

SINTESIS DE UN PRODUCTO CON CAPACIDAD DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD UREASICA ^a

Juan López ^b
José A. Cuarón Ibarquengoytia ^c

RESUMEN

Por las posibles aplicaciones de la inhibición de ureasa en la nutrición animal, se ensayó un método simple para la síntesis de ácido acetohidroxámico (AAH) y se determinó la cinética de inhibición de la actividad de la ureasa de *Canavalia ensiformis*, causada por el producto sintetizado. Cálculos basados en la figura doble recíproca de Lineweaver Burk, mostraron que la constante de Michaelis-Menten (K_m) de 0.0044 M para la ureasa, independientemente de la presencia o no del compuesto, mientras que los valores de velocidad máxima (V_{max}) de la reacción fueron diferentes ($p < 0.001$); se liberó menos NH_3 en presencia de los cristales recuperados. La concentración de urea no afectó al sistema enzima-inhibidor, lo que da evidencia de una inhibición de tipo no competitivo, cinética que corresponde a la del AAH. La síntesis alcanzó una eficiencia de recuperación del 70.5% del total de los solutos reactantes. La presencia del AAH sintetizado provocó que se liberara un 18.4% menos del total de NH_3 generable en el medio de reacción usado pero, más relevante fue el retraso en la liberación del radical amonio.

PALABRAS CLAVE: Acido aceto hidroxámico, Hidroxamatos, Síntesis, Inhibición enzimática, Ureasa.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 34 No. 2 (1996).

Los hidroxamatos son específicos y potentes inhibidores de las ureasas bacteriana y vegetal (1), destacando por sus aplicaciones clínicas e industriales el ácido aceto hidroxámico (AAH) y los hidroxamatos derivados de amino ácidos (2). La capacidad de inhibición de la ureasa se debe a la presencia en la molécula de un grupo -CONHOH. Específicamente, el AAH (HONHC:OCH₃) se ha usado para inhibir la ureasa intestinal en humanos urémicos (3), pero también se ha demostrado el efecto de inhibición de la enzima en el líquido ruminal de borregos (4, 5) e, *in vitro*, de la ureasa de *canavalia* (6).

La inhibición de la ureasa por el AAH es de tipo no competitivo, esto es, que inhibe la actividad de la enzima sin importar la concentración del sustrato (6, 7); el efecto en un medio natural completo, es el de reducir la velocidad de hidrólisis de urea,

retrasando efectivamente la liberación de amonio (NH_3), lo que es conveniente por la potencial toxicidad del radical. Por esto, es que el AAH podría ser de utilidad como aditivo en la dieta de los rumiantes (notablemente, cuando se alimenten con nitrógeno no proteico) y de los no rumiantes, porque al reducir la concentración de NH_3 se podría lograr una mayor utilización de los nutrimentos a nivel intestinal.

Los hidroxamatos, entre otros el AAH, están disponibles en grado reactivo, pero su costo es elevado. Sin embargo, la síntesis del AAH es sencilla y el proceso se puede desarrollar para su aplicación en la producción animal. El objetivo de este trabajo fue el de aplicar un método acreditado para la síntesis del hidroxamato (7), buscando la obtención de cristales que pudieran inhibir la acción de la ureasa.

El procedimiento seguido fue el siguiente: a un matraz conteniendo 300 ml de etanol al 30%, 1.0 moles de clorhidrato de hidroxilamina y 1.5 moles de hidróxido de sodio, se le añadió por goteo y en agitación constante 1.0 mol de acetato de etilo; la solución se dejó reposar durante 30 min y se neutralizó con ácido clorhídrico

^a Recibido para su publicación el 16 de febrero de 1995.

^b Dirección actual: Campo Experimental Huimanguillo, Centro de Investigación Regional del Golfo Centro, I.N.I.F.A.P., Carretera Huimanguillo-Cárdenas, km 1. Apartado postal 17, Huimanguillo, Tabasco, 86400.

^c Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal, I.N.I.F.A.P., Apartado postal 29-A, Querétaro, Qro. 76020.

concentrado. Finalmente, se evaporaron los líquidos en baño María a 50 C, dejando como remanente a los cristales, que se extrajeron con acetato de etilo a una temperatura cercana a los 50 C, para luego filtrarlos en papel y lavarlos en acetato de etilo y éter. El producto de la síntesis se secó en una estufa de aire forzado por 72 h a una temperatura constante de 50 C.

Obtenidos los cristales, se midió la inhibición de la actividad ureásica de *Canavalia ensiformis*, para lo que se usó la técnica descrita por Kobashi (2): se utilizó una solución de urea al 0.4% y la enzima se preparó en concentración de 0.2 mg/ml; todas las soluciones y aforos a 4.0 ml, se prepararon con una solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M y pH de 7.2. La adición de la solución con la enzima fue constante, a razón de 1.0 ml (i.e., 0.2 mg) por tubo de ensayo, mientras que el sustrato (la solución de urea) se adicionó en forma creciente, de tal forma que, al ajustar el volumen de reacción a 4.0 ml, se lograron concentraciones de 0, 6.68, 8.53, 10.2, 11.69, 13.36, 15.03 y 16.7×10^{-3} moles/l. El tiempo de reacción fue, en todos los casos, de un minuto y se detuvo ésta con la adición de 3 ml de ácido perclórico al 4%, seguido de 0.7 ml de NaOH 3N y 0.3 ml de tartrato de Na-K al 5%.

Para evaluar la respuesta se midió la liberación de amonio, para lo que se agregó el reactivo de Nessler y se dejó a la mezcla reaccionar por 15 min, para medir la coloración por absorbancia a los 420 nm. La cinética de inhibición se midió con el método anterior, pero antes de la inclusión de urea, se añadieron a cada uno de los tubos de ensayo 40 µg de los cristales sintetizados, a partir de una solución 1.006 mM, incubándose los reactantes a temperatura ambiente y por un período de 30 min. En todos los casos, los ensayos se corrieron simultáneamente por duplicado. El NH₃ liberado se determinó al comparar contra una curva patrón, construida con 10

niveles, a intervalos idénticos, de una solución patrón de 0.195 mg/l de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄, equivalente a 50 mg de NH₃/ml. Posteriormente, se adicionó la solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M para llevar el volumen de reacción a 4.0 ml. Los reactivos usados en la prueba de la reacción enzima-sustrato fueron igualmente adicionados a los tubos en los ensayos de inhibición (8). La curva producto de la respuesta se calculó en pruebas por triplicado y los valores resultantes de NH₃ se sujetaron a un análisis de regresión (9), cuya ecuación lineal resultó ser la siguiente:

$$Y = -0.013 + 0.021(X), \quad r^2 = 0.98$$

Las absorbancias registradas se transformaron a g de NH₃, usando para ello la ecuación de la curva patrón y, posteriormente, se graficaron e incluyeron en modelos de regresión lineal los inversos de los valores de NH₃. Así, los resultados se graficaron para la expresión de la doble recíproca de Lineweaver Burk (8), con lo que se calificó el tipo de inhibición. Los resultados de la concentración de NH₃, se sujetaron además a un análisis de varianza, para lo que se usó un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 7 (concentraciones de urea) por 2 (inclusión o no de los cristales sintetizados), con dos repeticiones (9).

Un resumen de los reactivos usados para la síntesis, así como de sus proporciones, se presenta en el Cuadro 1. El total de sólidos utilizados fue de 2 moles, lo que equivale a 157.6 g; el Cuadro 2., exhibe el comportamiento típico del rendimiento de los cristales en la síntesis, mostrando el peso (en g) y los porcentajes (de los 157.6 g) de los sólidos rendidos. Con un total de 17 observaciones controladas se alcanzó una media de 111.1 g, lo que equivale a una eficiencia de rendimiento del 70.5% y supone que 1.41 moles fueron recuperados como cristales, presumiblemente de AAH, cuya pureza no se determinó.

CUADRO 1. REACTIVOS PARA LA SINTESIS DEL ACIDO ACETOHIDROXAMICO

SOLUTOS *	
Acetato de etilo, M	1.0
Clorhidrato de Hidroxilamina, M	1.0
Hidróxido de sodio, M	1.5
SOLVENTES	
Etanol, ml	300
Acido clorhídrico, ml	± 39

* El total de sólidos reactivos (Acetato de etilo y Clorhidrato de Hidroxilamina) usados fue de 2 moles.

En cuanto a la cinética de inhibición de la ureasa de *Canavalia*, los cálculos basados en los inversos de la producción de NH₃ (Cuadro 3.), en presencia o no de los cristales obtenidos (doble recíproca de Lineweaver Burk), indican que la constante de Michaelis Menten (K_m) fue de 0.0044 M, como se ilustra en la Figura 1. y que manifiesta que la concentración del sustrato (urea), en presencia del producto sintetizado, no afectó el complejo enzima inhibidor (8). El efecto inhibitorio del producto sintetizado no pudo ser eliminado al aumentar la concentración de urea, lo que

CUADRO 2. RENDIMIENTO DE CRISTALES POR EL PROCESO DE SINTESIS^a

Gramos	%	Gramos	%
115.0	73.0	110.0	69.8
110.0	69.8	113.0	71.7
114.4	72.6	105.0	66.6
113.0	71.7	111.0	70.4
113.7	72.1	111.0	70.4
114.0	72.3	105.0	66.6
100.0	63.4	111.5	70.7
113.7	72.1	114.0	72.3
115.0	73.0		
Media ± S		111.1±4.18	70.5± 2.65

^aLa esperanza de rendimiento era de 157.6 g por observación. El producto se secó en estufa de aire forzado a 50C.

se describe con la velocidad máxima (V_{max}) y cuyas medias al análisis estadístico, resultaron ser diferentes (p<0.001), lo que da evidencia de una inhibición no competitiva (8).

El tipo y, más aún, el grado de inhibición observado con el producto sintetizado fue muy semejante al encontrado con hidroxamatos purificados: K_m de 0.0044, vs una variación de 0.02 a 0.002 M (10, 11, 12, 13). Esta observación se confirmó por los resultados del análisis estadístico de los valores del NH₃ liberado por la actividad de la enzima (Cuadro 3.). Aunque no se confirmó químicamente la identidad de los cristales, o su pureza, el producto obtenido por la síntesis descrita tuvo las mismas características de los hidroxamatos purificados, particularmente del AAH.

CUADRO 3. PRODUCCION DE AMONIO, POR LA HIDROLISIS DE UREA, EN PRESENCIA O NO DE LOS CRISTALES SINTETIZADOS^a

Urea, moles/l, x 10 ⁻³	SIN AAH	CON AAH
6.68	16.64 ± 1.51	13.43 ± 0.47
8.53	18.34 ± 1.48	14.29 ± 0.06
10.20	19.17 ± 2.73	16.29 ± 0.33
11.69	18.53 ± 1.62	15.31 ± 0.09
13.36	20.96 ± 1.82	17.86 ± 0.47
15.03	21.45 ± 0.09	17.12 ± 0.17
16.70	21.95 ± 1.34	17.57 ± 0.54

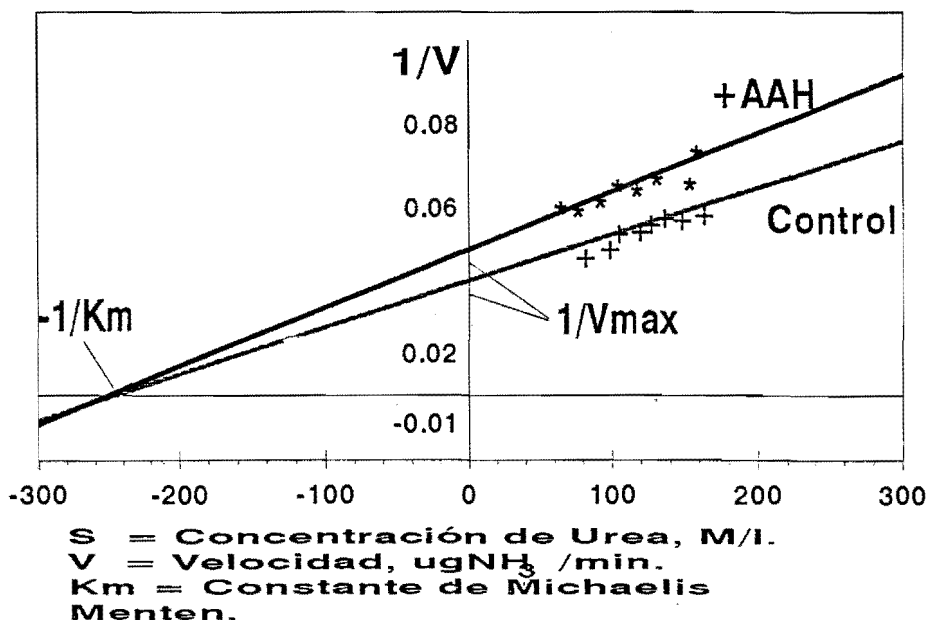
^a Amonio en g. promedio de dos observaciones y tres corridas.

Con AAH fue menor (p < 0.001).

A partir de los reactivos y procedimiento usados, se obtuvo una eficiencia de recuperación de los sólidos del 70.5% y con el ensayo de inhibición de la ureasa, se demostró que el producto es un inhibidor no competitivo de la ureasa de *Canavalia*.

Se presupone que el producto sintetizado fue ácido acetohidroxámico (AAH). Sin embargo, no se tuvo la precaución de conservar muestras de los lotes de cristales usados en estos ensayos, por lo que no se

FIGURA 1. CINETICA DE INHIBICION DE LA UREASA DE CANAVALLIA POR EL PRODUCTO SINTETIZADO, DOBLE RECIPROCA DE LINEWEAVER BURK



podieron determinar en el laboratorio algunas de sus características fisicoquímicas, mismas que hubiesen permitido inferir sobre la identidad del producto. Esto será condición *sine qua non* en futuras experiencias, cuando sea necesario concluir sobre la identidad del producto de la síntesis, o bien, como una rutina de control de calidad en el proceso de producción. Además, en futuras experiencias, sería recomendable secar los cristales en estufa de vacío para prevenir el posible daño térmico y buscar aumentar la eficiencia de rendimiento.

Por la simplicidad y eficiencia del proceso de síntesis es posible denotar viabilidad para el desarrollo de un producto que, por la inhibición de ureasa, confiera ventajas en la producción animal. Particularmente, este producto podría ser útil para promover el crecimiento en animales no rumiantes (3, 14, 15), ya que al prevenir un exceso de NH_3 en la luz intestinal se podrá aumentar la eficiencia del proceso de absorción de nutrientes (15) y, en los rumiantes, el

producto podrá usarse para inducir un mejor aprovechamiento del NH_3 ruminal y con esto, quizá alcanzar mejores patrones de fermentación (4, 5, 16).

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen el liderazgo, asesoría y desinteresada ayuda de la Q.F.B., M.Sc. Irma Tejada de Hernández.

El trabajo fue realizado con apoyo financiero parcial del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C.

SYNTHESIS OF A UREASE ACTIVITY INHIBITOR

SUMMARY

Considering the possible applications of an urease inhibitor in animal nutrition, a simple method of ketohydroxamic acid (AAH) synthesis was assayed; inhibition kinetics of *Canavalia ensiformis* urease activity by the synthetic product was tested. The Michaelis Menten constant (K_m) was 0.0044 M, regardless of the presence of the synthesized compound; while the maximum velocity (V_{max}) value was different ($p < 0.001$); use of

the mixed crystals showed less NH_3 formation. Since the urea concentration did not alter the enzyme-inhibitor system, a non-competitive inhibition was defined. This type of inhibition, as previously found, corresponds to that caused by pure hydroxamates on the activity of plant or microbial urease. The synthesis had an efficiency of about 70.5% on a molar basis; the presence of the synthesized product resulted in an 18.4% lower production of NH_3 , and more important, the time of urea hydrolysis was delayed.

KEY WORDS: Hydroxamates, Keto hydroxamic acid, Synthesis, Urease inhibition.

REFERENCIAS

1. Kobashi K J, Kumaki H J. Effect of acyl residues of hydroxamic acids on urease inhibition. *Biochim.Biophys.Acta.* 1971; 227:429.
2. Kobashi K J, Takebe S, Terashima N, Hase J. Inhibition of urease activity by hidroxamic acid or derivatives of ammonium acids. *J.Biol.Chem.* 1975; 77:837.
3. Fishbein W N, Carbone P P, Hochtein H D. Acetohydroxamate: a bacterial urease inhibitor with therapeutic potential in hyper ammoniaemic states. *Nature.* 1965; 208:46.
4. Baintner K, Jr. The influence of acetohydroxamic acid on decomposition of urea in the rumen (Abstr.). 1967 (Allattenyesztes)16:283, *Chem Abstr.* 1967, 68:27933x.
5. Streeter, C L, Oltjen R R, Slyter L L, Fishbein W N. Urea utilization in wethers receiving the urease inhibitor acetohydroxamic acid. *J.Anim.Sci.* 1969; 29:88.
6. Kobashi K J, Hase J, Hehara K. Specific inhibition of urease by hydroxamic acid. *Biol.Chem.Biophys.Acta.* 1962; 65:380.
7. Fishbein W N, Winter T S, Davidson J D. Urease catalysis II. Inhibition of the enzyme by hydroxyurea, hydroxylmic and acetohydroxamic acid. *J.Biol.Chem.* 1965; 240:247.
8. Conn E, Stumpf P K. *Outlines of Biochemistry*, 4th. ed., John Willey and Sons, Inc., New York. 1976.
9. Anderson V L, McLean R A. *Design of experiments, a realistic approach.* Marcel Dekker, Inc., New York. 1974.
10. Harmon K M, Niemann C. The competitive inhibition of the urease-catalyzed hydrolysis of urea by phosphate. *J.Biol.Chem.* 1949; 177:601.
11. Brent B E, Adepoju A, Portela F. *In vitro* inhibition of rumen urease with acetohydroxamic acid. *J.Anim.Sci.* 1970; 32:794.
12. Lister A J. The kinetics of urease activity in *Corynebacterium renale*. *J.Gen.Microbiol.* 1956; 14:478.
13. Baintner K, Jr. Inhibition of the activity of rumen urease *in vitro*. *Chem.Abstr.* 1964; 65:5570.
14. Cervantes L J, López J, Cuarón I J A, Saldaña Q G. El ácido aceto hidroxámico como promotor del crecimiento en pollos de engorda. *Téc.Pecu.Méx.* 1988; 26(1):73.
15. Visek W J. Effects of urea hydrolysis on cell life-span and metabolism. *Fed.Proc.* 1972; 31:1178.
16. Cruz S R, López J, Cuarón I J A. Inhibición de la actividad ureásica ruminal *in vitro* por el ácido acetohidroxámico. *Téc.Pecu.Méx.* 1988; 26(2):153.