

CAPÍTULO 7

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE UREASE PARA OBTENÇÃO DE UM PRODUTO BIOCIMENTANTE PARA A CONSTRUÇÃO CIVIL A PARTIR DA SOJA



<https://doi.org/10.22533/at.ed.384132410127>

Data de submissão: 08/01/2025

Data de aceite: 09/01/2025

Luiza Beatriz Gamboa Araújo Morselli

Universidade Federal de Pelotas, UFPel
Pelotas - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/2217724221930510>

Bruno Nunes Hubner

Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Pelotas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/0029086384453033>

Lara Alves Gullo Do Carmo

Universidade Federal de Pelotas, UFPel
Pelotas - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/7834385871356318>

Marcos Antonio da Silva

Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Pelotas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/8534572990651848>

Jessica Torres dos Santos

Universidade Federal de Pelotas, UFPel
Pelotas - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/8535897129145784>

Leonardo Bubolz Leal

Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Pelotas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/7293782710870810>

Gustavo Luís Calegaro

Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Pelotas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/5052053708370102>

Julia Kaiane Prates Da Silva

Universidade Federal de Pelotas, UFPel
Pelotas - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/8043172936883765>

Talisson Natan Tochтенhagen

Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Pelotas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/7262725949339659>

Robson Andreazza

Universidade Federal de Pelotas, UFPel
Pelotas- Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/5706766977817721>

Estevan Alcântara Huckembeck

Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Pelotas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/5468433101958928>

RESUMO: A precipitação de carbonato de cálcio por urease é uma tecnologia de baixo impacto ambiental que vem ganhando atenção na área de engenharia nas últimas décadas, sendo utilizadas bactérias ou vegetais para a obtenção de um produto

Rafael De Lima Rodrigues Chiquine

Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Pelotas – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/0791895632652834>

biocimentante para a geotecnica ou na fabricação de materiais sustentáveis como substituto de aglomerantes não renováveis. A enzima urease, presente na soja (*Glycine Max L.*), catalisa a hidrólise de ureia levando a produção de carbonato de cálcio, que age como ligante das partículas do solo ou outro material inerte. Diversas pesquisas utilizaram a soja para extração enzimática, no entanto, a melhor forma de obtenção do extrato de soja ainda não está clara na literatura, a partir disso, objetivou-se avaliar a atividade urease a partir de grãos de soja com e sem etanol. Foram obtidos um extrato de soja (ES) com água destilada e outro com etanol a 20% (ESE), ambos com 100g de soja por litro. Foram avaliados a atividade urease (AU), o pH e a condutividade elétrica dos extratos na presença de distintas concentrações de ureia. Os resultados demonstraram que a AU dos extratos foi de 25,72 e 21,69 mM/min para o ES e o ESE, respectivamente. Valores acima dos encontrados na literatura, no entanto, o etanol não demonstrou melhorar a atividade enzimática. O pH mostrou alteração típica e uma tendência de estabilização, confirmando a atividade urease de ambos os extratos, e a condutividade elétrica confirmou que o etanol não melhorou o desempenho da solução. A concentração de ureia que obteve a maior condutividade elétrica foi de 0,2 mol/L para o ES. As avaliações de atividade urease são estudos prévios de grande importância para a viabilidade da obtenção de um produto cimentante sustentável para aplicação na engenharia.

PALAVRAS-CHAVE: enzima urease, *Glycine Max L.*, precipitação de carbonato de cálcio, biocimento sustentável.

EVALUATION OF UREASE ACTIVITY TO OBTAIN A BIOCEMENT PRODUCT FOR CIVIL CONSTRUCTION FROM SOYBEAN

ABSTRACT: The precipitation of calcium carbonate by urease is a technology of low environmental impact that has been gaining attention in the engineering area in recent decades, being used bacteria or plants to obtain a biocement product for geotechnics or in the manufacture of sustainable materials as a substitute for non-renewable binders. The enzyme urease, present in soybeans (*Glycine Max*), catalyzes the hydrolysis of urea, leading to the production of calcium carbonate, which acts as a binder for soil particles or other inert material. Several studies have used soybean for enzymatic extraction, however, the best way to obtain soybean extract is still not clear in the literature, from this, the objective was to evaluate the urease activity from soybeans with and without ethanol. A soybean extract (SE) was obtained with distilled water and another with 20% ethanol (ESE), both with 100g of soybean per liter. The urease activity (UA), pH and electrical conductivity of the extracts were evaluated in the presence of different concentrations of urea. The results showed that the AU of the extracts was 25.72 and 21.69 mM/min for SE and ESE, respectively. Values above those found in the literature, however, ethanol has not been shown to improve enzymatic activity. The pH showed a typical change and a stabilization trend, confirming the urease activity of both extracts, and the electrical conductivity confirmed that the ethanol did not improve the performance of the solution. The concentration of urea that obtained the highest electrical conductivity was 0.2 mol/L for SE. Urease activity evaluations are preliminary studies of great importance for the feasibility of obtaining a sustainable cement product for application in engineering.

KEYWORDS: enzyme urease, *Glycine Max L.*, calcium carbonate precipitation, sustainable biocement.

INTRODUÇÃO

Embora essencial para o desenvolvimento socioeconômico em âmbito mundial, a indústria cimentícia é conhecida por causar um grande impacto ambiental, tanto na grande geração de resíduos sólidos como na emissão de gases de efeito estufa. A partir disso, tem-se buscado com mais intensidade novas tecnologias que reduzam esse impacto, mantendo qualidade e eficiência dos produtos. A precipitação de carbonato de cálcio por enzimas urease é uma dessas tecnologias que vem ganhando atenção na área de engenharia nas últimas décadas para substituir muitas práticas da engenharia civil, devido às suas características ecológicas (Aishwarya; Juneja, 2024).

Bactérias e vegetais podem ser utilizados visando a precipitação de carbonato de cálcio na geotecnica para estabilização de solos ou unindo materiais inertes, como areia (Dagliya et al., 2023), agindo como um biocimentante (Gao et al., 2019). Presente em leguminosas, como a soja (*Glycine Max L.*), a enzima urease catalisa a hidrólise de ureia nos poros de materiais como o solo, levando à produção de carbonato de cálcio, que age como ligante dessas partículas (Cuccurullo et al., 2022).

A soja amarela é interessante para a precipitação de carbonato de cálcio não somente por ser abundante em urease, mas também por ser uma leguminosa barata (Lee; Kim, 2020). Shu et al. (2022) afirmam que o extrato bruto de urease de soja é uma alternativa econômica e mais eficiente à enzima purificada e às bactérias produtoras de urease, e pode ser utilizado para precipitação de calcita no melhoramento de solos arenosos. A urease de soja demonstrou ter capacidade de reparar materiais cimentícios danificados, como concreto, e partículas de cimento soltas, sem necessidade de recorrer ao cimento (Fan et al., 2022).

A enzima urease, presente na soja, catalisa a reação de hidrólise de ureia e forma íons amônio (NH_4^+) e íons carbonato (CO_3^{2-}) como produto final, conforme equação 1. Por sua vez, o carbonato, na presença de íons de cálcio, forma o carbonato de cálcio que se precipita (Equação 2) no material hospedeiro.



Diversas pesquisas utilizaram a soja para extração da enzima urease (Cuccurullo et al., 2022; Gao et al., 2020, 2019; He et al., 2022a, 2022b; Shu et al., 2022), fabricação de um produto biocimentante ou estabilizante de solos (Lai et al., 2023; Lee; Kim, 2020; Yu; Xu, 2024; Zhang et al., 2023) e diques (He et al., 2022a), com variáveis formas de extração e purificação química, como o uso do etanol (Lai et al., 2023; Weng et al., 2024; Xu et al., 2023; 2024).

De acordo com Zhang et al. (2023), como obter o melhor efeito de tratamento a partir da urease por soja ainda não está claro na literatura. Tendo isso em vista, objetivou-se avaliar a atividade urease a partir de grãos de soja (*Glycine Max L.*) com e sem etanol para purificação da solução.

METODOLOGIA

Para avaliação da atividade urease da soja (*Glycine Max L.*), foi seguido o seguinte processo de obtenção dos extratos, conforme Figura 1.

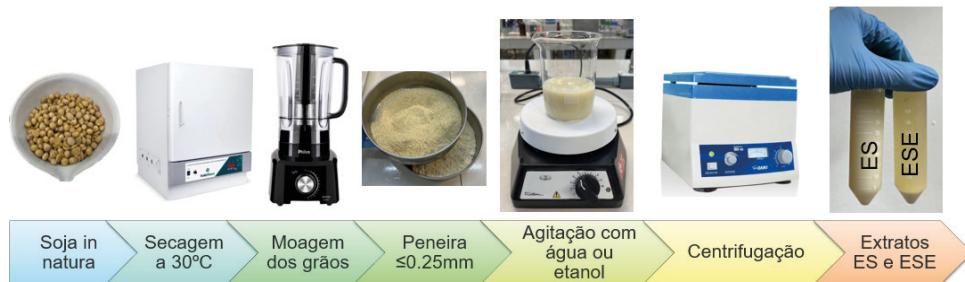


Figura 1: Fluxograma do processo em escala laboratorial para obtenção dos extratos de soja bruto (ES) e extrato de soja bruto com etanol (ESE).

Os grãos foram secos em estufa a 30°C até remoção completa de umidade, moídos mecanicamente em liquidificador, o material foi peneirado em dimensões máximas de 0,25mm. O pó, em concentração de 100 g/L – citado na literatura como melhor concentração para extração (Zhang et al., 2023) - foi então utilizado para duas formas de extração sob agitação constante: uma em meio aquoso somente com água destilada, chamado de extrato de soja (ES) e outra com água destilada e 20% de etanol, chamado de extrato de soja com etanol (ESE). Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 3.600 rpm por 15 min, e o sobrenadante foi utilizado.

Para avaliação da atividade urease (AU), foram seguidos os procedimentos desenvolvidos por Whiffin et al. (2007), método amplamente aplicado na literatura (Cao et al., 2024; He et al., 2022a, 2022b; Shu et al., 2022). Para isso, mediu-se a variação da condutividade elétrica, em um determinado tempo (min) na mistura de cada extrato com solução de 1.11M de ureia na razão de 1:9 (extrato:solução). O monitoramento se deu por 5 min (Fan et al., 2022) e a AU foi obtida através da seguinte equação:

$$UA (\text{mM}/\text{min}) = 11.1 \times 10 \times R_c \quad (1)$$

Onde R_c é a taxa de variação de condutividade elétrica por minuto; 11.1 é a conversão do coeficiente R_c e a UA, onde 1 mS/min de R_c corresponde a 11 mM/min de UA, e 10 é a taxa de diluição da solução preparada.

Posteriormente, analisou-se o pH e a condutividade elétrica conforme o tempo (min) dos extratos brutos ES e ESE na concentração de 100g L⁻¹ em tubos de ensaio (40 mL) com adição de ureia (60.07 g mol⁻¹) sob diversas concentrações finais (0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 mol L⁻¹). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Urease

Os resultados de AU dos extratos ES e ESE foram $25,72 \pm 1,27$ (mM/min) e $21,69 \pm 0,9$ (mM/min), respectivamente, conforme Tabela 1.

Referências	Atividade Urease (AU) (mM/min)				AU/g de soja (mM/ureia/min/g)
	25	40	100	10-200	
Concentração de soja (g/L)					-
ES (pesquisa atual)			$25,72 \pm 1,27$		0,26
ESE (pesquisa atual)			$21,69 \pm 0,9$		0,22
ES (He et al., 2022a)	4,4			2,2 a 24,9	
ES (He et al., 2022b)			13 - 14		0,13
Cao et al. (2024)		5,2			

Tabela 1. Atividade urease comparada à literatura

De acordo com a literatura, He et al. (2022a) obtiveram AU de $4.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ com a concentração de 25g/L de extrato de soja. Já no extrato com concentrações entre 10-200g/L a AU variou de 2.2 a 24.9 mM ureia/min, e entre 13 e 14 para 100g/L, na pesquisa de He et al. (2022b). Os autores afirmam que a relação entre a AU e a concentração da soja é aproximadamente linear. Cao et al. (2024) encontraram AU de 5,2 mM/min para 40g/L soja.

Considerando a AU por g de soja dos extratos (Tabela 1), a presente pesquisa apresentou 0,26 e 0,22 mM ureia/min por g de soja, para os extratos ES e ESE, respectivamente. Valores acima de aproximadamente 0,13 mM ureia/min por g de soja do estudo de He et al. (2022b).

pH versus tempo dos extratos brutos ES e ESE

A reação de precipitação de CaCO_3 é uma reação pH-dependente forte, onde o aumento da concentração de CO_3^{2-} ocorre sob condições alcalinas (Achal; Pan, 2014). Quando a enzima urease entra em contato com a solução de ureia, os íons amônio iniciam a reação como amônia (NH_3), no entanto quando reage com a água, libera íons hidroxila (OH^-), tornando o pH mais alcalino, ou seja, aumentando o pH da solução (Hommel et al., 2020). Portanto, a análise de pH na avaliação da atividade urease é de grande importância, pois demonstra que houve atividade, em maior ou menor grau.

Na Figura 2 é possível observar a elevação do pH com o tempo, atingindo estabilidade a partir de 100 min, confirmando a atividade urease. O ESE manteve um pH final levemente superior ao ES, no entanto sem diferença significativa. O pH inicial das soluções foi entre 6 e 7 (Figura 2), intervalo dentro do estabelecido pela literatura para melhores resultados de atividade urease (Fan et al., 2022; Shu et al., 2022).

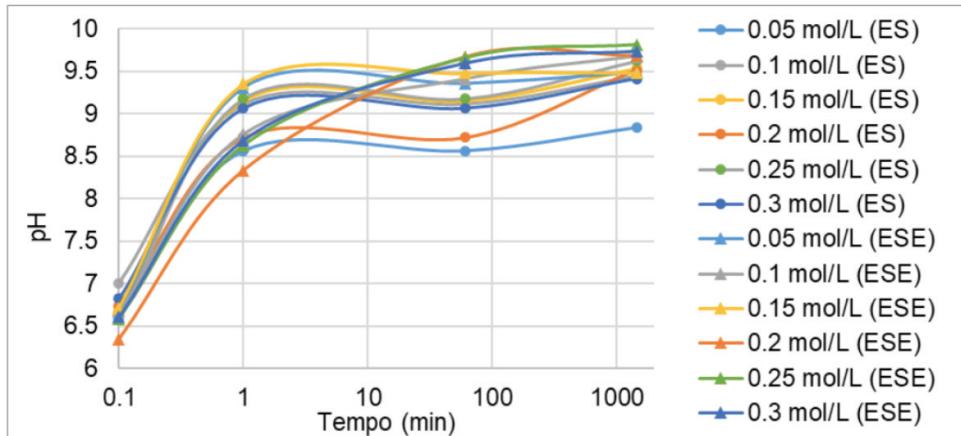


Figura 2: Gráfico com os resultados de pH versus tempo de ES e ESE sob diferentes concentrações de ureia.

3.3 Condutividade Elétrica versus tempo sob diferentes concentrações de ureia

Com relação à condutividade elétrica das amostras, observa-se claramente na Figura 3, que o extrato sem etanol (ES) atingiu os maiores valores de condutividade, ao tempo próximo dos 100 min, comparando às soluções com ESE.

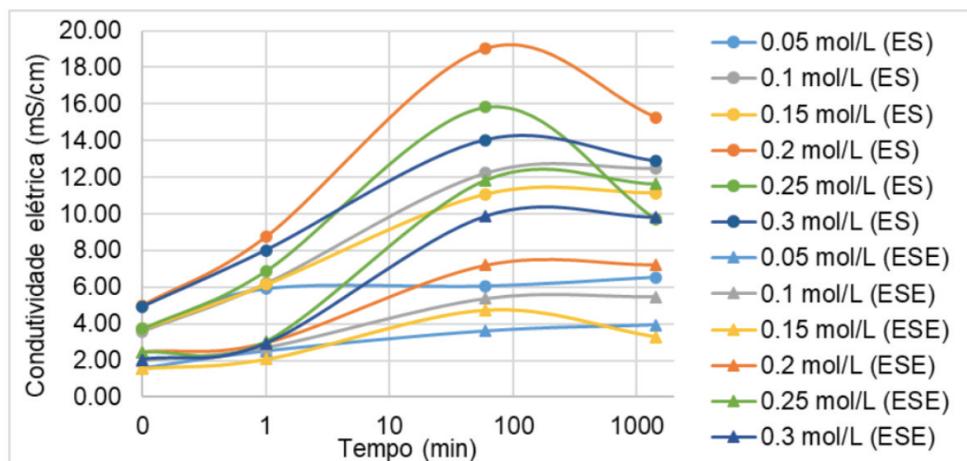


Figura 3: Gráfico com os resultados de condutividade elétrica versus tempo de ES e ESE sob diferentes concentrações de ureia.

A extração com 20% de etanol (ESE) obteve uma AU menor do que o extrato sem etanol (ES), além de menor condutividade elétrica (Figura 3). O que permite concluir que o etanol não demonstrou melhorar a solução urease, como foi o caso do estudo de Lai et al. (2023), os quais obtiveram melhor desempenho com etanol no extrato.

Ainda na Figura 3, observa-se que a melhor concentração de ureia para o ESE foi de 0,25 mol/L e para o ES foi de 0,2 mol/L, o que corrobora com a literatura (Gao et al., 2020, 2019). Gao et al. (2020, 2019) na avaliação do extrato de soja com 40 e 130g/L, utilizaram as concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; e 1,0 mol/L de ureia e CaCl₂, e o melhor resultado foi com 0,2 mol/L. Já, na pesquisa de Cuccurullo et al. (2022), o extrato com 100g/L demonstrou melhor condutividade elétrica na concentração de 2,5 mol/L de ureia.

CONCLUSÕES

As avaliações de atividade urease são de grande importância para estudos prévios de viabilidade de obtenção de um produto biocimentante para aplicação na construção civil. Os resultados demonstraram que o uso de etanol na extração da enzima urease não foi efetivo na condutividade elétrica e na atividade urease calculada, ao mesmo tempo em que a concentração de ureia para a atividade enzimática foi de 0,2 mol/L com 100 g/L de soja em pó.

Futuras pesquisas podem ser continuadas com aplicação da solução biocimentante em materiais como solo para estabilização do mesmo, areia, resíduos inertes e outros hospedeiros para fabricação de produtos sem cimento Portland, reduzindo o impacto ambiental da construção civil.

DECLARAÇÕES

Todos os autores contribuíram para a realização e escrita do trabalho, e estão de acordo com o conteúdo e a publicação do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer às agências financeiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), e à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) pelo apoio e incentivo.

REFERÊNCIAS

- ACHAL, Varenyam; PAN, Xiangliang. Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. I.], v. 173, n. 1, p. 307–317, 2014. DOI: 10.1007/s12010-014-0842-1.
- AISHWARYA, T.; JUNEJA, A.. Efficiency and Morphology of Calcium Carbonate Precipitate Induced by Urease Enzymes. **Geotechnical And Geological Engineering**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 1153-1171, 1 set. 2023. DOI: 10.1007/s10706-023-02610-6.
- CAO, Guanghui; MA, Liqiang; NGO, Ichhuy; OSEMUDIAMHEN, Arienke Endurance; GUO, Zezhou. Experimental Investigation on the Combination of Enzyme-Induced Calcium Carbonate Precipitation and Organic Materials for Underground Backfilling Preparation. **Minerals**, [S. I.], v. 14, n. 2, 2024. DOI: 10.3390/min14020153.
- CUCCURULLO, A.; GALLIPOLI, D.; BRUNO, A. W.; AUGARDE, C.; HUGHES, P.; LABORDERIE, C. Earth stabilisation via carbonate precipitation by plant-derived urease for building applications. **Geomechanics for Energy and the Environment**, [S. I.], v. 30, p. 100230, 2022. DOI: 10.1016/j.gete.2020.100230.
- DAGLIYA, Monika; SATYAM, Neelima; GARG, Ankit. Desert sand stabilization using biopolymers: review. **Smart Construction And Sustainable Cities**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-11, 9 ago. 2023. DOI: 10.1007/s44268-023-00001-7.
- FAN, Yanan; DU, Hongxiu; WEI, Hong; ZHAO, Teng. Experimental Study on Urease Activity and Cementation Characteristics of Soybean. **Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition**, [S. I.], v. 37, n. 4, p. 636–644, 2022. DOI: 10.1007/s11595-022-2578-z.
- GAO, Yu feng; MENG, Hao; HE, Jia; QI, Yong shuai; HANG, Lei. Field trial on use of soybean crude extract for carbonate precipitation and wind erosion control of sandy soil. **Journal of Central South University**, [S. I.], v. 27, n. 11, p. 3320–3333, 2020. DOI: 10.1007/s11771-020-4549-x.
- GAO, Yufeng; HE, Jia; TANG, Xinyi; CHU, Jian. Calcium carbonate precipitation catalyzed by soybean urease as an improvement method for fine-grained soil. **Soils and Foundations**, [S. I.], v. 59, n. 5, p. 1631–1637, 2019. DOI: 10.1016/j.sandf.2019.03.014.
- HE, Jia; FANG, Changhang; MAO, Xunyu; QI, Yongshuai; ZHOU, Yundong; KOU, Hailei; XIAO, Liang. Enzyme-Induced Carbonate Precipitation for the Protection of Earthen Dikes and Embankments Under Surface Runoff: Laboratory Investigations. **Journal of Ocean University of China**, [S. I.], v. 21, n. 2, p. 306–314, 2022. a. DOI: 10.1007/s11802-022-4821-9.
- HE, Jia; YANG, Feng; QI, Yong Shuai; FANG, Chang Hang; YAN, Bo Yang; ZHANG, Yi; HANG, Lei; GAO, Yu Feng. Improvement in silty sand with enzyme-induced carbonate precipitation: laboratory model experiment. **Acta Geotechnica**, [S. I.], v. 17, n. 7, p. 2895–2905, 2022. b. DOI: 10.1007/s11440-021-01361-z.
- HOMMEL, Johannes; AKYEL, Arda; FRIELING, Zachary; PHILLIPS, Adrienne J.; GERLACH, Robin; CUNNINGHAM, Alfred B.; CLASS, Holger. A numerical model for enzymatically induced calcium carbonate precipitation. **Applied Sciences** (Switzerland), [S. I.], v. 10, n. 13, p. 1–26, 2020. DOI: 10.3390/app10134538.
- LAI, Han Jiang; CUI, Ming Juan; WU, Shi Fan; YANG, Yang; CHU, Jian. Extraction of crude soybean urease using ethanol and its effect on soil cementation. **Soils and Foundations**, [S. I.], v. 63, n. 3, p. 101300, 2023. DOI: 10.1016/j.sandf.2023.101300.

LEE, Seunghyung; KIM, Jongmin. An Experimental Study on Enzymatic-Induced Carbonate Precipitation Using Yellow Soybeans for Soil Stabilization. **Ksce Journal Of Civil Engineering**, [S.L.], v. 24, n. 7, p. 2026-2037, jul. 2020. DOI: 10.1007/s12205-020-1659-9.

LIU, Yang; GAO, Yufeng; HE, Jia; ZHOU, Yundong; GENG, Weijuan. An experimental investigation of wind erosion resistance of desert sand cemented by soybean-urease induced carbonate precipitation. **Geoderma**, [S. I.], v. 429, n. July 2022, p. 116231, 2023. DOI: 10.1016/j.geoderma.2022.116231.

SHU, Shuang; YAN, Boyang; GE, Bin; LI, Shiling; MENG, Hao. Factors Affecting Soybean Crude Urease Extraction and Biocementation via Enzyme-Induced Carbonate Precipitation (EICP) for Soil Improvement. [S. I.], n. 1, 2022.

WENG, Yajie; ZHENG, Junjie; LAI, Hanjiang; CUI, Mingjuan; DING, Xingzhi. Biominerization of soil with crude soybean urease using different calcium salts. **Journal Of Rock Mechanics And Geotechnical Engineering**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 1788-1798, maio 2024. DOI: 10.1016/j.jrmge.2023.09.033.

WHIFFIN, Victoria S.; VAN PAASSEN, Leon A.; HARKES, Marien P. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. **Geomicrobiology Journal**, [S. I.], v. 24, n. 5, p. 417–423, 2007. DOI: 10.1080/01490450701436505.

XU, Kai; HUANG, Ming; CUI, Mingjuan; LI, Shuang. Retarding effect of cementation solution concentration on cementation ability of calcium carbonate crystal induced using crude soybean enzyme. **Acta Geotechnica**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 6235-6251, 17 jul. 2023. DOI: 10.1007/s11440-023-01987-1.

XU, Kai; HUANG, Ming; CUI, Mingjuan; LI, Shuang. Effect of crystal morphology on cementability and micromechanical properties of calcium carbonate precipitate induced by crude soybean enzyme. **Journal Of Rock Mechanics And Geotechnical Engineering**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 5095-5108, dez. 2024. DOI: 10.1016/j.jrmge.2023.08.024.

YU, Xiaoniu; XU, Yidong. Biotreatment of incinerated bottom ash and biocementation of sand blocks using soybean urease. **Journal Of Zhejiang University-Science A**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 36-46, jan. 2024. Zhejiang University Press. DOI: 10.1631/jzus.a2300006.

ZHANG, Jianwei; YIN, Yue; SHI, Wanpeng; BIAN, Hanliang; SHI, Lei; WU, Luyuan; HAN, Zhiguang; ZHENG, Junjie; HE, Xiang. Strength and uniformity of EICP-treated sand under multi-factor coupling effects. **Biogeotechnics**, [S. I.], v. 1, n. 1, p. 100007, 2023. DOI: 10.1016/j.bgtech.2023.100007.