUSINGER, R.P. & KARPLUS, P.A. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. Science, 268:998-1004, 1995.
- KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. J. Mol. Catal. B: Enzym., 59:9-21, 2009.
- LANNA, A. C.; SILVEIRA, P. M.; SILVA, M. B.; FERRARESI, T. M. & KLIEMANN, H. J. Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. R. Bras. Ci. Solo, 34:1933-1939, 2010.
- LARA-CABEZAS, W.A.R.; KORNDORFER, G.H. & MOTTA, S.A. Volatilização de nitrogênio da amônia na cultura de milho: I. Efeito da irrigação e substituição parcial da uréia por sulfato de amônio. R. Bras. Ci. Solo, 21:481-487, 1997.
- LONGO, R.M. & MELO, W.J. Atividade da urease em Latossolos sob influência da cobertura vegetal e da época de amostragem. R. Bras. Ci. Solo, 29: 645-650, 2005.
- OUYANG, D.; MACKENZIE, A.F. & FAN, M. Phytotoxicity of banded urea amended with triple superphosphate and potassium chloride. Agronomy J., 90:734-739, 1998.

- RODRIGUES, M.B. & KIEHL, J.C. Volatilização de amônia após o emprego de uréia em diferentes doses e modos de aplicação. R. Bras. C. Solo, 10:37-43, 1986.
- SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; LECH, V.A. & RAMPAZZO, C. Volatilização de N-NH₃ em decorrência da forma de aplicação de uréia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. Ciência Rural, 33:687-692, 2003.
- SANTOS, A.R.; VALE, F.R. & SANTOS, J.A.G. Avaliação de parâmetros cinéticos da hidrólise da uréia em solos do sul de Minas Gerais. R. Bras. Ci. Solo, 15:309-313, 1991.
- SIRKO, A. & BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. Act. Biochim. Pol., 47:1189-1195, 2000.
- SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. J. Biol. Chem., 69:435-441, 1926.
- TASCA, F. A., ERNANI, P. R., ROGERI, D. A., GATIBONI, L. C. & CASSOL, P. C. Volatilização de amônia do solo após a aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. R. Bras. Ci. Solo, 35: 493-502, 2011.

CAPÍTULO 2

Piridinonas e iminas como inibidoras de ureases em solo

RESUMO

SANTANA, Ingrid Kely da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Piridinonas e iminas como inibidoras de ureases no solo.** Orientador: Reinaldo Bertola Cantarutti. Orientadores: Antônio Jacinto Demuner, Edson Marcio Mattiello e Sebastião Tavares de Rezende.

A ureia é o principal fertilizante nitrogenado, porém apresenta problemas de perdas de nitrogênio por volatilização da amônia. No solo, a dinâmica da ureia envolve a ação das ureases, que são provenientes da síntese realizada por microrganismos, principalmente por bactérias, e de resíduos vegetal e animal. Os inibidores de ureases são empregados para minimizar a volatilização de NH_3 a partir da hidrólise da ureia. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de compostos do grupo iminas e piridinonas na inibição da atividade das ureases no solo. Foram avaliados 11 compostos com potencial de inibição na atividade das ureases, cinco iminas, cinco piridinonas e um inibidor de referência que é um efetivo inibidor da urease, o PMA. Para o ensaio de cinética de hidrólise da ureia utilizou-se amostra de 2,5 g de solo de pastagem e através do método espectrofotométrico (527 nm) determinou-se a ureia remanescente após os períodos de incubação. As amostras foram tratadas com 10 mg de ureia e 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 μmol das iminas ou piridinonas ou PMA em tubos separados. Também foram acrescentados tubos com solo com ureia e sem

inibidor (controle) e solo sem ureia e sem inibidor (testemunha). A incubação foi feita de forma escalonada para que os tempos de 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h fossem concluídos simultaneamente, em incubadora a 30 °C. Não ocorreu diferença significativa entre a cinética de hidrólise da ureia no controle e no solo com as iminas e piridinonas. Para o PMA a hidrólise da ureia foi significativamente menor, foram demandas de 13 a 19 h para hidrolisar metade da máxima hidrólise (50 %). As iminas 1, 2 e 3, na dose de 0,75 μmol apresentaram os tempos de 11, 10,6, 10,3 h, respectivamente para hidrolisar 50 % da ureia. A piridinona 10 mostrou-se mais ativa resultando em um tempo de 25 h para hidrolisar 90 % da ureia, o que pode ser atribuído a presença do anel furano na sua estrutura. Tais resultados sugerem que outras conformações deverão ser sintetizadas e avaliadas quanto ao seu potencial inibidor.

ABSTRACT

SANTANA, Ingrid Kely da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Pyrimidinone and imine used as urease inhibitor in soil.** Advisor: Reinaldo Bertola Cantarutti. Co-Advisors: Antônio Jacinto Demuner, Edson Marcio Mattiello and Sebastião Tavares de Rezende.

Urea is the main nitrogen fertilizer, but presents problems of nitrogen losses because the ammonia volatilization. On the soil, the dynamics of urea involves the action of urease, which are made from synthesis by microorganisms, mainly bacteria, and plant and animal waste. Urease inhibitors are employed to minimize volatilization of NH_3 from the hydrolysis of urea. The aim of this study was to evaluate the potential of compounds of the group of imine and pyrimidinone in inhibition of urease activity in soil. Eleven compounds with potential to inhibit the activity of urease, five imine, five pyrimidinone and an inhibitor of reference that is an effective inhibitor of urease (PMA) were evaluated. For the kinetic hydrolysis of urea, 2.5 g sample of soil and pasture were used through the spectrophotometric method (527 nm) to determine the urea remaining after the incubation periods. The samples were treated with 10 mg of urea and 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 μmol of imine or pyrimidinone or PMA in separate tubes. Tubes of soil with urea without inhibitor (control) and soil without urea without inhibitor (control) have also been added. The incubation was done incrementally so that the times of 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 h were simultaneously completed in an incubator at 30 ° C. There was no significant difference between the kinetics of hydrolysis of urea in control and in soil with imine and

pyrimidinone. For PMA, the hydrolysis of urea was significantly lower in which times of 13 to 19 h to hydrolyze half of the maximum hydrolysis (50%) were demanded. The imines 1, 2 and 3 at a dose of 0.75 μmol presented times of 11, 10.6, 10.3 h, respectively to hydrolyze 50 % of the urea. The pyridinone 10 was more active resulting in a time of 25 h to hydrolyze 90 % of the urea, which can be attributed to the presence of the ring stuck in their structure. These results suggest that other conformations should be synthesized and evaluated for determination of its potential inhibitor.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos principais determinantes da produtividade das culturas e a limitada capacidade de suprimento do solo faz com que a fertilização nitrogenada seja imprescindível.

A ureia é o principal fertilizante nitrogenado utilizado no Brasil, em razão do elevado teor de N (46 %), do menor custo e melhores características químicas e físicas em relação a outros fertilizantes nitrogenados.

No solo, a dinâmica da ureia envolve a ação da enzima urease, amplamente encontrada nos solos (Mulvaney & Bremner, 1979) e originada da atividade dos microrganismos e de resíduos vegetal e animal (Freney & Black, 1998). O pH ótimo para a atividade das ureases situa-se entre 7 e 8 (Krajewska, 2009). Os principais produtos da hidrólise da ureia são NH_3 e CO_2 . A amônia pode ser convertida em NH_4^+ , de acordo com a atividade de H^+ . Em razão da formação do íon NH_4^+ , a hidrólise da ureia causa elevação do pH, principalmente ao redor das partículas do fertilizante, favorecendo a volatilização de NH_3 (Rodrigues & Kiehl, 1986; Ouyang et al. 1998). Desse modo, a redução da atividade das ureases, pode reduzir as perdas de NH_3 . Tem sido demonstrado que a adição de compostos inibidores de ureases à ureia diminui as perdas de nitrogênio por volatilização da amônia (Cantarella, 2007; Domínguez, 2008).

Os mecanismos de ação das ureases mais aceitos atualmente são os descritos por Karplus (1997) e Benini (1999). Os autores observaram que a inibição da urease pode envolver mudanças na conformação estrutural da enzima, impedindo sua união com o substrato (inibidor não competitivo) ou

os compostos podem ocupar temporariamente o centro ativo da enzima, por semelhança estrutural (inibidor competitivo). No entanto, segundo Krajewska (2009), as propostas de mecanismos de ação da enzima sobre o substrato ou de sua interação com os inibidores ainda são controversas e precisam ser esclarecidas.

Tendo em vista a tendência de prevalência da ureia na matriz mundial de fertilizantes nitrogenados, faz-se necessária a busca por alternativas eficientes e economicamente viáveis, que visam diminuir as perdas de NH_3 por volatilização e elevem a eficiência agrônômica da ureia.

Atualmente, dentre os inibidores, o tiofosfato de N-butiltriamida (NBPT), tem se mostrado promissor, sendo o único utilizado comercialmente na área agrícola, com a denominação de “Agrotain”. A eficiência do NBPT tende a ser menor em solos ácidos, em altas temperaturas, quando há maior atividade de urease, maior dissolução dos grânulos e maior evaporação da solução do solo, o que provoca a movimentação da ureia e da amônia em direção à superfície (Cantarella, 2008). Além disso, depois de adicionado à ureia, o NBPT tende a perder eficiência com o tempo de armazenamento (Hendrickson & Douglass, 1993; Tao et al., 2006).

Compostos com atividade aleloquímica têm sido utilizados como modelo na identificação de compostos inibidores das ureases. As iminas e piridinonas estão presentes em um grande número de compostos com atividade biológica, como antibacteriana, antifúngica, analgésica, anti-inflamatória, dentre outras (Öztürk et al., 2001; Evidente et al., 2006; Macdonald et al., 2008). Apesar de haver relatos na literatura da síntese de iminas e piridinonas (Findlay et al., 1978; Demuner et al., 2009; Chen et al., 2010; You et al., 2010), observa-se uma escassez de informações sobre seu potencial inibidor da urease.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de compostos dos grupos iminas e piridinonas na inibição da atividade das ureases em solo de pastagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas cinco iminas (1-5) (Figura 1) sintetizadas no Departamento de Química da UFMG e cinco piridinonas (6-10) (Figura 1) sintetizadas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV (Valente, 2010). Como composto de referência foi utilizado o acetato de fenilmercúrio (PMA) (11), que é um efetivo inibidor das ureases (Figura 1).

Alguns destes compostos tiveram sua atividade inibidora previamente comprovada em ensaios *in vitro* com urease de *Canavalia ensiformis* (Valente, 2010). A inibição da hidrólise da ureia foi de 34 % para o composto 4, 35 % para o composto 5, 22 % para o composto 6, 37% para o composto 7, 34 % para o composto 8, 35 para o composto 9 e 32 % para o composto 10.

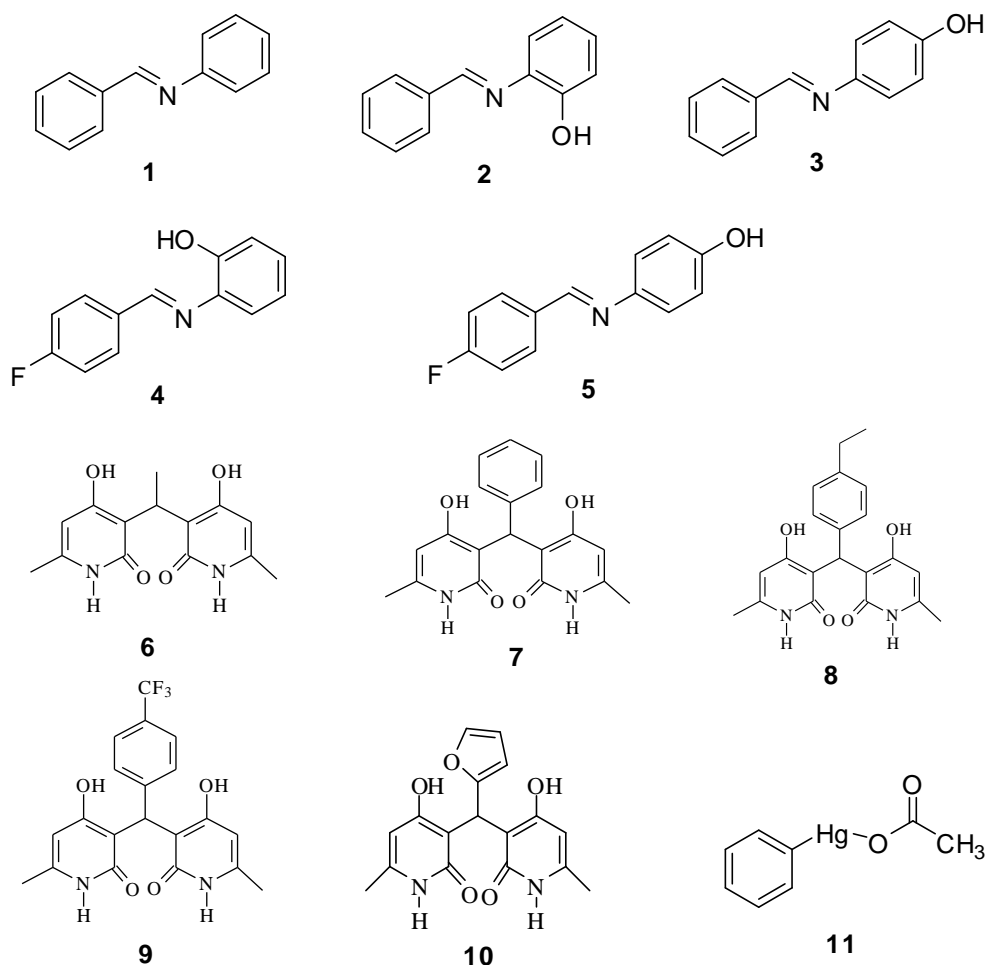


Figura 1- Representação estrutural das iminas (1-5), das piridinonas (6-10) e do acetato de fenilmercúrio (PMA) (11).

Para o ensaio de cinética de hidrólise da ureia, foi utilizada amostra da camada de 0 a 5 cm de um Argissolo Vermelho-Amarelo coletada em uma pastagem de *Brachiaria bizantha* cv Marandú. A análise química e física do solo apresentou: pH em água de 5,79; 64 g kg⁻¹ de matéria orgânica (Walckey-Black); 5,3 mg dm⁻³ de P (Mehlich-1); 198 mg dm⁻³ de K (Mehlich-1); 0 de Al³⁺ (Extrator KCl 1 mol L⁻¹); 3,42 cmol_c dm⁻³ de Ca²⁺ (Extrator KCl 1 mol L⁻¹); 1,89 cmol_c dm⁻³ de Mg²⁺ (Extrator KCl 1 mol L⁻¹); 4,70 cmol_c dm⁻³ de H⁺ Al (Extrator CaOAc pH 7,0); 55,5 de V %; 580 g Kg⁻¹ de areia; 60 g Kg⁻¹ de silte e 360 g Kg⁻¹ de argila.

O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Bremner (1982). Amostras de 2,5 g (< 1 mm) de solo foram transferidas para tubos de centrifuga de 50 mL e receberam volume de água ultra pura para

elevar a umidade até 70 % da capacidade de campo. Após vinte e quatro horas, adicionaram-se 10 mg de ureia (0,5 mL de uma solução 20 g L⁻¹) e 0,25, 0,50, 0,75 ou 1,0 µmol das iminas ou piridinonas ou PMA em tubos separados, que em relação à massa de ureia, corresponderam a 250, 500, 750 e 1000 µmol g⁻¹ de ureia. Também foram acrescentados tubos com solo com ureia e sem inibidor (controle) e solo sem ureia e sem inibidor (testemunha). Os tubos com solo foram preparados de forma escalonada para que os tempos de incubação de 6, 12, 24, 48 e 72 h fossem concluídos simultaneamente, em incubadora a 30 °C.

Ao final da incubação determinou-se a ureia remanescente. Para isto adicionaram-se aos tubos 25 mL da solução de KCl 2 mol L⁻¹ contendo 5 mg L⁻¹ de acetato de fenilmercúrio (PMA). Os tubos foram agitados por uma hora e obteve-se o extrato por meio de filtração em papel de filtro com poros de 8 µm. A ureia no extrato foi quantificada por meio de método espectrofotométrico (527 nm) com uso de diacetil monoxime (DAM) e tiosemicarbazida (TSC) em meio ácido (H₂SO₄ e H₃PO₄), de acordo com Bremner (1982).

A quantidade de ureia hidrolisada (U_{hidr}) foi estimada por: $U_{\text{hidr}} = 10 + U_0 - U_{\text{rem}_i}$, em que: 10 mg é a quantidade de ureia adicionada, U_0 é a quantidade extraída do solo sem a adição de ureia (testemunha) para cada tempo de incubação e U_{rem_i} é a quantidade de ureia remanescente ao fim de cada tempo de incubação. A quantidade de ureia hidrolisada foi expressa em relação entre a quantidade de ureia hidrolisada e ureia adicionada no solo (mg mg⁻¹).

Os tratamentos consistiram da combinação fatorial entre 11 substâncias, quatro doses, mais o tratamento sem inibidor em cinco tempos de incubação [(11 x 4) + 1] x 5). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições.

Os dados da quantidade de ureia hidrolisada (U_{hidr}) foram submetidos à análise de variância. Foram ajustadas equações de regressão para variação da U_{hidr} de acordo com o tempo de incubação.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As curvas que relacionam a quantidade de ureia hidrolisada com o tempo de incubação caracterizam a cinética da hidrólise da ureia no solo sem adição de inibidor (controle) ou com adição de PMA (Figuras 2) e com a adição das iminas (Figura 3) ou das piridinonas (Figura 4). O solo apresentou elevada atividade das ureases, considerando que em 24 h, 100 % da ureia adicionada ao solo foi hidrolisada (controle), enquanto que, com a menor e maior dose do inibidor PMA, 80 e 60 % da ureia foram hidrolisados nesse período, respectivamente (Figura 2).

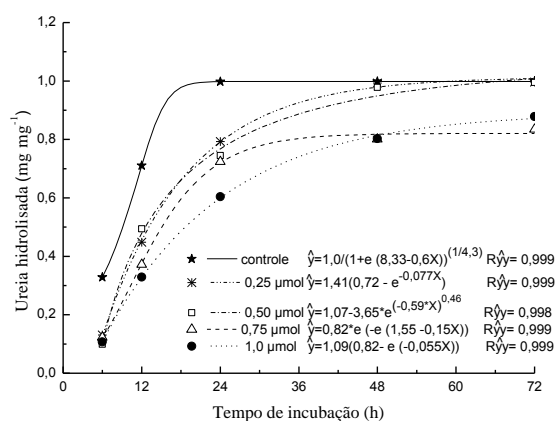


Figura 2. Ureia hidrolisada (mg mg⁻¹) de acordo com o tempo de incubação (h) a 30 °C em amostras de solo com 10 mg de ureia sem a adição de inibidor (controle) ou com adição de 0,25, 0,50, 0,75 ou 1,0 μmol do PMA. R²y corresponde à correlação entre os valores estimados e os observados pela equação de regressão.

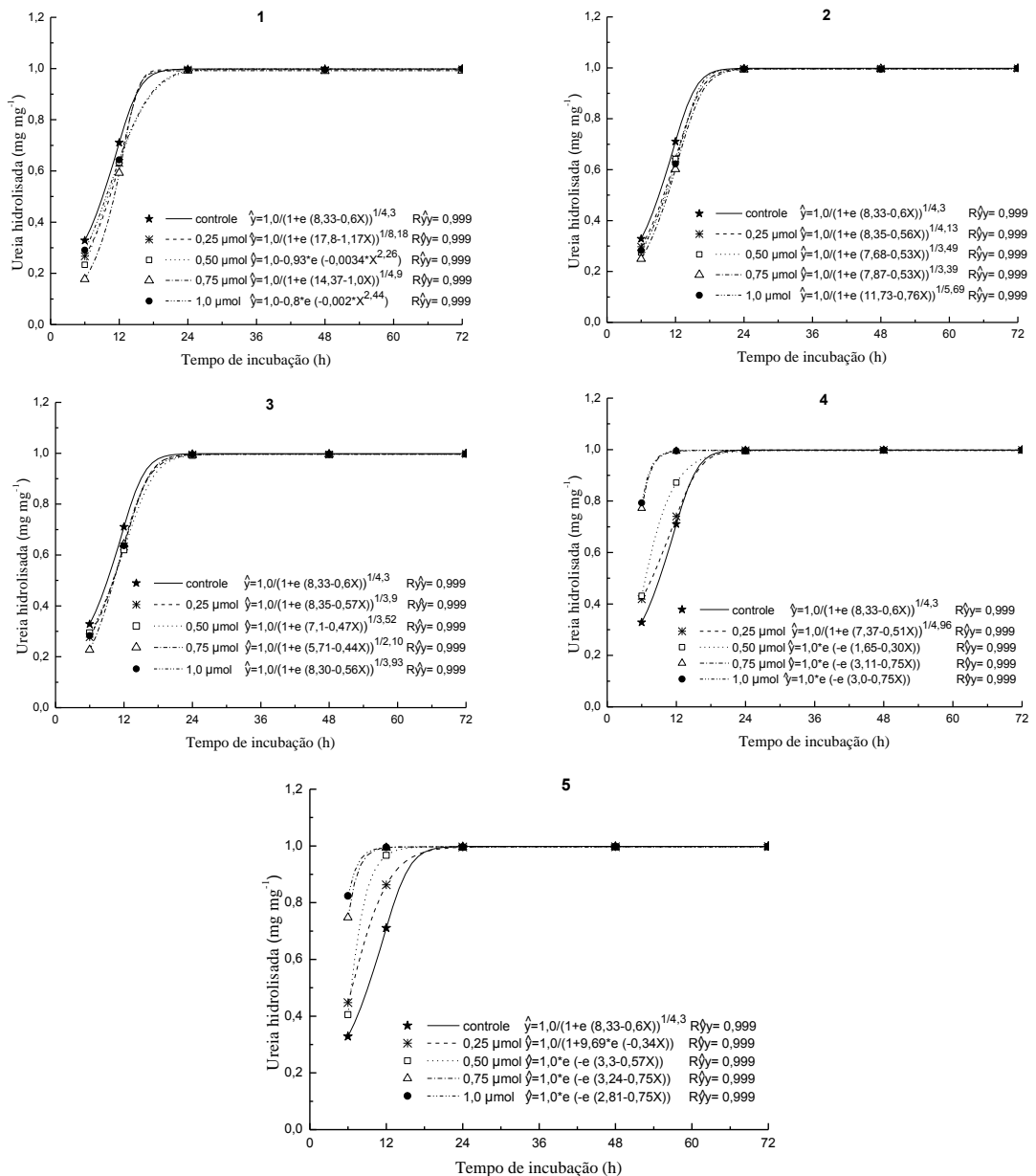


Figura 3. Hidrólise da ureia (mg mg⁻¹) de acordo com o tempo de incubação (h) a 30 °C em amostras de solo com 10 mg de ureia sem a adição de inibidor (controle) ou com adição de 0,25, 0,50, 0,75 ou 1,0 μmol das cinco iminas. R²y corresponde à correlação entre os valores estimados e os observados pela equação de regressão.

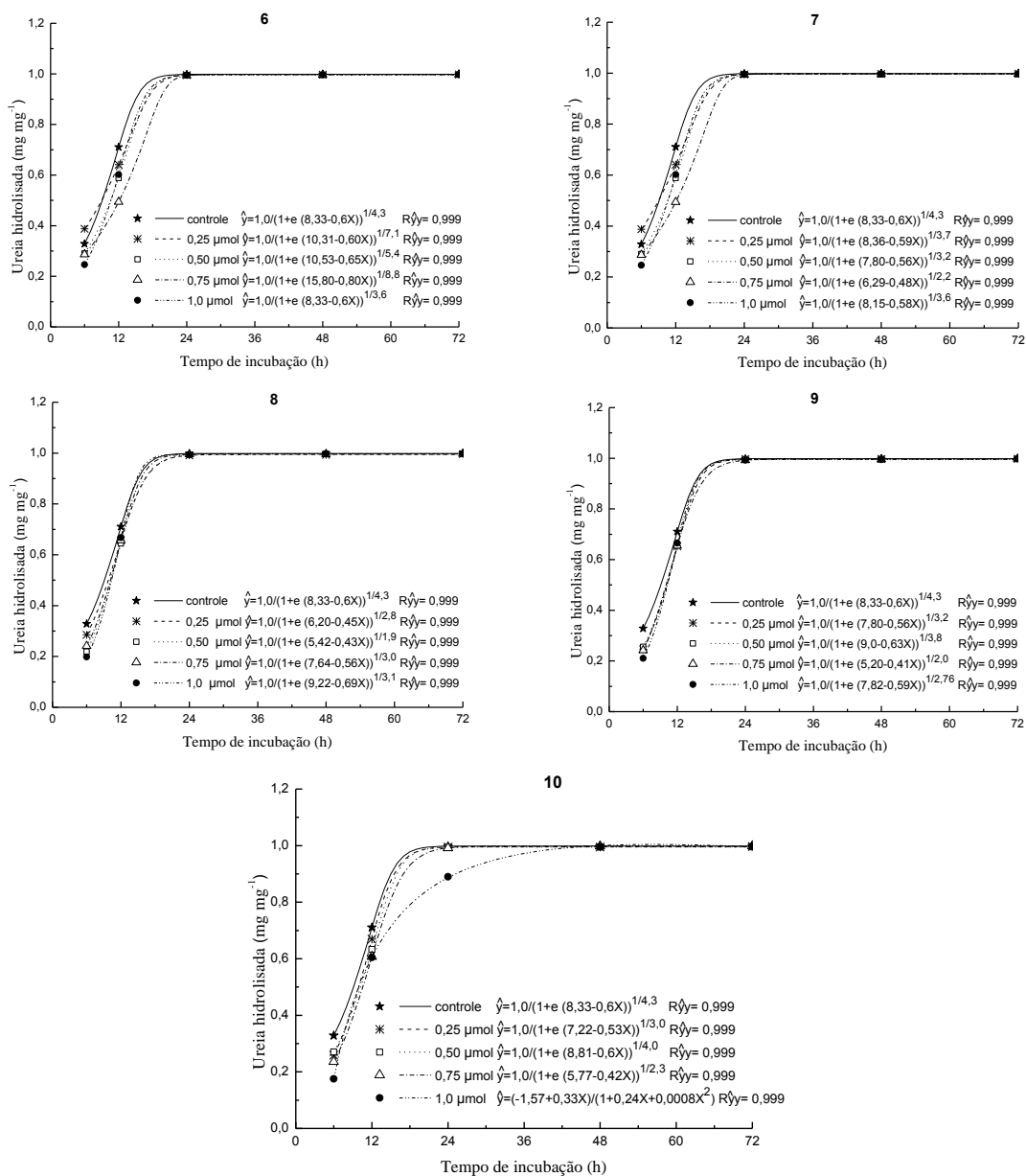


Figura 4. Hidrólise da ureia (mg mg⁻¹) de acordo com o tempo de incubação (h) a 30 °C em amostras de solo com 10 mg de ureia sem a adição de inibidor (controle) ou com adição de 0,25, 0,50, 0,75 ou 1,0 μmol das cinco piridinonas. R² corresponde à correlação entre os valores estimados e os observados pela equação de regressão.

A hidrólise de metade da ureia (50 %) para o solo controle ocorreu em 9 h e em 15 h para hidrolisar 90 % (Quadro 1). Com o PMA foram demandas de 13 a 19 h para ocorrer a metade da hidrólise da ureia (Quadro 1), que corresponde a um retardamento de até cinco horas no tempo para ocorrer metade da máxima hidrólise da ureia.

Não ocorreu diferença significativa entre a hidrólise da ureia no controle e no solo com as iminas 1, 2 e 3 (Figura 3), com o tempo variando de 9 a 11 h para hidrolisar 50 % (Quadro 1). Na dose de 0,75 μmol (750 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de ureia) as iminas 1, 2 e 3 apresentaram os tempos de 11, 10,6, 10,3 h, respectivamente, para hidrolisar 50 % da ureia (Quadro 1). Considerando que as iminas 1, 2 e 3 apresentam a mesma estrutura molecular básica (Figura 1), a presença da hidroxila nas iminas 2 e 3 não condicionou maior eficiência inibidora .

As iminas 4 e 5 intensificaram a hidrólise da ureia (Figura 3), com o tempo variando de 4 a 8 h para hidrolisar os 50 %, sendo que a maior dose destes compostos proporcionaram significativamente menores tempos de hidrólise (Quadro 1), sugerindo que estes compostos estimularam a atividade das ureases. A similaridade estrutural das iminas 4 e 5 (Figura 1) sugere que a presença do flúor foi o fator que limitou a ação inibidora da imina 5, o que se confirma com o mesmo comportamento da imina 4 que também contém flúor na sua estrutura. No entanto, Valente (2010) constatou que as iminas 4 e 5 apresentaram eficiência de inibição de 34 e 35 % respectivamente, em ensaios de cinética *in vitro* com urease *Canavalia ensiformis*. Tal discrepância pode ser atribuída a maior diversidade de ureases no solo, que possuem comportamento diferente quanto aos aspectos cinéticos (Paulson & Kurtz, 1970). Domínguez et al. (2008) também constataram compostos que estimularam a hidrólise da ureia em solo. Segundo Krajewska (2009) o flúor é considerado um inibidor competitivo menos efetivo do que Hg^{2+} , Ag^{+} e Cu^{2+} , que inibidores mais ativos.

As piridinonas também não alteraram significativamente a cinética de hidrólise da ureia (Figura 4 e Quadro 1). No entanto, 0,75 μmol das piridinonas 6 e 7, apresentaram o tempo de 12 e 10,4 h, respectivamente para hidrolisar 50 % da ureia (Quadro 1). Na dose de 1,0 μmol da piridinona 8, o tempo para hidrolisar 50 % da ureia foi de 10,4 h sendo esse mesmo tempo determinado para a piridinona 9 independente da dose.

Com a aplicação de 1,0 μmol , a piridinona 10 mostrou-se mais ativa, resultando em um tempo de 25 h para hidrolisar 90 % da ureia adicionada (Quadro 1), o que pode ser atribuído a presença do anel furano na sua

estrutura (Figura 1). Tal resultado sugere que outras conformações deverão ser sintetizadas e avaliadas quanto ao seu potencial inibidor.

Quadro 1. Tempo para hidrolisar 50 e 90 % da ureia adicionada em solo de pastagem com a adição de 10 mg de ureia sem a adição de inibidor da urease ou com adição de 0,25, 0,50, 0,75 ou 1,00 μ mol de PMA ou iminas (1 a 5) ou piridinonas (6 a 10)

Compostos	50 %					90 %				
	0	0,25	0,50	0,75	1,0	0	0,25	0,50	0,75	1,0
	----- h -----									
Controle ⁽³⁾	9,0	–	–	–	–	15,0	–	–	–	–
PMA ⁽⁴⁾	–	13,0	13,0	15,0	19,0	–	24,5	37,99	>72	>72
1	–	10,4	10,0	11,1	9,7	–	15	17,7	14,9	17,5
2	–	9,9	10	10,6	10,3	–	16,1	16,0	16,6	15,75
3	–	10,2	10,2	10,3	10,1	–	16,1	16,9	16,2	16,1
4	–	7,8	6,7	4,7	4,5	–	15,2	12,9	7,3	7,1
5	–	6,7	6,5	4,9	4,3	–	13,1	9,9	7,4	6,9
6	–	9,0	10,6	12,2	10,7	–	17,0	16,8	19,3	16,4
7	–	9,9	10,2	10,4	10,0	–	15,4	15,6	15,9	15,6
8	–	9,8	10,3	10,2	10,4	–	16,3	16,2	15,5	14,8
9	–	10,2	10,4	10,4	10,4	–	15,6	15,4	16,8	15,5
10	–	9,9	10,3	10,6	9,9	–	15,6	16,0	17,0	25,3

CONCLUSÃO

As conformações avaliadas das iminas e piridinonas não foram efetivas na inibição da atividade das ureases.

Apesar da não significância, as conformações das piridinonas avaliadas são mais efetivas na inibição da atividade das ureases.

Com a presença do anel furano a piridinona é mais eficaz na inibição da atividade das ureases.

LITERATURA CITADA

- BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W. R.; WILSON, K. S.; MILETTI, S.; CIURLI, S. & MANGANI, S. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure Fol. & Des.*, 7:205–216, 1999.
- BREMNER, J. M. Nitrogen-Urea. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H. & KEENEY, D. R., eds. *Methods of soil analysis, Number 9 (Parte 2)*. Madison, Am. Sci. of Agronomy/Soil Sci. Soc. Am., 1982. p.699-709.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; CONTIN, T. L. M.; DIAS, F. L. F.; ROSSETO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R. B. & QUAGGIO, J. A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. *Sc. Agric.*, 65:397-401, 2008.
- CHEN, W.; YUGUANG, L.; YONGMING, C.; XIAN, Z.; ZHU, H –L & QINGFU, Z. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of Schiff base transition metal complexes as potential urease inhibitors. *J. Eur. Med. Chem.*, 45:4473-4478, 2010.
- DEMUNER, A.J.; VALENTE, V.M.M.; BARBOSA, L.C.A.; RATHI, A. H.; DONOHOE, T. J.; & THOMPSON, A. L. Synthesis and phytotoxic activity of new pyridones derivatives from 4-Hydroxy-6-Methylpyridin-2(1H)-one. *J. Agric. Food Chem. Molecules*, 14:4973-4986, 2009.

- DOMÍNGUEZ, M.J.; SANMARTÍN, C.; FONT, M.; PALOP, J.A.; SAN FRANCISCO, S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F. & GARCÍA-MINA, J.M. Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 56:3721–3731, 2008.
- EVIDENTE, A.; FIORE, M.; BRUNO, G.; SPARAPANO, L. & MOTTA, A. Chemical and biological characterisation of sapinopyridone, a phytotoxic 3,3,6-trisubstituted-2,4-pyridone produced by *Sphaeropsis sapinea*, a toxigenic pathogen of native and exotic conifers, and its derivatives. *Phytochem.*, 67:1019-1028, 2006.
- FINDLAY, J. A.; TAM, W. H. J. & KREPINSKY, J. The chemistry of some 6-methyl-4-hydroxy-2-pyridones. *Can. J. Chem.*, 56:613-616, 1978.
- FRENEY, J. R. & BLACK, A. S. Importance of ammonia volatilization as a loss process. In: Wilson, J. R. (Ed). *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. CAB International, Wallingford, pp.156-173. 1998.
- HENDRICKSON, L.L. & DOUGLASS, E.A. Metabolism of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25:1613–1616, 1993.
- KARPLUS, P. A.; PEARSON, M.A, & HAUSINGER, R.P. 70 Years of crystalline urease: What have we learned? *Acc. Chem. Res.*, 30:330-337, 1997.
- KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 59:9-21, 2009.
- MACDONALD, G. E.; PURI, A. & SHILLINGET, D. G. Interactive effect of photoperiod and fluridone on growth, reproduction, and biochemistry of Dioecious *Hydrilla* (*Hydrilla verticillata*). *Weed Science*, 56:189-195, 2008.

- OUYANG, D.; MACKENZIE, A.F. & FAN, M. Phytotoxicity of banded urea amended with triple superphosphate and potassium chloride. *Agronomy J.*, 90:734-739, 1998.
- ÖZTURKU, G.; EROL, D.D.; UZBAY, T. & AYTEMIR, M. D. Synthesis of 4(1H)-pyridinone derivatives and investigation of analgesic and antiinflammatory activities. *IL Farmaco*, 56:251-256, 2001.
- PAULSON, K.N.; KURTZ, L.T. Michaelis Constant of soil urease. *Proc. Soil Sci. Soc. Am., Madison*, 37:70-72, 1970.
- RODRIGUES, M.B. & KIEHL, J.C. Volatilização de amônia após o emprego de uréia em diferentes doses e modos de aplicação. *R. Bras. C. Solo*, 10:37-43, 1986.
- TAO, L.; YUANLIANG, S.; XUEWEN, L. & GUOLIN, L. Degradation and its affecting factors of NBPT in soil. *Chinese J. Ecol.*, 25:1082-1086, 2006.
- VALENTE, V. M. M. Síntese e atividade biológica de pironas e piridinonas derivadas do ácido desidroacético. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2010. 210p. (Dissertação de Doutorado).
- YOU, Z -L; NI, L-L; SHI, D -H & BAI, S. Synthesis, structures, and urease inhibitory activities of three copper(II) and zinc(II) complexes with 2-[[2-(2-hydroxyethylamino)ethylimino] methyl]-4-nitrophenol. *J. Med. Chem.*, 45:3196-3199, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

O uso de inibidores de urease têm-se demonstrado eficiente na redução do processo de hidrólise da ureia, que pode contribuir na melhoria da eficiência da adubação nitrogenada devido a uma menor perda de nitrogênio por volatilização de amônia. Porém, a eficiência destes inibidores depende de fatores como tipo de solo e presença ou não de resíduos vegetais, havendo, portanto a necessidade de maiores estudos nessas diferenças condições e outras conformações das iminas e piridinonas deverão ser sintetizadas e avaliadas o seu potencial inibidor.