

ALGUMAS PRÁTICAS DE BIOQUÍMICA NO CURSO DE AGRONOMIA (PARTE II)

Bruno Marcos Nunes Cosmo¹

Tatiani Mayara Galeriani²

Resumo

Continuando o artigo Algumas práticas de bioquímica no curso de Agronomia, traz-se a Parte II do mesmo, contendo mais três procedimentos muito comuns na disciplina. Os quatro primeiros procedimentos foram mais introdutórios (mas de maneira alguma com menor importância), nesta etapa do trabalho será comentado sobre enzimas e ácidos nucleicos, em especial as enzimas do leite e da Soja, medidas de descobrir fraudes de leite e maneiras de extração de ácidos nucleicos.

Palavras Chave: Enzimas, ácidos nucleicos, soja.

Abstract

Continuing the Article Some biochemical practices in the course of Agronomy, bring to Part II thereof, containing three very common procedures in the discipline. The first four procedures were more introductory (but by no means less important), at this step will be commented on enzymes and nucleic acids, in particular the enzyme of the milk and soy, measures to discover milk fraud and extraction ways nucleic acids.

Keywords: enzymes, nucleic acids, soya.

¹ Graduando no curso de Agronomia na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

² Graduanda no curso de Agronomia na Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

PRÁTICA 05: FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS DO LEITE E SUA DOSAGEM PELO MÉTODO DO BIURETO

Introdução

Na constituição do leite há três proteínas importantes: caseína, a lactoalbumina e a lactoglobulina, todas apresentam um alto teor de aminoácidos essenciais e suas proporções variam de espécie para espécie, como é mostrado na tabela 01 (UFPR, 2005, p. 83).

O termo caseína se aplica a um grupo heterogêneo de proteínas que contêm grupos de fosfoerina cuja função é ligar o cálcio, a caseína está presente no leite em forma de micelas (UFPR, 2005, p. 83).

A caseína é a correspondente, por exemplo, no leite bovino a 85% das proteínas totais do leite, no leite humano corresponde a 40 % das proteínas (PETKOWICZ et al, 2007, p. 101). Vejamos a concentração de caseína em outros tipos de leite na tabela 01 (Parcialmente extraída de MORAIS, 2014).

Tabela 01. Concentrações de Caseína em diferentes espécies (MORAIS, 2014).

ESPÉCIES	Caseína %	Proteína do soro (%)	% de caseína nas proteínas totais (aproximadamente)
Humanos	0,4	0,5	40 a 45 %
Ratos	6,4	2,0	75 a 80%
Golfinhos	3,9	2,9	55 a 60%
Cães	5,1	2,3	65% a 70%
Equinos	1,3	1,2	50 a 55%
Bovinos	2,6	0,6	80 a 85%
Renas	8,6	1,5	85 a 90%

O objetivo desta aula é apresentar um exemplo prático da espectrofotometria, para determinar diferentes concentrações de compostos, no caso a concentração da caseína, uma das proteínas que compõem o leite, e determinar a concentração da mesma, utilizando cálculos partindo da curva padrão da última aula prática.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizamos materiais como as pipetas volumétricas (1, 2, 5 e 10 mL), conta gotas, pipetador, tubo de ensaio, estante, erlenmeyer, água destilada, béquer de 50 mL, aquecedor para aquecer os tubos de ensaio com a mistura, um béquer foi posto encima do aquecedor para colocar os tubos e água destilada, o biureto um corante que cora as ligações peptídicas (lilás). Também usamos Acido clorídrico (HCL) a 2%, filtro para filtrar o leite coagulado e funil. Os outros materiais foram o espectrofotômetro e o leite, além da solução padrão de proteína 5 mg/mL.

A metodologia iniciou-se com a montagem do experimento I, que era a preparação de proteínas do filtrado (PF). Seguiram-se os seguintes passos: Conforme a tabela 02.

Tabela 02. Passos para preparação do filtrado:

1 - Transferir 10 mL de leite bovino para um copo de béquer de 50 mL;
2 - Adicionar 10 mL de água destilada morna;
3 - Com uma pipeta de 2 mL, acrescentar solução de Ácido Clorídrico 2%, gota a gota e com agitação constante, até que se observe a coagulação do leite;
4 - Anotar o volume do Ácido adicionado;
5 - Aguardar a sedimentação do precipitado e filtrar o sobrenadante.

A mistura foi filtrada em um tubo de ensaio, para posterior uso no experimento III.

O experimento II, consistiu em preparar um tubo de ensaio com as proteínas totais do leite (PT). Procedeu-se da seguinte maneira: Em um tubo de ensaio foi diluído 0,5 mL de leite bovino em 9,5 mL de água destilada.

Ambos experimentos I e II, terão a concentração de proteínas determinadas pelo método do biureto, sendo utilizados para a realização do experimento III.

Experimento III, consistiu na preparação de 4 tubos de ensaio com diferentes concentrações de leite como descrito a seguir na tabela 03.

Tabela 03. Determinação da concentração das proteínas do filtrado (PF) e das proteínas totais (PT) pelo método do Biureto.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo PF	Tubo PT
Reagentes mL				
Água destilada	1,0	0,4	0,0	0,0
Solução padrão de proteína 5 mg.mL ⁻¹	0,0	0,6	0,0	0,0
Filtrado	0,0	0,0	1,0	0,0
Leite total diluído	0,0	0,0	0,0	1,0
Reativo do biureto	5,0	5,0	5,0	5,0

Em seguida os tubos foram agitados e deixados em repouso por cerca de 10 minutos. Depois utilizamos o tubo 1 para calibrar espectrofotômetro: 0 de transmitância e absorbância em 520 nm. Depois disso foram determinadas as absorbâncias das soluções. E por fim, foram determinadas as concentrações usando como base a curva de calibração (e sua equação da reta) da última aula prática. A equação utilizada foi: $y = 0,180x - 0,0099$. A partir desta equação serão determinadas as concentrações de proteínas (mg_xmL⁻¹), e posteriormente serão calculadas as concentrações de caseína do leite em mg_xmL⁻¹, e depois em porcentagem (%)

Resultados e discussão

No experimento I, que foi a preparação das proteínas do filtrado (PT) a quantidade de Ácido Clorídrico 2% (HCl) adicionada para que o leite coagula-se foi de 8 gotas.

No experimento II, que foram as proteínas totais (PT). Não houve anotações a serem feitas, o leite foi diluído apenas. Estes dois primeiros experimentos servirão apenas como base para o experimento III, que é o verdadeiro foco desta prática.

O experimento III, por sua vez teve os resultados mostrados na tabela 04.

Tabela 04. Resultados do experimento III.

Tubos	Tubo 1	Tubo 2	Tubo PF	Tubo PT
Absorbância em 520 nm	0,0	0,11	0,9	0,26
Concentrações de proteína (mg _x mL ⁻¹)	0,0	0,667	5,055	1,499
Fator de diluição	0,0	0,5	2	20
Concentração de proteína corrigidas pelo fator de diluição (mg _x mL ⁻¹)	0,0	0,3335	10,11	29,98

Ao final para se saber a concentração de caseína basta calcular: PT - PF = Caseína, calculando 29,98-10,11= 19,87 mg_xmL⁻¹. Ao final calcular a porcentagem (%) de caseína, formula: $\frac{PT}{Caseína} = \frac{100\%}{X}$

$$\text{Calculando: } \frac{29,98}{19,87} = \frac{100\%}{X} \quad X = \frac{1987}{29,98} \quad X = 66,278 \%$$

Assim chegamos ao resultado final, para a amostra de leite utilizada, seguindo os passos recomendados, foi possível perceber que a concentração de caseína nessa amostra era de cerca de 66% das proteínas totais, ou seja bem mais que a metade, mas no leite bovino geralmente essa quantidade se encontra ao redor de 80%, talvez por ter sido usado leite integral (leite de caixinha), tenha ocorrido essa alteração, ou mesmo pelo fato da amostra ter sido coalhada antes.

Considerações finais

Conforme pode - se perceber, a caseína é uma das proteínas em maior concentração no leite, em leites como o bovino sua porcentagem dentro das proteínas totais ultrapassa 80%, mostrando sua alta importância, no leite humano se apresenta em menor concentração, como dito da introdução a concentração varia de espécie para espécie. No experimento encontrou-se 66% um pouco abaixo do esperado o que se justifique talvez pelo fato do leite ser integral ou por ele ter sido coalhada.

Referências bibliográficas

Universidade Federal do Paraná - UFPR. **Bioquímica: aulas práticas**. Departamento de Bioquímica. 6ª ed. Curitiba. UFPR, 2005. 178 p.

PETKOWICZ, C. L. O. et al. **Bioquímica: aulas práticas**. Departamento de Bioquímica. 7ª ed. Curitiba. UFPR, 2007. 188 p.

MORAIS, I. A. **Glândulas Mamárias**. Universidade Federal Fluminense. Scribd, 2014. 14 p. Disponível em <<https://pt.scribd.com/doc/95760698/GLANDULAS-MAMARIAS>> Acessado em 02 de Outubro de 2014

PRÁTICA 06: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Introdução

Os ácidos nucleicos são macromoléculas formadas por nucleotídeos, constituídos por bases nitrogenadas, pentoses e fosfatos. Considerados as biomoléculas mais importantes do controle celular. Existem dois tipos: O ácido ribonucleico (RNA) e o ácido desoxirribose (DNA) (BARROS et al, 2013). A evidenciação de ácidos nucleicos em extratos celulares de mamíferos ocorre por técnicas específicas, que requerem células em quantidade suficiente e em meio livre de interferências, como as que causam lise e hidrólise por nucleases. A completa extração é essencial para determinar indiretamente a estrutura ou quantificar por espectrofotometria (PETKOWICZ, 2011).

A extração de ácidos nucleicos em vegetal é um pouco mais complexa e difícil, pois as células vegetais possuem além da membrana plasmática a parede celular, que também tem de ser quebrado, por isso promover a lise se torna mais difícil. Para realizar a ruptura da parede e membrana se faz maceração após congelamento dos tecidos com nitrogênio líquido. A parede celular é composta por polissacarídeos, que deverão ser separados da solução, pois a contaminação dela por estes, impossibilita a observação, além de também ser necessária a eliminação de polifenóis oxidantes (DANTAS, 2012).

Um dos materiais empregados na extração de ácido nucleicos de animais é o fígado, pois suas células apresentam tecido hepático com características que permitem melhor manuseio, consistência pouco gelatinosa (ausência de fibras de proteínas e outras estruturas que precisam de tratamento mais refinado). Essas células ainda apresentam núcleos grandes em relação a outras células do corpo, a cromatina destas encontra-se menos compactada, por isso é previsível que esteja envolta por menos proteínas com função de compactação (G-JUNIOR, 2014).

A utilização do fígado de rato é devida muitas vezes a sua produção, criar ratos, é mais fácil e viável, do que criar outros animais, já que ocupam pequenos espaços, tem manejo mais fácil entre outros fatores.

O objetivo desta aula é demonstrar a presença ou não de ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e ribonucleicos (RNA), em solução homogeneizada de macerado de fígado de rato, por meio de reações específicas, utilizando - se dos reagentes difenilamina e orcinol.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizou-se materiais como, as pipetas volumétricas (1, 2 e 5 mL), conta gotas, pipetador, tubo de ensaio, estante, erlenmeyer, água destilada. Macerado de fígado de rato, tubo falcon para colocar esse macerado, centrífuga aonde o tubo falcon com macerado eram postos para centrifugar a 2500 rpm, béquer de 50 mL, aquecedor para aquecer os tubos de ensaio com a mistura, um béquer foi posto encima do aquecedor para colocar os tubos. Soluções desta aula foram, o ácido tricloroacético (TCA) 20%, TCA 5%, HCl concentrado. Capela para o manuseio das soluções citadas acima.

Os reagentes difenilamina (que é útil para caracterizar indiretamente a presença de DNA, com a coloração azul). E o reagente orcinol (evidência a presença de RNA, com a coloração verde, pela reação com pentoses (riboses). Não é tão específico quanto à difenilamina, já que todas as riboses como a desoxirribose do DNA vão reagir em algum grau).

A metodologia iniciou-se com a montagem da etapa I, que era o preparo do macerado aonde se usa fígados isolados de ratos, esses fígados são homogeneizados com 9 volumes de ácido cítrico a 2% (essa etapa não foi feita na aula, o macerado já estava pronto).

Então a prática em si começou na etapa II, que era a extração dos ácidos nucleicos. Em um tubo falcon se colocavam 2 mL do macerado de fígado de rato feito na etapa I, adicionava - se a esse macerado mais 2 mL de TCA 20%, a solução final então teria TCA 10%, (esse TCA seria capaz de precipitar as proteínas, nucleoproteínas e ácidos nucleicos, todo o resto permaneceria no sobrenadante). Essa solução permaneceu em repouso por 10 minutos, e depois foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante era descartado e o sedimento era novamente suspenso com 4 mL de TCA 5%, por fim a solução era aquecida em banho Maria fervente durante 10 minutos (o TCA 5% aquecido rompe as associações não covalentes entre ácidos nucleicos e proteínas, assim as proteínas ficam precipitadas e os ácidos nucleicos ficam em solução). Novamente a solução foi centrifugada a 2500 rpm por mais 5 minutos e no final o sobrenadante (que continha os ácidos nucleicos) era transferido para um tubo de ensaio.

A etapa III (reação de caracterização do DNA), consistia na preparação de 2 tubos de ensaios A e B. E a última etapa, a etapa IV (reações de caracterização do RNA/ reação de Bial), consistia na preparação de mais dois tubos de ensaio C e D. Ambas etapas mostradas na tabela 01.

Tabela 01. Reação de Caracterização do DNA (A e B) e Reações de caracterização do RNA (C e D).

Reagente e soluções	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D
Extrato da etapa II	1 mL	0	1 mL	0
Água Destilada	0	1 mL	0	1 mL
Difenilamina	2 mL	2 mL	-----	-----
Orcinol	-----	-----	2 mL	2 mL
HCl concentrado	2 gotas	2 gotas	-----	-----

OBS: Manter os tubos A e B em banho maria fervente por 5 minutos, e os tubos C e D por 7,5 minutos depois deixar todos resfriarem a temperatura ambiente.

Resultados e discussão

Em ambas as etapas do experimento desta aula, a observação dos resultados era feita pela coloração que a solução assumia no final do experimento. As colorações são mostradas na tabela 02.

Tabela 02. Colorações finais das soluções.

Tubos	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D
Coloração	Azul	Transparente	Verde	Amarelo quase transparente

Como mostra a tabela 02. O tubo A teve coloração azul, o que caracteriza a presença de DNA pelo reagente difenilamina. O tubo B que serviu de testemunha com a água destilada permaneceu transparente o que confirma que a água não tem DNA.

Os tubos C e D da etapa II, apresentaram cores verde e amarelo bem claro respectivamente, o tubo D possui água destilada e essa coloração amarelo claro era devido apenas ao corante já que água também não possui RNA. O tubo C, sim possui RNA, o que é confirmado pela coloração verde, que é proveniente da reação com orcinol.

Considerações finais

Conforme pode - se perceber, a extração do DNA e RNA de animais é mais fácil de se fazer, do que a extração dos mesmo de vegetais. Já que as células vegetais possuem parede celular o que dificulta a lise. Além disso o fígado na extração de ácidos nucleicos de células animais é o mais utilizado devido ao tamanho do núcleo, maior em relação as demais células, além da cromatina menos compactada, ambos fatores que favorecem a extração.

Referências bibliográficas

PETKOWICZ, C. L. O. et al. **Bioquímica: aulas práticas**. Departamento de Bioquímica. 7ª ed. Curitiba. UFPR, 2007. 188 p.

G - JUNIOR, F. L. M. G. **Relatório bioquímica II 1 - 1**. Universidade Federal da Bahia. Ebah. 2014. Disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgSt4AK/relatorio-bioquimica-ii-1-1>> Acessado em 12 de Outubro de 2014.

BARROS, D.; KELLEN, M.; ICARO, P.; MARIA, S. **Extração de Ácidos Nucléicos**. Trabalhos feitos. 2013. Disponível em <<http://www.trabalhosfeitos.com/ensaios/Extra%C3%A7%C3%A3o-De-%C3%81cidos-Nucl%C3%A9icos/571402.html>> Acessado em 12 de Outubro de 2014.

DANTAS, A. **Extração de nucléotídeos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Slideshare. 2012. 87 p. Disponível em <<http://pt.slideshare.net/AdrianaDantas2/extrao-de-nucleotideos>> Acessado em 12 de Outubro de 2014.

PRÁTICA 07: CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE DA SOJA

Introdução

A uréase é uma enzima que ocorre em algumas bactérias e plantas e pode facilmente ser extraída da soja (*Glycine max*). Ela catalisa a hidrose da ureia em amônia e dióxido de carbono (PETKOWICZ, 2014).

A Uréase encontra-se principalmente em sementes, microrganismos e invertebrados. Nas plantas ela é um hexâmero (seis cadeias idênticas) localizada no citoplasma. Em bactérias, é constituída por duas ou três subunidades diferentes. Para ser ativada, a uréase precisa ligar-se a dois ions níquel por subunidade. Muitas espécies de bactérias produzem uréase, como a *Helicobacter pylori*, responsável pelas úlceras do estômago (MELO, 2008).

A uréase também esta presente no solo é proveniente da síntese por microrganismos e também de origem em resíduos vegetais. Solos contendo restos de cultura apresentam maior atividade de uréase. A atividade também depende da umidade, em solos secos a ureia pode permanecer estável, a taxa de hidrólise aumenta junto o teor de umidade do solo, até 20%, neste ponto, a taxa de hidrólise é pouco afetada pelo teor de água (MARCELINO; CANTARELLA, 2006)

A uréase como já mostrado é produzida por fungos, bactérias e plantas, mas não por animais, apesar de ser encontrada em animais como os ruminantes, ela não é produzida por eles, o que será explicado a seguir (MARTINELLI, 2007).

Os ruminantes possuem bactérias que digerem celulose na sua pança (primeiro compartimento do estômago) para ajuda-los a digerir a dieta vegetal. Os ruminantes libertam ureia nesta região do estômago, constituindo a ureia uma excelente fonte de azoto para o crescimento de bactérias. Para captar o azoto, as bactérias segregam uréase para decompor a ureia. Eventualmente, os animais digerem a massa de bactérias (MELO, 2008).

O Teste de Uréase é de utilização corriqueira e bastante específico para a presença de *Helicobacter sp.* (bactérias das úlceras do estômago) em humanos e também já detectaram sua positividade em equinos (PIFFER; BELLI, 2014).

O objetivo desta aula é demonstrar a natureza proteica da enzima, determinar qualitativamente a atividade enzimática de uma enzima, exemplificar a inibição da enzima e demonstrar a preferência da ação enzimática da uréase da soja.

Material e Métodos

Na aula prática de hoje utilizou-se materiais como, as pipetas volumétricas (1, 2 e 5 mL), conta gotas, pipetador, estante, erlenmeyer, água destilada. Solução de uréase, reativo biureto, tampão fosfato 1mmol/L, pH 7, contendo 1% de ureia, tampão fosfato 1 mmol/L, pH 7, sem ureia e tampão fosfato 1 mmol/ L, pH 7, contendo 1% de tiouréia. Além de solução de vermelho de fenol (indicador de pH ácidos e bases, ele passa de amarelo em meio ácido ou neutro para vermelho em meio básico.) e uma incubadora. Na aula foram realizadas três etapas do experimento, ou melhor dividindo três experimentos. Foram preparados 6 tubos de ensaios e marcados de A - F.

A metodologia iniciou-se com a montagem do experimento I (Reação do Biureto), que era o preparo de dois tubos, “A e B”. No tubo A, colocou-se 2 gotas da solução de uréase mais 2 mL de água destilada e agita-se, após adiciona-se mais 2 mL do reativo de biureto e mistura-se. Já no tubo B, colocou-se 2 mL de água destilada mais 2 mL do reativo de biureto e mistura-se.

No experimento II (Teste de atividade da uréase), consistia na preparação de mais dois tubos de ensaios C e D. No tubo C, colocou-se 3 mL de tampão fosfato 1 mmol/L, pH 7, contendo 1% de ureia mais 2 gotas de uréase.

Já no tubo D (branco), colocou-se 3 mL de tampão de fosfato 1mmol/L, pH 7, sem ureia mais 2 gotas de uréase. Em ambos os tubos adicionar uma gota de solução de vermelho de fenol. Os dois tubos foram agitados e incubados em banho Maria (manta aquecedora) por 5 minutos a 37°C.

No experimento III (Especificidade da enzima), preparamos dois tubos de ensaios E e F. No tubo E, colocou-se 3 mL de tampão de fosfato 1 mmol/L, pH 7, contendo 1 % de ureia e mais 2 gotas de uréase. No tubo F, colocou-se 3 mL de fosfato de 1 mmol/L, pH 7, contendo 1% de tiouréia e mais 2 gotas de uréase. Em ambos os tubos foram adicionados 1 gota de solução de vermelho de fenol e agitados e incubados em banho Maria (manta aquecedora) por 5 minutos a 37°C.

Resultados e discussão

Em ambas as etapas do experimento desta aula, a observação dos resultados era feita pela coloração que a solução assumia no final do experimento. As colorações dos três experimentos são mostradas na tabela 01.

Tabela 01. Colorações finais das soluções.

Tubos	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D	Tubo E	Tubo F
Coloração	Roxo	Azul	Laranja	Laranja claro	Rosa	Bege
* Resultado esperado	-----	-----	Rosa	Bege	-----	-----

Os tubos A e B do experimento I, tiveram: Tubo A coloração roxa o que caracteriza a presença de proteínas pela solução da uréase. O tubo B que serviu de testemunha com a água destilada permaneceu azul, devido a coloração do biureto, observando que não há presença de proteínas na água.

Nos tubos C e D do experimento II, aconteceu algum erro e as colorações ficaram laranja e laranja claro, respectivamente. A resposta para o erro foi logo encontrada na hora de adicionar o corante (vermelho de fenol) foram colocadas 2 gotas a mais do que se tinha pedido. Os tubos deveriam ficar rosa e bege, respectivamente. O tubo C, deveria ficar rosa pois possui ureia mais uréase que reagiram e formaram carbonato de amônio, que teve a mudança de pH, de ácido para alcalino (básico). Já no tubo D devido a presença apenas de uréase sem reação com ureia, a coloração deveria ter ficado bege. Os outros grupos obtiveram esses resultados, já que a quantidade de gotas de corante utilizadas foram corretas.

No experimento III, os tubos E e F tiveram: No tubo E houve coloração rosa devido a presença de ureia e uréase, uma reação rápida pois a uréase tem preferência pela ureia. No tubo F, constatou-se a presença de tiouréia e uréase pela coloração bege. Para ficar rosa demoraria mais tempo, já que a uréase prefere mais a ureia, a ureia é o substrato específico da uréase e por isso a reação com ela se dá mais rapidamente e de forma mais intensa, do que com a tiouréia, o grupo enxofre da tiouréia interfere na conformação do composto, assim apesar da reação ainda acontecer ela demora muito mais tempo e é menos intensa.

Considerações finais

O processo de reação da tiouréia com a uréase é mais demorado. Sendo que a tiouréia é um composto que apresenta ligação com enxofre o que muda a estabilidade da ureia. Nos experimento II e III, que foram aquecidos por 5 minutos em 37°C ocorria a ativação da uréase. Também é possível constatar que erros na execução da prática mesmo que pareçam pequenos como acrescentar duas gotas a mais podem interferir muito no resultado final de um experimento.

Referências bibliográficas

PETKOWICZ, C. L. O. et al. **Bioquímica: aulas práticas**. Departamento de Bioquímica. 7ª ed. Curitiba. UFPR, 2007. 188 p.

MELO, A. 2008. **Investigando a acção da urease**. Science in school. Disponível em <<http://www.scienceinschool.org/print/957>> Acessado em 20 de Outubro de 2014.

MARTINELLI, A. H. S. **Expressão da urease ubíqua de soja em Escherichia coli**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007). Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/12032>> Acessado em 20 de Outubro de 2014.

PIFFER, M. L. T.; BELLI, C. B. **Teste de Urease em Equinos: Relação da Positividade com Outras Bactérias que não a Helicobacter sp**. USP. 2014. 1p. Disponível em <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=3227&numeroEdicao=18>> Acessado em 20 de Outubro de 2014.

CANTARELLA, H.; MARCELINNO, R. **O uso de inibidor para aumentar a eficiência da ureia**. Instituto Agrônomo, Campinas, SP. 2006. 19 p. Disponível em <<http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=2&ved=0CDUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.ipni.net%2Fppiweb%2Fpbrazil.nsf%2F1c678d0ba742019483256e19004af5b8%2Fd212a714b4fe482f032572bb006c3908%2F%24FILE%2FAnais%2520Heitor%2520Cantarella.doc&ei=JL3BUbXPEM-K0QGU3oDoDQ&usg=AFQjCNGADEmXe8i8Sru6BnZr83RLVCrgtA&sig2=IWXo-4vqxdzmKAGTJmsLqQ>> Acessado em 20 de Outubro de 2014.