



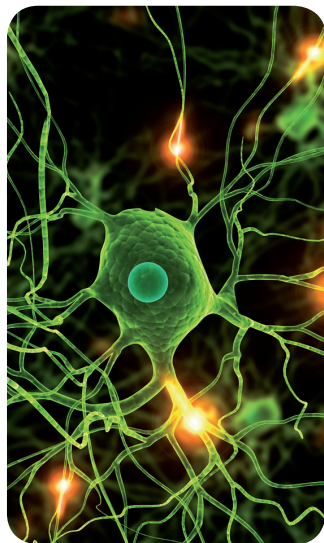
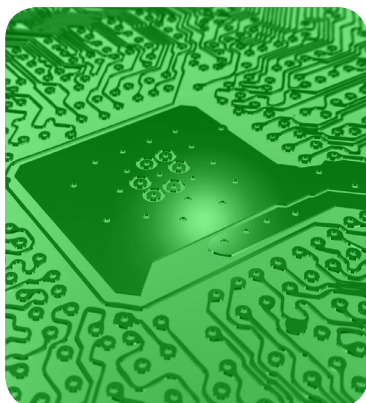
MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias
/ 15-16

Química Agrícola
y Nuevos Alimentos



excelencia Campus Internacional
UAM
CSIC+



Extractos de *candida pulcherrima* como potenciales inhibidores de la ureasa
Cristina Gómez Pérez





FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

MÁSTER EN QUÍMICA AGRÍCOLA Y NUEVOS ALIMENTOS

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

EXTRACTOS DE *Candida pulcherrima* COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE LA UREASA

Cristina Gómez Pérez

Directores:

Dr. Juan José Lucena Marotta

Dra. Sandra López Rayo

Madrid, 19 de septiembre de 2016

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. La urea y su importancia en la agricultura	3
1.2. Ureasa	5
1.3. Cinética enzimática de la ureasa	6
1.4. Estructura y mecanismo de acción de la ureasa	7
1.5. Inhibidores de la ureasa	9
1.6. Legislación vigente sobre inhibidores de la ureasa	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Reactivos generales	13
3.2. Actividad ureasa	15
3.3. Inhibición de la actividad ureasa	16
3.4. Inhibición de la actividad ureasa en suelos	17
3.5. Determinación de amonio	18
3.6. Análisis estadístico y expresión de los resultados	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Actividad ureasa	21
4.2. Inhibición de la actividad ureasa	23
4.3. Inhibición de la actividad ureasa en suelos	26
4.4. Discusión general	29
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31
Anexo	33

RESUMEN

La urea es uno de los fertilizantes nitrogenados más utilizados en todo el mundo. Las plantas toman el amonio generado a partir de la urea gracias a la hidrólisis que llevan a cabo las ureasas del suelo. Sin embargo, esta hidrólisis puede tener efectos negativos ambientales y económicos, como la volatilización del amoníaco, la acumulación de nitritos (tóxicos para las plantas) o la lixiviación de los nitratos y subsecuente contaminación de los acuíferos. Los inhibidores de la ureasa suponen una estrategia eficaz para mitigar estos efectos. Uno de los más utilizados y eficaces es la triamida N-(n-butil)tiofosfórica, o NBPT, cuyo uso combinado con fertilizantes uréicos está permitido por la legislación vigente. Recientemente se están investigando productos de origen natural capaces de inhibir la actividad ureasa, con el propósito de encontrar productos sostenibles, no tóxicos, estables, eficientes y económicamente competitivos.

En este trabajo se estudia la capacidad inhibidora de la ureasa de tres productos procedentes del extracto de la levadura *Candida pulcherrima*, y se compara con el inhibidor NBPT como referencia. Inicialmente se estudia la actividad de la ureasa procedente de la judía "jack bean" (*Canavalia ensiformis*) a pH 7,2 a 25 °C para encontrar la relación óptima urea/ureasa que proporcione la máxima actividad enzimática. Utilizando esta relación, se llevan a cabo los ensayos de inhibición de la ureasa de "jack bean", donde se revela que dos de los productos estudiados presentan unos porcentajes de inhibición comparables con los obtenidos para el NBPT, mientras que el tercero no muestra inhibición. Con los dos productos que presentan inhibición se lleva a cabo un estudio en dos suelos básicos de textura franco-arenosa. En el primer suelo los dos productos muestran inhibición de la ureasa, uno de ellos comparable a la del NBPT, y el otro presenta una inhibición menor. El segundo suelo presenta una menor actividad ureasa debido a que contiene menos materia orgánica, y la ureasa se encuentra retenida en la misma, y no se observa inhibición por parte de ninguno de los productos. Aunque hay que estudiar en profundidad los efectos de los factores edáficos y continuar las investigaciones, estos resultados son muy prometedores y pueden suponer una alternativa sostenible y eficaz a los inhibidores sintéticos de la ureasa.

ABSTRACT

Urea is one of the most used nitrogenous fertilizers worldwide. Plants assimilate ammonium generated from urea hydrolysis by soil ureases. However, this hydrolysis can have negative environmental and economic effects, such as ammonia volatilization, nitrite accumulation that can be toxic to plants, or nitrate leaching and subsequent contamination of the aquifers. Urease inhibitors are an effective strategy to mitigate these effects. One of the most used and effective urease inhibitors is N-(n-butyl)thiophosphoric triamide, or NBPT, which use, combined with urea fertilizers, is permitted by current legislation. Recently, there are a new line of research focused on natural products as urease inhibitors, with the purpose of finding environmentally respectful, nontoxic, stable, efficient and economically competitive products.

In this work, the capacity of three products from a yeast *Candida pulcherrima* extract as urease inhibitors are studied and compared with NBPT as reference. Firstly, the activity of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*) is studied at pH 7,2 and 25 °C to find the optimum ratio urea/urease that provides maximum enzyme activity. Using this relationship, jack bean urease inhibitions assays are carried out, where it is revealed that two of the studied products have comparable percentages of inhibition with those obtained for NBPT, while the third product shows no inhibition. With the two products that have inhibitory capacity, a study on two basic and sandy loam soils is carried out. In the first soil, the two products exhibit urease inhibition, one of them comparable to that of NBPT, and the other shows lower inhibition percentages. The second soil has a lower urease activity because it contains less organic matter, and urease is retained there, and no inhibition is observed by any of the studied products. Although it is necessary to carry out more investigations on the effect of soil factors, these results are very promising, and these products could be a sustainable and effective alternative to synthetic urease inhibitors.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La urea y su importancia en la agricultura

La urea, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, se encuentra en los suelos debido a su presencia en la orina de los animales y a la descomposición de compuestos nitrogenados de organismos muertos, pero también a su uso como fertilizante. Debido a su alto contenido en nitrógeno, su elevada estabilidad, los bajos costes de producción, su alta solubilidad y su fácil manejo (Modolo y col., 2015), la urea es uno de los fertilizantes nitrogenados más usados en todo el mundo.

En las últimas décadas (1973-2013), el uso de fertilizantes nitrogenados ha aumentado en más de un 180% (IFADATA). En particular, el consumo de urea ha aumentado en casi un 660% desde 1973 hasta 2013, donde supuso un 57% del total de fertilizantes nitrogenados consumidos en todo el mundo (Figura 1). La urea presenta ciertas ventajas frente a otros fertilizantes nitrogenados. No conlleva riesgo de explosión como ocurre con el nitrato amónico, y contiene un 46% de nitrógeno frente al 21% del sulfato amoniacal, consiguiendo una mayor eficiencia por unidad de fertilizante y menores costes para los agricultores.

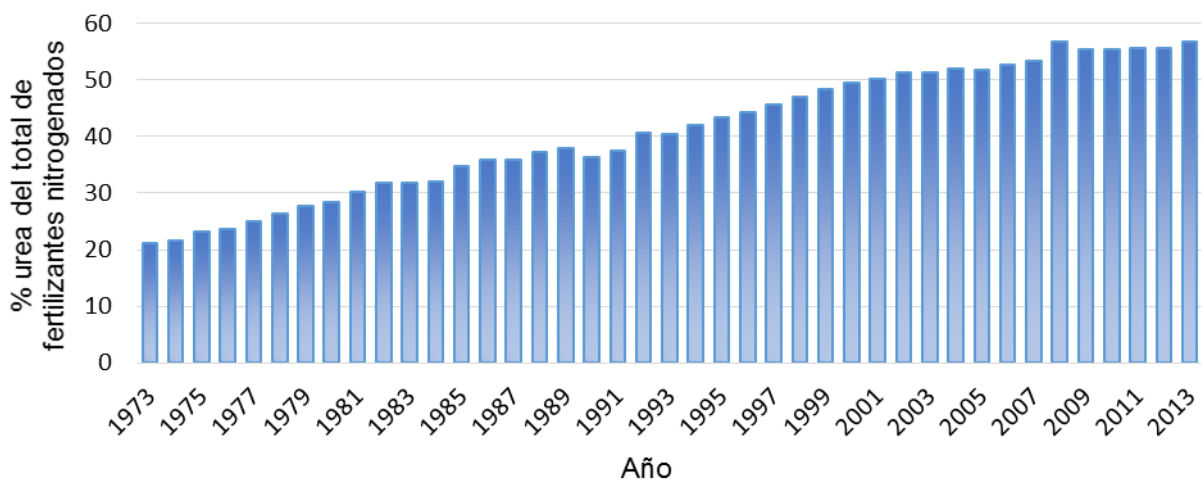
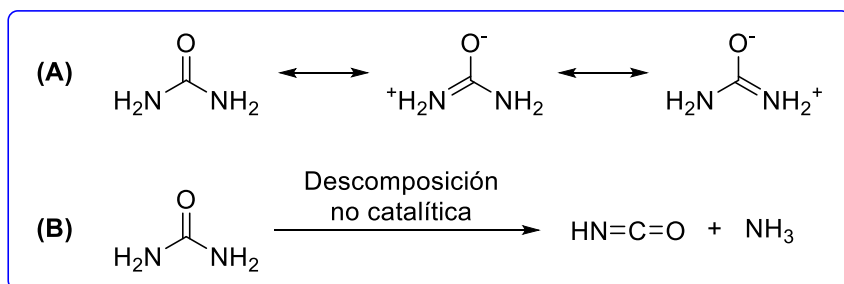


Figura 1. Porcentaje del consumo mundial de urea sobre el total de fertilizantes nitrogenados desde 1973 hasta 2013 (fuente: IFADATA).

Una vez aplicada al suelo, la urea se hidroliza por la acción de las ureasas en CO_2 y amonio, el cual es asimilado por las plantas. La actividad ureolítica del suelo proviene de los microorganismos, pero principalmente de la ureasa del suelo. La enzima presente en el suelo puede encontrarse de forma intracelular o extracelular; ésta última se puede encontrar libre, pero principalmente se halla inmovilizada en las arcillas y en las sustancias húmicas (Pettit y col., 1976; Gianfreda y col., 1995).

La urea es sumamente estable en disolución acuosa y resistente a la descomposición, debido a su energía de resonancia (**Esquema 1A**), que se estima en torno a $30\text{-}40 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Karplus y col., 1997). La descomposición no catalítica de la urea en disolución acuosa consiste en una reacción de eliminación que resulta en isocianato y amoníaco (**Esquema 1B**); esta reacción es

lenta, con una vida media de 3,8 años a 38 °C, y su velocidad es independiente del pH para el intervalo comprendido entre 2 y 12 (Zerner, 1991). La hidrólisis espontánea de la urea tiene una vida media de 520 años, mientras que con la ureasa la vida media es de 20 ms, por lo que la enzima incrementa la velocidad de la reacción en 10^{15} (Zambelli y col., 2011)



Esquema 1. (A) Formas resonantes de la urea. (B) Descomposición no catalítica de la urea.

No obstante, la hidrólisis de la urea puede tener efectos adversos, tanto ambientales como económicos. El proceso (**Figura 2**) conduce al incremento del pH en el suelo y a la acumulación de amonio; a su vez, este amonio puede transformarse en nitrito y posteriormente en nitrato mediante la nitrificación. Si la nitrificación está inhibida y además las plantas no toman el amonio a la misma velocidad que se genera por la hidrólisis catalítica, se pueden producir pérdidas de amoníaco acumulado por volatilización. La acumulación de nitratos puede resultar en pérdidas de gases de nitrógeno por desnitrificación, además de perderse también por lixiviación conduciendo a la contaminación de los acuíferos. La acumulación de amonio y nitritos puede causar problemas durante la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas, y puede resultar tóxica tanto para las plantas como para la microflora del suelo (Manunza y col, 1999; Modolo y col., 2015). Todas estas pérdidas pueden suponer hasta el 50% del fertilizante aplicado, conllevando unas elevadas pérdidas económicas para el agricultor.

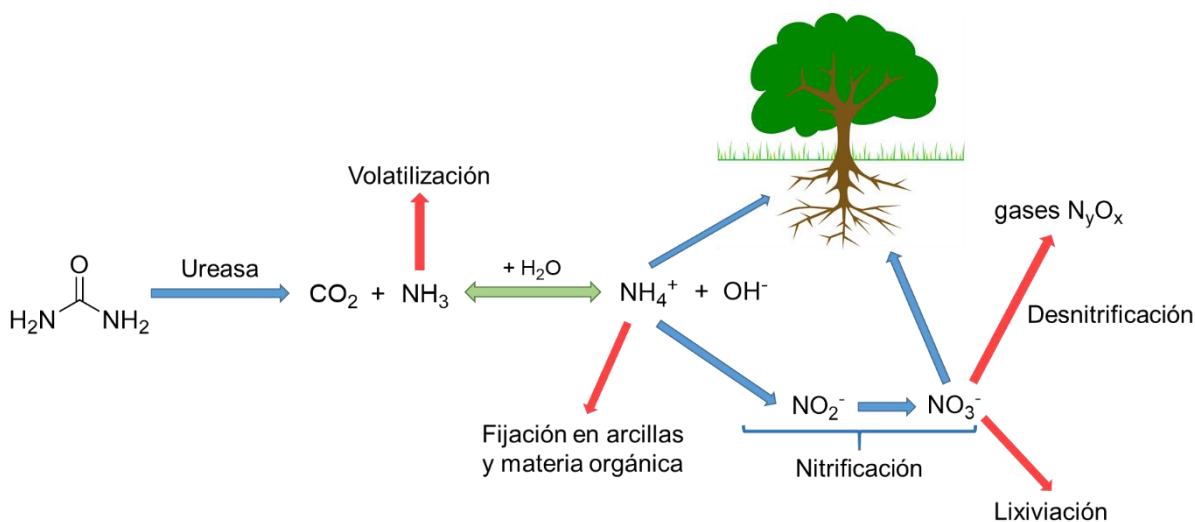


Figura 2. Esquema de las transformaciones de la urea en el suelo.

Existen dos estrategias generales para mitigar estos problemas derivados del uso de la urea como fertilizante. La primera consiste en aportar bajas dosis pero de forma frecuente, generalmente mediante fertirrigación o hidroponía. La segunda estrategia se basa en retardar la liberación, pudiéndose abordar de varias formas:

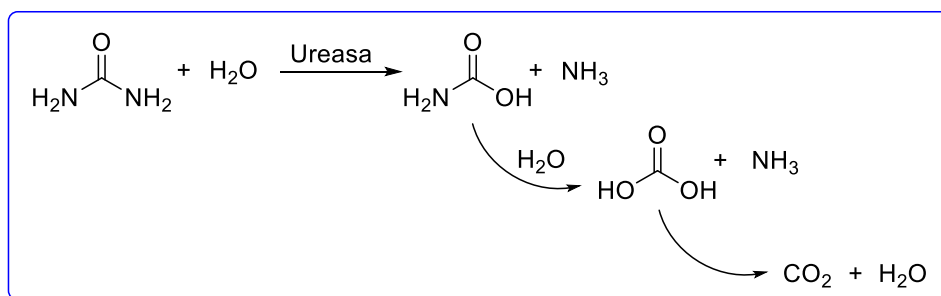
- Mediante el recubrimiento con azufre o polímeros orgánicos que ralentizan la velocidad de disolución.
- Mediante la aplicación de productos de lenta degradación que, al degradarse, generan urea.
- Mediante la aplicación combinada con inhibidores de la ureasa y de la nitrificación.

En este Trabajo de Fin de Master se va a centrar la atención en la enzima ureasa y en los inhibidores de la misma para el control de la hidrólisis de la urea en el suelo.

1.2. Ureasa

Las ureasas (urea amidohidrolasas, EC 3.5.1.5) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, estando presentes en plantas, bacterias, hongos y algas (Carlini y col., 2016). Virtualmente está presente en todas las plantas, pero es especialmente abundante en las semillas de las leguminosas, conteniendo un 0,012% de ureasa por peso seco en las de soja (*Glycine max*), y entre un 0,07-0,14% en las de "jack bean" (*Canavalia ensiformis*), siendo estas últimas una de las fuentes más comunes de esta enzima (Weber y col., 2008).

Aunque tienen diferentes estructuras proteicas dependiendo del organismo del que procedan, todas llevan a cabo la misma función catalítica: la hidrólisis de la urea en amoníaco y ácido carbámico (Krajewska, 2009); éste último se hidroliza espontáneamente, dando lugar a otra molécula de amoníaco y a ácido carbónico (**Esquema 2**). El ácido carbónico se descompone en H₂O y CO₂, que se volatiliza a la atmósfera. La característica común más importante de las amidohidrolasas es la presencia de centros metálicos en el sitio activo, que activan el sustrato y el agua para que tenga lugar la hidrólisis. Aunque existen otras metalohidrolasas dinucleares en esta gran familia, las ureasas son las únicas que poseen iones de níquel (II) en el centro activo (Estiu y col., 2006).



Esquema 2. Hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa, produciendo amoníaco, y dióxido de carbono.

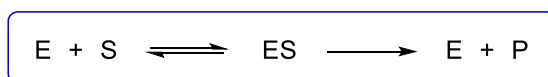
Los dos protagonistas de la reacción catalítica, urea y ureasa, son de especial importancia en el desarrollo de las ciencias naturales. La urea fue descubierta por primera vez en la orina humana por Hillaire M. Rouelle en 1773, convirtiéndose más tarde en el primer compuesto orgánico sintetizado a partir de materiales inorgánicos por Wohler en 1828. En 1926, James B. Sumner cristalizó la ureasa procedente de la judía “jack bean” (*Canavalia ensiformis*), demostrando por primera vez en la historia que las enzimas son proteínas y, por tanto, pueden cristalizarse (Sumner, 1926). Igualmente importante fue el descubrimiento de que la ureasa de “jack bean” es la primera enzima que se conoce que contiene iones de níquel en el centro activo, esenciales para su actividad (Dixon y col., 1975).

1.3. Cinética enzimática de la ureasa

La unidad enzimática (U) es la unidad estándar que más se usa para la actividad enzimática. Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que causa la desaparición de 1 μmol de sustrato, o la formación de 1 μmol de producto, por minuto (**ecuación 1**). Por otra parte, la actividad específica es el número de unidades enzimáticas que hay por unidad de masa (Marangoni, 2003).

$$1 \text{ U} = \frac{1 \mu\text{mol}}{\text{min}} \quad (1)$$

Generalmente, una reacción enzimática es un proceso de dos pasos: la unión del sustrato (S) y la enzima (E) para formar un complejo enzima-sustrato (ES), seguido por la ruptura irreversible del complejo enzima-sustrato que da lugar al producto (P) y a la enzima libre (**Esquema 3**).



Esquema 3. Proceso enzimático general, donde E es la enzima, S el sustrato y P el producto de la reacción catalítica.

Las ureasas presentan, normalmente, una cinética simple de Michaelis-Menten, aunque se ha visto inhibición de la reacción a elevadas concentraciones de sustrato y producto (Krajewska, 2009). En el modelo de Michaelis-Menten se asume que el paso de unión entre la enzima y el sustrato es más rápido que la ruptura del complejo ES; por lo tanto, la reacción de unión entre la enzima y el sustrato está en equilibrio. La constante de este equilibrio, K_M , es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato, y se corresponde con la concentración del sustrato (S) a $\frac{1}{2}$ de la velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$ (**Figura 3A**). Es decir, cuanto menor es el valor de K_M , mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato (Marangoni, 2003).

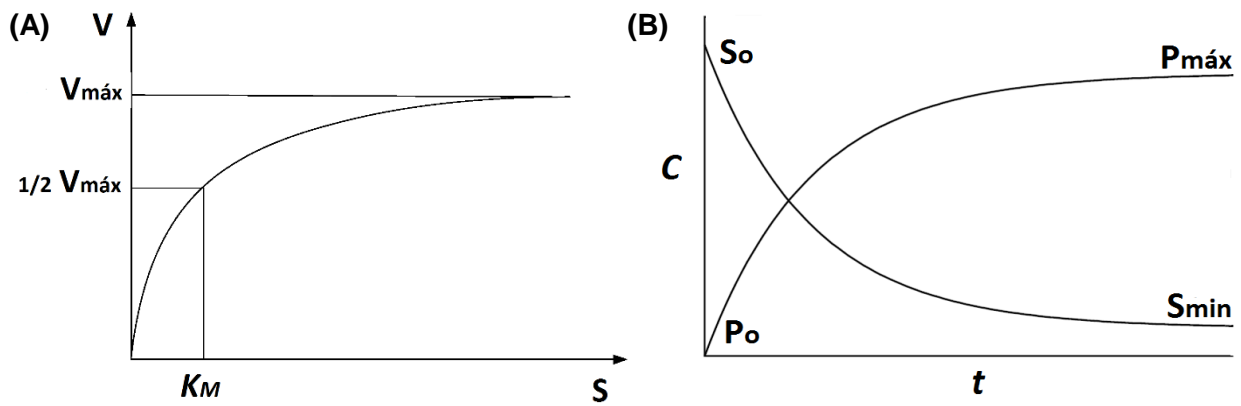


Figura 3. (A) Velocidad de la reacción (V) frente la concentración del sustrato (S). Se indica la constante de Michaelis-Menten, K_M , y la velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$. **(B)** Concentración del sustrato (S) y del producto (P) en función del tiempo.

La velocidad de la reacción enzimática se corresponde con la pendiente de la curva de la concentración frente al tiempo (**ecuación 2**). Por lo tanto, la velocidad máxima se corresponde con la zona inicial de esta curva, donde la pendiente es máxima (**Figura 3B**).

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

Habitualmente, las ureasas de “jack bean” y de bacterias presentan valores de K_M en torno a 1-4 mM (Krajewska, 2009), mostrando una afinidad muy alta por el sustrato. Sin embargo, la actividad de las ureasas es fuertemente dependiente del pH, siendo activas en un rango de 4,5-10,5, con un pH óptimo de 7-8 (Krajewska, 2009).

1.4. Estructura y mecanismo de acción de la ureasa

Las ureasas de plantas y hongos están compuestas por subunidades idénticas comúnmente agrupadas en trímeros, α_3 , que pueden asociarse en hexámeros α_6 . Cada subunidad α contiene dos átomos de níquel (Follmer, 2008). Las ureasas de las bacterias, en cambio, están compuestas, generalmente, por tres subunidades diferentes, una grande, α , que contiene el centro activo con los iones de níquel, y dos pequeñas, β y γ , formando frecuentemente trímeros $(\alpha\beta\gamma)_3$ (Zambelli y col., 2011). Aunque difieren en sus subunidades, todas las ureasas conocidas muestran una elevada analogía en la secuencia de aminoácidos. Esto sugiere que todas son variantes evolutivas de una enzima ancestral (Follmer, 2008).

El centro activo de las ureasas contiene dos iones de níquel (II) separados por 3,5-3,7 Å y unidos entre sí por los átomos de oxígeno de un resto de lisina carbamilada. Cada ión metálico está unido a dos nitrógenos de histidinas, y uno de ellos a un oxígeno de un aspartato. También se les une una molécula de agua a cada uno, y un ión hidróxido forma un enlace puente entre ambos iones. Como resultado de estas uniones, un Ni(II) se encuentra pentacoordinado con una geometría

pseudo piramidal cuadrada (Ni_1), mientras que el otro está hexacoordinado con una geometría pseudo-octaédrica (Ni_2). Una molécula adicional de agua se sitúa en la abertura del centro activo, y, junto con las otras dos moléculas de agua y el ión hidróxido, forman un cluster tetraédrico unido mediante puentes de hidrógeno que ocupa la cavidad del centro activo (Zambelli y col., 2011) (**Figura 4**). Este cluster es reemplazado por la urea cuando se une al centro activo para la reacción.

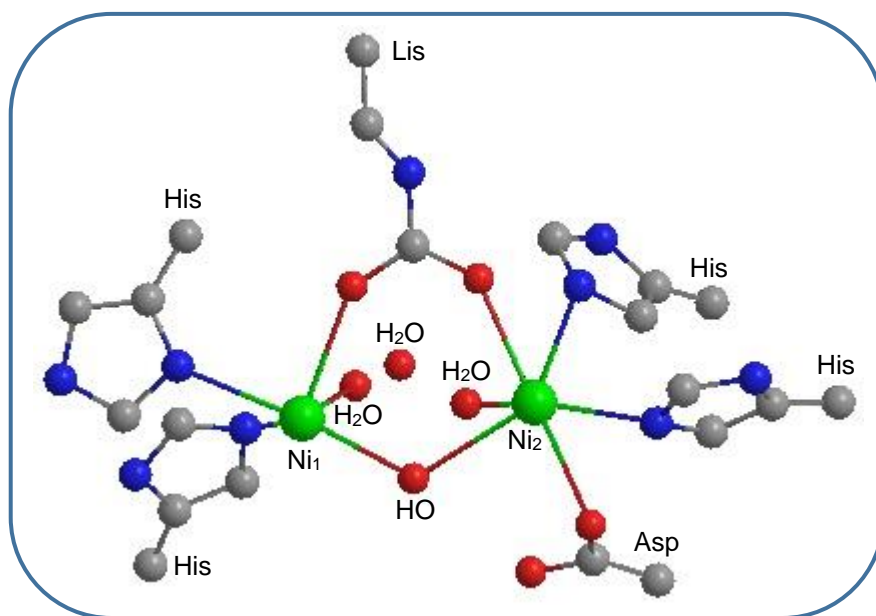
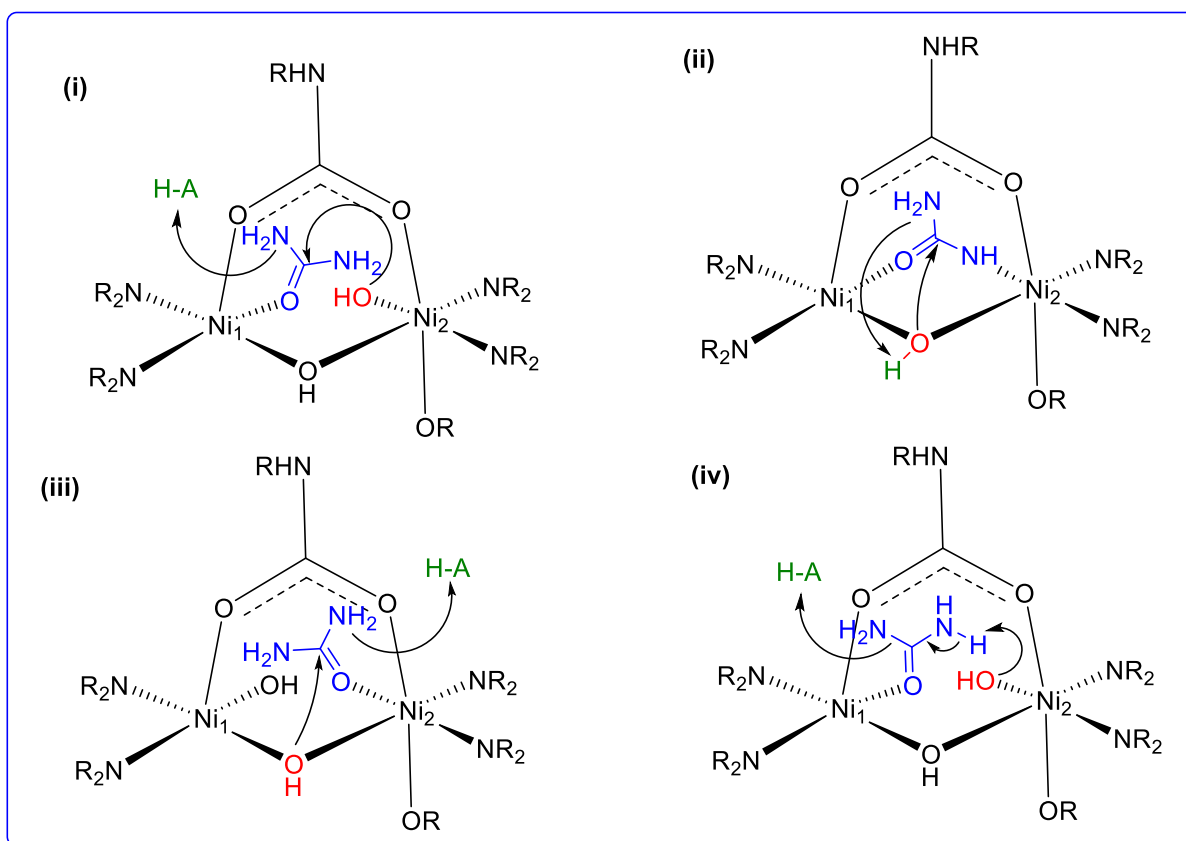


Figura 4. Centro activo de la ureasa. Verde: níquel (II); gris: carbono; azul: nitrógeno y rojo: oxígeno. Los restos de aminoácidos por los que se une a la enzima son asp: aspartato, lis: lisina e his: histidina.

Según cita Boer (2014), se han propuesto cuatro mecanismos generales para la ureasa. En el primero (**Esquema 4i**), el oxígeno de la urea desplaza a la molécula de agua unida al Ni_1 . La molécula de agua unida al Ni_2 reacciona con el carbono carbonílico de la urea, formando un intermedio tetraédrico que se descompone con la ayuda de un resto de histidina que actúa como ácido. El segundo mecanismo (**Esquema 4ii**) consiste en que la urea desplaza ambas moléculas de agua, actuando como un ligando bidentado que se une a ambos iones de níquel. El hidróxido puente reacciona con el carbono carbonílico conduciendo al intermedio tetraédrico, y dona su protón a la molécula de amoníaco que sale. El tercer mecanismo (**Esquema 4iii**) propone que la urea se une al Ni_2 y el hidróxido puente ataca al carbono carbonílico, con un resto de histidina actuando como ácido. El cuarto mecanismo (**Esquema 4iv**) se basa en estudios computacionales y biomiméticos. Una base general atrapa un protón de uno de los átomos de nitrógeno de la urea, resultando en la liberación de amoníaco y la formación de un cianato intermedio; posteriormente, el cianato se hidrata para formar el carbamato. Sin embargo, hay que señalar que nunca se ha detectado el cianato como producto.



Esquema 4. Mecanismos de acción en el centro activo de la ureasa.

1.5. Inhibidores de la ureasa

Existe un gran número de compuestos que presentan inhibición de la ureasa. Tanto el sustrato como el producto de la reacción son inhibidores, aunque débiles (Krajewska, 2009).

Los tioles son inhibidores en su forma aniónica tiolato. La estructura cristalina de la ureasa con β -mercaptoetanol (**Figura 5b**) revela que se une desplazando las cuatro moléculas de agua del centro activo (Krajewska, 2009), haciendo que ambos iones de níquel sean pentacoordinados.

Una coordinación similar es la que se observa con la unión del ácido acetohidroxámico (**Figura 5c**). Este ácido muestra una inhibición moderada, pero debido a su baja toxicidad, ha sido objeto de numerosos ensayos de inhibición en terapias médicas (Krajewska, 2009).

Los metales pesados también son inhibidores de la ureasa, con el siguiente orden de efectividad: $\text{Hg}^{2+} \approx \text{Ag}^+ > \text{Cu}^{2+} \gg \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Mn}^{2+}$. En la práctica, esta inhibición es importante porque en vista de la contaminación por metales pesados, una cantidad importante de la actividad ureasa en los suelos agrícolas puede estar comprometida. Además esta inhibición puede aprovecharse en la construcción de sistemas basados en la inhibición de la ureasa para medir *in situ* y a tiempo real niveles traza de estos iones, como por ejemplo, en monitoreo medioambiental, control de alimentos y análisis biomédicos (Krajewska, 2009).

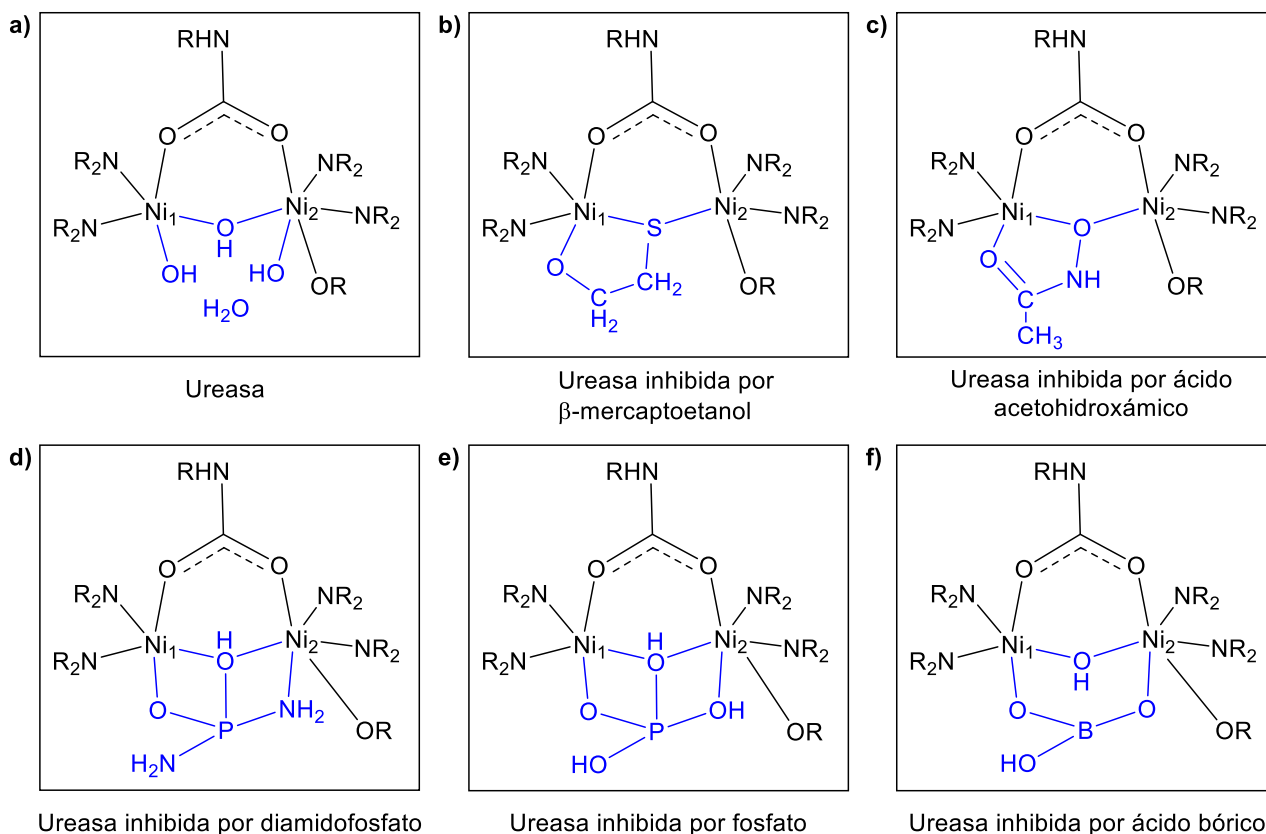


Figura 5. Estructuras esquemáticas del centro activo de la ureasa (a) nativa e inhibida por (b) β -mercaptoetanol, (c) ácido acetohidroxámico, (d) diamidofosfato, (e) fosfato y (f) ácido bórico.

Las amidas y los ésteres del ácido fosfórico también son inhibidores de la ureasa, y están clasificados como los más fuertes. El análisis cinético muestra que, independientemente del compuesto, la inhibición se produce siempre por el diamidofosfato (DAP) (**Figura 5d**), un producto de hidrólisis. La molécula tetraédrica del DAP reemplaza casi a la perfección el cluster formado por las cuatro moléculas de agua de la enzima nativa. Debido a su eficacia, una gran variedad de derivados tanto del ácido fosfórico como del tiosfosfórico han sido ampliamente estudiados debido a su elevada capacidad inhibidora en suelos. En especial, la triamida N-(n-butil) tiosfosfórica, o NBPT (**Figura 6**), siendo el inhibidor más eficaz y el más utilizado para el control de la actividad ureasa (Modolo, 2015). Este inhibidor se transforma en triamida N-(n-butil) fosfórica, o NBPTO, que se une a la ureasa por el átomo de oxígeno y por uno de sus átomos de nitrógeno (Creason y col., 1990; Kot y col, 2001), de forma similar al DAP. Además, el grupo amino restante se une al oxígeno del carbamato por puentes de hidrógeno, estabilizando así la unión NBPT-ureasa (Manunza y col, 1999).

El tampón fosfato, usado comúnmente en los estudios cinéticos de la ureasa, presenta una inhibición moderada dependiente del pH. Ésta decrece a medida que aumenta el pH hasta detenerse en un pH de 7-7,5, ya que la actividad inhibidora se debe al ión H_2PO_4^- (Krajewska, 2009). El modo de unión del fosfato es similar al del DAP (**Figura 5e**).

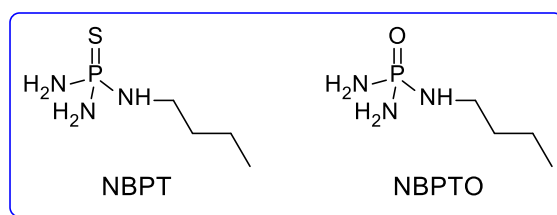


Figura 6. Estructuras de la triamida N-(n-butil) tiofosfórica (NBPT) y de la triamida N-(n-butil) fosfórica (NBPTO).

Los ácidos bórico y borónico son inhibidores que se unen rápidamente a la ureasa (**Figura 5f**), pero son débiles. La máxima inhibición del ácido bórico se observa a pH entre 6 y 9, sugiriendo que su acción es debida a la forma molecular $B(OH)_3$ (Krajewska, 2009).

Se han estudiado muchos otros compuestos como potenciales inhibidores de la ureasa. Entre ellos están los compuestos de origen natural, procedentes principalmente de extractos de plantas y bacterias. Sin embargo, hay pocas investigaciones respecto a estos productos, y la mayoría se enfocan en su uso en terapias médicas contra enfermedades causadas por microorganismos patógenos que dependen de la ureasa, ya que los inhibidores actuales son tóxicos y de baja estabilidad para uso clínico. El problema para su uso en agricultura es que o bien inhiben de forma irreversible a la ureasa, como el dialil tiosulfonato procedente del extracto acuoso del ajo (Modolo y col, 2015), o bien su obtención no resulta económicamente rentable. En este sentido, el desafío consiste en encontrar aquellos que resulten respetuosos con el medio ambiente, que no sean tóxicos, que tengan una alta estabilidad química, que sean eficientes a bajas concentraciones, y, por supuesto, que sean compatibles con la urea y tengan precios competitivos.

1.6. Legislación vigente sobre inhibidores de la ureasa

Los inhibidores de la ureasa que se pueden aplicar combinados con fertilizantes están regulados por la legislación vigente sobre productos fertilizantes. Legislación europea (modificaciones del Reglamento N° 2003/2003): en el Reglamento N° 1107/2008 se aprueba el uso de la triamida N-(n-butil) tiofosfórica (NBPT) como inhibidor de la ureasa, debiéndose añadir un porcentaje mínimo de 0,09% (porcentaje en masa del inhibidor respecto al nitrógeno uréico), y un máximo de 0,20%; en el Reglamento N° 223/2012 se aprueba el uso de la triamida N-(2-nitrofenil) de ácido fosfórico (2-NPT), con un porcentaje mínimo de 0,04% y un máximo de 0,15%; en el Reglamento N° 1257/2014, se aprueba un nuevo producto como inhibidor de la ureasa, resultado de la reacción entre la triamida N-(n-butil) tiofosfórica (NBPT) y la triamida N-(n-propil) tiofosfórica (NPPT), en una relación 3:1, con un porcentaje mínimo de 0,02% y un máximo de 0,3%. Legislación española: en la Orden AAA/2564/2015, que modifica al Real Decreto 506/2013, se aprueba el uso de la monocarbamida dihidrógeno sulfato (MCDHS), como inhibidor de la ureasa, con un porcentaje mínimo de 1% y un máximo de 4%.

2. OBJETIVOS

Para maximizar la eficacia del uso de los fertilizantes uréicos en suelos es importante el conocimiento y control de la actividad ureasa en campo. La legislación vigente sobre fertilizantes recoge varios productos de origen sintético para dicho fin mediante la inhibición de esta enzima. Sin embargo, actualmente existen muy pocos estudios sobre inhibidores de origen natural, que pueden representar una alternativa eficaz, económica y sostenible a los inhibidores de síntesis comercializados.

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Máster es **evaluar la capacidad inhibidora de la actividad ureasa de tres productos de origen natural procedentes del extracto de una levadura (*Candida pulcherrima*) y compararlos con el NBPT.**

Para la consecución de este objetivo se va a seguir el siguiente plan de trabajo:

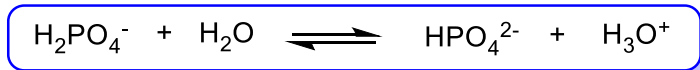
- Estudio de la actividad de la ureasa de “jack bean” (*Canavalia ensiformis*) con la que se va a llevar a cabo el ensayo de inhibición.
- Ensayos de inhibición de la ureasa de “jack bean” con tres productos de origen natural y con el inhibidor comercial triamida N-(n-butil)tiofosfórica (NBPT).
- Ensayos de inhibición de la ureasa de dos suelos básicos de textura franco arenosa con los productos naturales y el NBPT

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos generales

Para los diferentes estudios llevados a cabo en este Trabajo de Fin de Máster se dispone de ureasa de "jack bean" (*Canavalia ensiformis*) tipo III de Sigma, con una actividad específica de 40,318 U·mg⁻¹ para un pH de 7 y una temperatura de 25 °C. La urea es de grado de análisis de Merck. El tampón fosfato se prepara a partir de las cantidades correspondientes de dihidrógeno fosfato de potasio puro y de hidrógeno fosfato de dipotasio trihidratado puro, ambos productos de Panreac. El agua utilizada para preparar todas las disoluciones es agua ultrapura Milli-Q tipo 1, purificada con un equipo Direct-Q 3 de Merck Millipore.

De acuerdo al método descrito por Kot (2001), el tampón fosfato se prepara para una concentración de 50 mM y un pH de 7,2, de acuerdo a las **ecuaciones 3 y 4** correspondientes al equilibrio ácido/base del **Esquema 5**, que tiene una constante de acidez de 6,31·10⁻⁸ (Lindsay, 1979). El tampón fosfato preparado para estos ensayos tiene un pH de entre 7,11 y 7,18, medido con un equipo Orion DUAL STAR™ de Thermo Scientific.



Esquema 5. Equilibrio ácido/base del dihidrógeno fosfato y el hidrógeno fosfato.

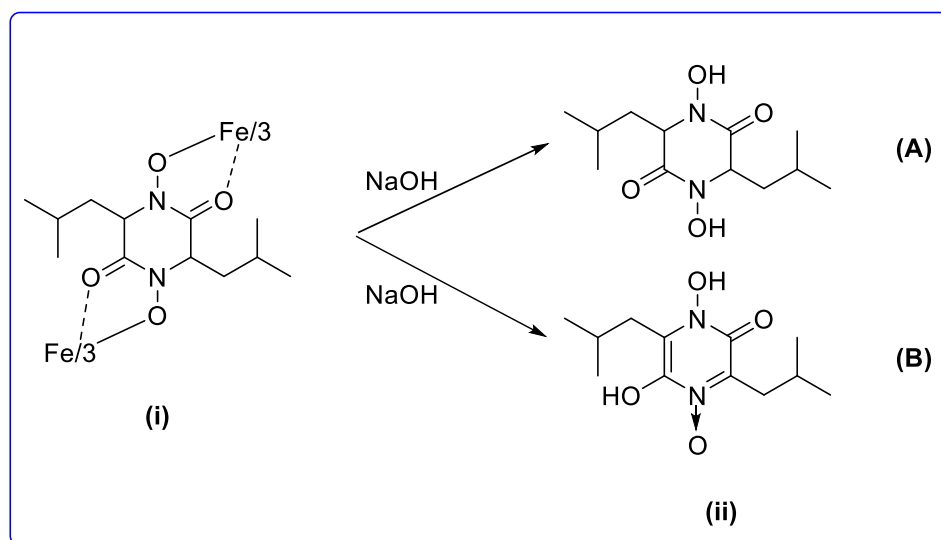
$$\text{pH} = 7,20 + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \quad (3)$$

$$[\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 50 \cdot 10^{-3} \text{ M} \quad (4)$$

Para los ensayos de inhibición, se dispone de triamida N-(n-butil)tiofosfórica, o NBPT, al 97% de J&K Scientific. Igualmente se dispone de tres productos líquidos de color rojizo proporcionados por Fertinagro (**Figura 7**), en adelante Producto 1, Producto 2 y Producto 3, que contienen pulcherrimina, el potencial inhibidor de la ureasa. La estructura de la pulcherrimina propuesta por A.H. Cook (1954) se muestra en el **Esquema 6(i)**. Tras el tratamiento con una base fuerte (NaOH, KOH), se transforma en el ácido pulcherrimínico; Cook mantiene que la estructura de este ácido es como la que se muestra en el **Esquema 6(ii) A**, mientras que J.C. MacDonald (1963) propone la estructura del **Esquema 6(ii) B** como la que mejor se ajusta a los estudios de caracterización del ácido pulcherrimínico llevados a cabo por su grupo de investigación.



Figura 7. De izquierda a derecha, fotografía de los Productos 1, 2 y 3.



Esquema 6. (i) Estructura de la pulcherrimina. **(ii)** Estructura del ácido pulcherrimínico propuesta por **(A)** A.H. Cook y **(B)** J.C. MacDonald.

A continuación se describe el protocolo de purificación, proporcionado por Fertinagro, para obtener el Producto 3:

- Fermentación de la levadura (*Candida pulcherrima*) durante 48 horas.
- Centrifugación a 1500xG durante 5 minutos para eliminar los cuerpos de la levadura y recuperar el sobrenadante.
- Precipitación de la pulcherrimina:
 - Adición de 1% de Cloruro Férrico (10%).
 - Agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 minutos.
 - Centrifugación a 1500xG durante 5 minutos.
 - Descartar el sobrenadante y recuperar el precipitado.
- Lavado del pigmento dos veces con agua destilada: resuspensión y centrifugación.
- Eliminación del hierro sobrante y del pigmento:
 - Resuspensión del pigmento en KOH 2M.
 - Incubación durante 10 minutos.
 - Centrifugación 1500xG durante 5 minutos.
 - Recuperación del sobrenadante y descarte del pellet (hidróxido de hierro). El sobrenadante tiene una apariencia transparente de un color amarillo intenso.
- Equilibrado del pH a 7,8 con ácido clorhídrico concentrado.

El ácido pulcherimínico forma unos precipitados rojizos y pierde totalmente su color amarillo intenso. Si se vuelve a subir el pH se vuelve a solubilizar recuperando el color amarillo intenso.

A partir del Producto 3, concentrado del compuesto de interés, se preparan los productos 1 y 2.

3.2. Actividad ureasa

Inicialmente se prepara una suspensión de ureasa en tampón fosfato de 233 mg·L⁻¹. A medida que avanza el estudio, se va variando la concentración de esta suspensión hasta conseguir la relación óptima entre enzima y sustrato, es decir, la que proporciona la máxima actividad enzimática. Para cada ensayo se preparan matrices de urea de diferente concentración, desde 10 hasta 230 mM, utilizando nuevamente el tampón fosfato como disolvente.

El ensayo se lleva a cabo en tubos de vidrio, realizando tres réplicas por cada muestra. Para las muestras se añaden 10 mL de la matriz correspondiente de urea y 0,1 mL de la suspensión de la enzima. A su vez se preparan dos blancos: el blanco de enzima, al que se le añaden 10 mL de tampón fosfato y 0,1 mL de la suspensión de la enzima, y el blanco de urea, al que se le añaden 10 mL de la matriz correspondiente de urea y 0,1 mL del tampón fosfato (**Tabla 1**).

Inmediatamente después de añadir la suspensión de la enzima o el tampón fosfato, en cada caso, se agitan los tubos con un vortex y se meten en un baño-agitador a 25 °C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se agitan de nuevo los tubos, se toman 0,1 mL de cada uno y se añaden sobre 0,4 mL de KCl 2M previamente añadidos sobre nuevos tubos para detener la reacción enzimática (Paulson y col., 1969). Una vez detenida la reacción, se procede a la determinación del amonio generado.

	Tampón Fosfato	Urea	Enzima Ureasa
<i>Blanco Enzima</i>	✓		✓
<i>Blanco Urea</i>	✓	✓	
<i>Urea</i>	✓	✓	✓

Tabla 1. Esquema de la composición de los tubos de ensayo para los estudios de la actividad enzimática.

Para calcular la cantidad máxima de amonio que se espera que se genere en las condiciones utilizadas se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$U_{\text{ureasa}}/\text{tubo} = m_{\text{ureasa}}(\text{mg})/\text{tubo} \cdot \frac{40,318 \text{ U}}{1 \text{ mg ureasa}} \quad (5)$$

$$n_{\text{NH}_4^+}(\mu\text{mol})/\text{tubo} \cdot \text{min} = U_{\text{ureasa}}/\text{tubo} \cdot \frac{1 \mu\text{mol}_{\text{NH}_4^+}}{1 \text{ U} \cdot \text{min}} \quad (6)$$

$$C_{\text{NH}_4^+}(\text{mM})/\text{tubo} = \frac{n_{\text{NH}_4^+}(\mu\text{mol})}{\text{tubo} \cdot \text{min}} \cdot 30 \text{ min} \quad (7)$$

10,1 mL

3.3. Inhibición de la actividad ureasa

Para el estudio de inhibición, se diluye 1 mL de los productos 1 y 2 a 50 mL con agua Milli-Q. Para el producto 3 se lleva a cabo una dilución mayor ya que se dispone de menos cantidad de producto y es más concentrado: 0,4 mL a 25 mL. Asimismo se preparan disoluciones de NPBT para tener una cantidad en los tubos de 0,09 y 0,20% en masa sobre el nitrógeno uréico, de acuerdo a lo especificado y permitido en la legislación vigente.

La concentración de la suspensión de la enzima así como de la del sustrato se preparan atendiendo a los resultados del ensayo previo: urea 140 mM en agua Milli-Q y ureasa 128 mg·L⁻¹ en tampón fosfato.

Los ensayos se llevan a cabo en tubos de ensayo de vidrio, y se realizan tres réplicas por cada muestra. Para las muestras se añaden 0,5 mL de urea, 4 mL de tampón fosfato 50 mM, 2,5 mL de los productos 1, 2, 3 ó NBPT, y 0,1 mL de la suspensión de la enzima. Se añaden diferentes volúmenes de las disoluciones preparadas de los productos a estudiar, pero siempre llegando a un volumen de 2,5 mL con agua Milli-Q para conservar el volumen final. Para comparar los resultados y ver el porcentaje de inhibición, se incluye un control que lleva todas las disoluciones anteriores menos el inhibidor, que se sustituye por 2,5 mL de agua Milli-Q. A su vez se preparan varios blancos para evitar posibles interferencias de matriz y de procedimiento, llevando los volúmenes finales a 7,1 mL con agua Milli-Q: el blanco de enzima sólo lleva el tampón fosfato y la suspensión de la enzima; el blanco del inhibidor lleva el tampón fosfato, la disolución de urea y la del inhibidor correspondiente; y por último, el blanco de urea, que lleva el tampón fosfato y la disolución de urea (**Tabla 2**).

	Tampón Fosfato	Urea	Inhibidor	Enzima Ureasa
<i>Blanco Enzima</i>	✓			✓
<i>Blanco Inhibidor</i>	✓	✓	✓	
<i>Blanco Urea</i>	✓	✓		
<i>Inhibidor</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Control</i>	✓	✓		✓

Tabla 2. Esquema de la composición de los tubos para los ensayos de inhibición.

Inmediatamente después de añadir la enzima (último reactivo que se añade), se agita el tubo correspondiente con un vortex y se introduce en un baño-agitador a 25 °C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se toman 0,1 mL de cada tubo y se añaden sobre 0,4 mL de KCl 2M previamente añadidos en tubos nuevos, para detener la reacción enzimática. Posteriormente se procede a la determinación del amonio.

3.4. Inhibición de la actividad ureasa en suelos

Se dispone de dos suelos caracterizados previamente por el grupo de investigación y tamizados a 2 mm. Las características físico-químicas de ambos suelos se recogen en la **Tabla 3**.

	Suelo Valencia		Suelo Barcenilla
<i>pH</i> H ₂ O (1:2,5 p/v)	8,01	<i>pH</i> H ₂ O (1:2 p/v)	7,31
<i>pH</i> KCl (1:2,5 p/v)	7,90	<i>pH</i> KCl (1:2 p/v)	7,23
CE (extracto 1:5) (dS·m ⁻¹)	0,26	CE (extracto 1:5) (dS·m ⁻¹)	0,235
Arena	60	Arena	62
Limo	24	Limo	22
Arcilla	16	Arcilla	16
Textura	Franco arenosa	Textura	Franco arenosa
M.O. oxidable (%)	2,1	M.O. oxidable (%)	0,756
N Total (%)	0,14	N Total (%)	0,056
CaCO ₃ Total (%)	10,7	CaCO ₃ Total (%)	8,7
Caliza Activa (%)	3,7	Caliza Activa (%)	1,1
Macronutrientes (meq/100g suelo)		Macronutrientes (meq/100g suelo)	
Ca	6,58	Ca	9,7
Mg	1,21	Mg	0,454
K	1,17	K	0,483
Micronutrientes (mg·Kg ⁻¹)		Micronutrientes (mg·Kg ⁻¹)	
Fe	28,05	Fe	3,21
Zn	6,31	Zn	0,20
Mn	38,99	Mn	2,81
Cu	5,21	Cu	0,92

Tabla 3. Propiedades físico-químicas de los suelos empleados para el ensayo de inhibición en suelos.

Al ser ambos suelos de carácter básico, y ante la posibilidad de que se produzca una precipitación de los fosfatos del tampón con el calcio y perder así la capacidad amortiguadora, se decide usar también tampón borato. Se prepara con tetraborato de disodio decahidratado puro de Merck, para una concentración de 75 mM. Para ello se pesa la cantidad correspondiente y se disuelve en agua Milli-Q templada; una vez disuelto se ajusta el pH con NaOH 0,2 M hasta 9,9. Aunque como se comentó en la introducción el ácido bórico actúa como inhibidor, la máxima inhibición se produce entre pH 6 y 9; por ello se ajusta el pH del tampón borato a 9,9 para evitar interferencias de inhibición debidas al ácido bórico. Se utiliza urea 110 mM ya que se va a añadir

menos volumen de los productos inhibidores, debido a que queda poca cantidad, y así tener la misma concentración de urea que en el ensayo anterior.

Se preparan diluciones en agua Milli-Q de 0,968 mL de los productos 1 y 2, llevados a un volumen final de 25 mL, para mantener la dilución que ha mostrado mayor inhibición en los ensayos previos; no se lleva a cabo el ensayo en suelos con el producto 3 ya que no ha mostrado inhibición de la actividad enzimática y porque no se disponía de más producto. También se prepara una disolución de NBPT para conseguir en los tubos un 0,20% respecto del nitrógeno uréico añadido. Se pesan 2,000 g de suelo en balanza analítica en tubos de plástico de 10 mL, realizándose tres réplicas por cada muestra o blanco. A las muestras se les añaden 0,5 mL de urea, 4 mL del tampón fosfato o del tampón borato y 1 mL de las disoluciones de los productos 1, 2 ó del NBPT. A su vez se preparan los blancos: el blanco de suelo lleva el tampón y el producto 1, 2 ó el NBPT, y además 0,5 mL de agua Milli-Q en sustitución de la urea; y el blanco de la matriz, que lleva la urea, el tampón y el producto 1, 2 o el NBPT, pero sin suelo.

Una vez añadidos todos los reactivos (añadiendo la urea al final), se agitan los tubos con un vórtex y se introducen en un baño de agua a 25 °C durante 2 horas. Tras la incubación, se agitan los tubos nuevamente y se filtra la disolución con un filtro 1238 de Filter-Lab con un tamaño de poro de 20-25 µm. De la disolución filtrada se toman 0,1 mL y se añaden sobre 0,4 mL de KCl 2M previamente añadidos en tubos de vidrio, para detener la reacción. Después se procede a determinar el amonio.

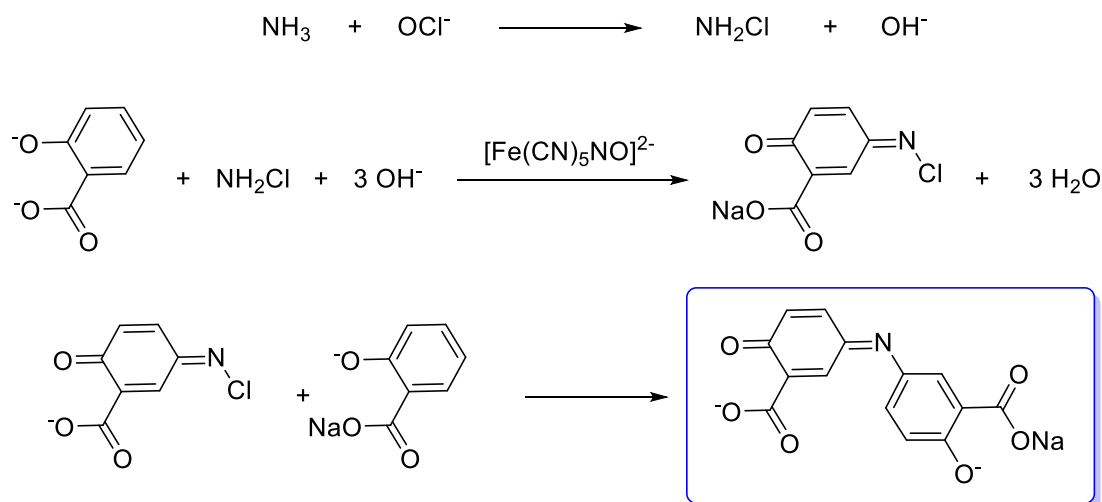
3.5. Determinación de amonio

El amonio generado por la actividad ureasa se determina mediante una variante de la reacción colorimétrica del método de Berthelot (Searle, 1984). Los reactivos utilizados para formar el complejo coloreado se preparan de la siguiente manera:

- Tampón tartrato: se disuelven 5 g de tartrato sódico potásico tetrahidratado (grado de análisis de Panreac), 1,4 g de fosfato disódico dodecahidratado (puro de Panreac) y 2,4 g de hidróxido sódico (grado de análisis de Merck) y se enrasan a 100 mL con agua Milli-Q. El pH de esta disolución es de 13,7.
- Reactivo salicilato: se disuelven 15 g de salicilato sódico (al 99% de Alfa Aesar) y 0,030 g de nitroprusiato sódico dihidratado (puro de Fluka) y se enrasan a 100 mL con agua Milli-Q.
- Solución de hipoclorito sódico: solución de 40 g de cloro activo por litro (de Ash).

A los tubos con las muestras y el KCl se les añade 5 mL del tampón tartrato, 4 mL del reactivo salicilato y 2,5 mL de hipoclorito, necesariamente en ese orden para que aparezca el color. Tras la adición del último reactivo, se agitan los tubos y se meten en un baño de agua a 37 °C durante 30 min, para reducir el tiempo de aparición del color y aumentar la sensibilidad (Rhine y col., 1998).

Se dejan enfriar los tubos a temperatura ambiente y se mide el color azul-verdoso del complejo formado (**Esquema 7**) a una longitud de onda de 654 nm, con un espectrofotómetro V-650 de Jasco.



Esquema 7. Reacción entre el amonio y el hipoclorito para formar cloramina, la cual reacciona con dos moléculas de salicilato en medio básico para formar un complejo de color azul-verdoso. El nitroprusiato, [Fe(CN)₅NO]²⁻, es el catalizador de la reacción.

La curva de calibrado de amonio, ajustada a una recta $y = a + b \cdot x$ por mínimos cuadrados, se prepara a partir de una disolución madre de 55,56 mM de NH₄⁺, preparada con NH₄Cl de grado de análisis de Merck en agua Milli-Q. Las concentraciones de los patrones de amonio van de 0 a 12 mM, y se realizan tres repeticiones del 0.

3.6. Análisis estadístico y expresión de los resultados

Se calcula el promedio de cada conjunto de datos y se restan los blancos correspondientes a cada muestra. Las barras de error correspondientes a los puntos o barras que se muestran en las figuras se corresponden con el intervalo de confianza al 95%.

Los resultados de la actividad ureasa se ajustan mediante la herramienta Solver de Microsoft® Excel a la ecuación de Michaelis-Menten (**ecuación 8**), a partir de la cual se obtienen los valores de K_M y V_{máx}.

$$\frac{\Delta[P]}{\Delta t} = V_{máx} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

El porcentaje de inhibición de los diferentes productos estudiados se expresa de acuerdo a la **ecuación 9**.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{C_{\text{Control}}(\text{mM}) - C_{\text{Inhibidor}}(\text{mM})}{C_{\text{Control}}(\text{mM})} \cdot 100 \quad (9)$$

El nivel de significación del coeficiente de regresión calculado para los ajustes de los ensayos tanto de la actividad ureasa como de inhibición se corresponde con los de la **Tabla 1** del Anexo (Rubin, 2013).

Se comparan los resultados de los ensayos con suelos mediante un análisis de varianza de un factor y las medias fueron separadas mediante el *test* de Duncan con un nivel de significación de $\alpha=0,05$, utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics 22.

Las figuras se han realizado con el programa Excel de Microsoft Office 2015.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad ureasa

Los resultados del ensayo de la actividad ureasa para la primera suspensión de enzima preparada, la correspondiente a $233 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureasa en tampón fosfato, se muestran en la **Figura 8**. De acuerdo a la cantidad añadida, a la actividad específica de esta enzima y al tiempo de incubación, se espera una cantidad máxima de amonio generado de aproximadamente $2,79 \text{ mM}$ (valor teórico). De acuerdo al modelo de Michaelis-Menten al que se han ajustado los datos experimentales, se obtiene una K_M de $22,9 \text{ mM}$ y una $V_{\text{máx}}$ de $0,0919 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$. Si se hubiera alcanzado la velocidad máxima se habría obtenido una cantidad de amonio de $2,76 \text{ mM}$, correspondiéndose con el valor teórico estimado, $2,79 \text{ mM}$. A partir de este punto la velocidad se mantendría constante para cualquier concentración de urea, puesto que se alcanza el punto de saturación de sustrato de la ureasa. Para comprobar que efectivamente se ha alcanzado la velocidad máxima de la reacción, se realiza otro ensayo en el que se disminuye la cantidad de enzima añadida por tubo, manteniéndose las cantidades utilizadas de urea.

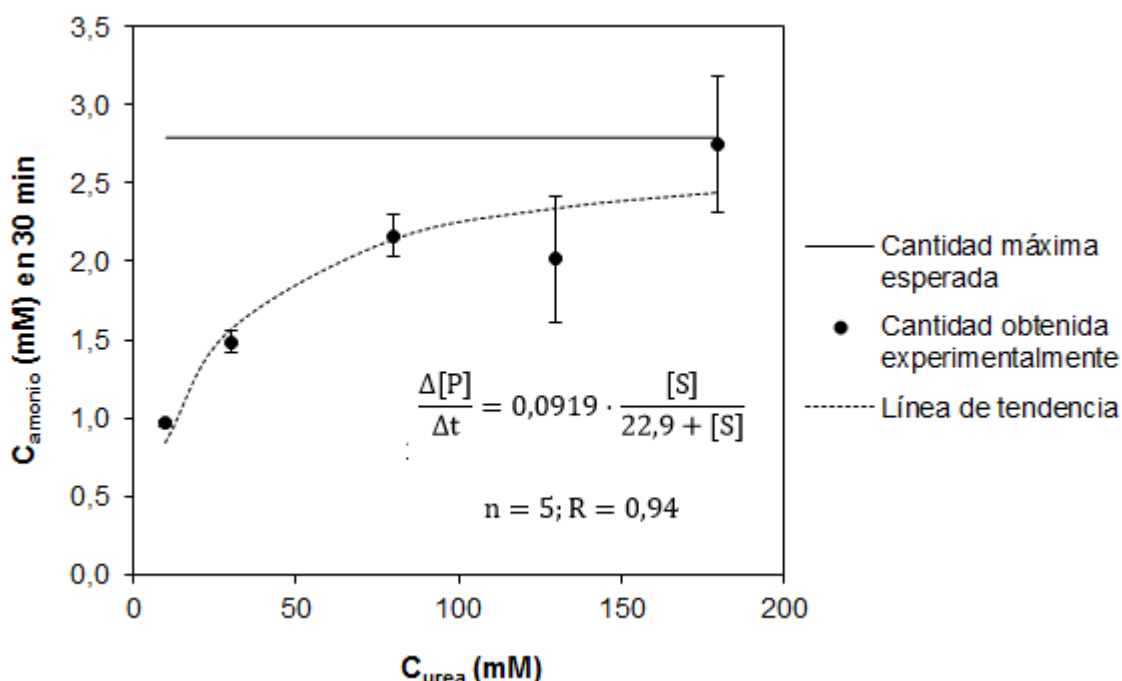


Figura 8. Representación de la concentración de amonio (P) en 30 minutos frente a la concentración de urea (S) para una cantidad de ureasa por tubo de $2,31 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los círculos corresponden a los datos experimentales, donde el error es el intervalo de confianza al 95%. La línea continua representa la cantidad máxima de amonio esperada para las condiciones experimentales. La línea discontinua representa el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten, mostrado en la figura.

En la **Figura 9** se muestran los resultados obtenidos para una suspensión de $127 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureasa en tampón fosfato, es decir, aproximadamente la mitad que en el caso anterior; se espera una cantidad máxima de amonio de aproximadamente $1,52 \text{ mM}$. En este caso, los datos ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten muestran una K_M de $37,3 \text{ mM}$ y una $V_{\text{máx}}$ de $0,0351 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$.

En este caso se espera una cantidad de amonio de 1,05 mM de acuerdo a la velocidad máxima calculada, algo menor que la estimada teóricamente, 1,52 mM. Sin embargo, no sólo no se alcanza esta concentración, sino que el último punto muestra una disminución en la cantidad de amonio, es decir, se aprecia una inhibición enzimática debido a la urea. La inhibición de la actividad de la ureasa a elevadas concentraciones de urea, tal y como describen Singh y Nye (Singh y col., 1984), ya ha sido identificada por numerosos autores como Laidler y Hoare (1949), Kistiakowsky y Rosenberg (1952), Roberge y Knowles (1968).

A diferencia de los resultados del ensayo anterior, aquí no se llega a la cantidad máxima esperada. Existe la posibilidad de que para este ensayo se haya producido una cierta degradación de la enzima durante la realización de este ensayo, ya que ha ocurrido con otros ensayos llevados a cabo previamente por el grupo de investigación; esto puede ser la razón de que la K_M aumente y la $V_{m\acute{a}x}$ disminuya respecto a los valores obtenidos en el ensayo anterior. No obstante, también puede haberse visto afectado ligeramente por el pH del tampón fosfato, que en este ensayo es de 7,11, mientras que el del anterior es de 7,17, y una pequeña variación en el pH puede afectar a la actividad de la ureasa (Singh y col., 1984). La disminución del pH, además, está relacionada con el aumento de la especie $H_2PO_4^-$ en el tampón fosfato, que como ya se comentó en la introducción, tiene un efecto inhibitor leve de la ureasa.

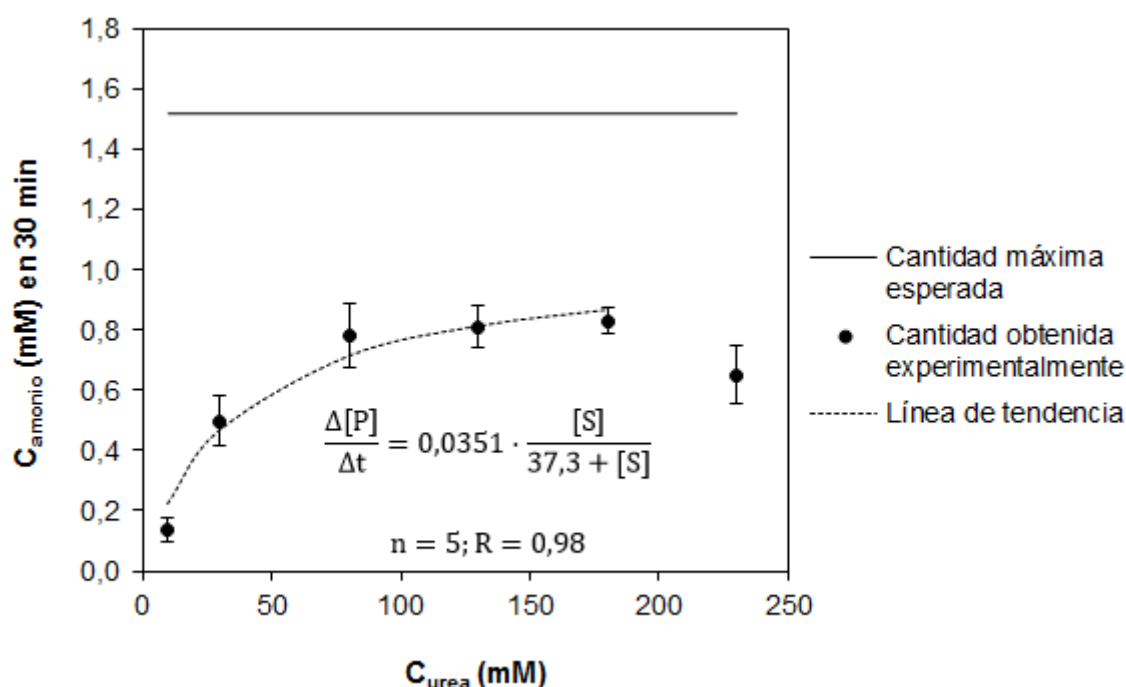


Figura 9. Representación de la concentración de amonio (P) en 30 minutos frente a la concentración de urea (S) para una cantidad de ureasa por tubo de $1,26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los círculos corresponden a los datos experimentales, donde el error es el intervalo de confianza al 95%. La línea continua representa la cantidad máxima de amonio esperada para las condiciones experimentales. La línea discontinua representa el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten, mostrado en la figura, sin incluir el último punto.

Aunque los valores obtenidos de K_M difieren de los valores más comúnmente referenciados para la actividad de la ureasa de “jack bean”, en torno a 1-4 mM (Krajewska, 2009), la actividad enzimática depende en gran medida de numerosos factores como la procedencia de la enzima, la temperatura, el pH, o el tipo y concentración de disolución tampón empleada (Krajewska, 1999).

Conforme a los resultados obtenidos en este ensayo, se determina que la máxima actividad para esta enzima específica y bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, se encuentra en un intervalo de entre 3,8 y 8,5 $g_{urea} \cdot mg^{-1}_{ureasa}$. Para relaciones mayores a 8,5 $g_{urea} \cdot mg^{-1}_{ureasa}$, la reacción enzimática se inhibe por sustrato.

4.2. Inhibición de la actividad ureasa

Una vez esclarecida la actividad de la ureasa de “jack bean” comercial utilizada para estos ensayos, se procede a realizar el estudio de inhibición de los tres productos naturales así como del NBPT como referencia.

4.2.1. NBPT

En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos tras la incubación enzimática para diferentes porcentajes de NBPT respecto del nitrógeno uréico de la disolución. Dichos porcentajes se corresponden con el mínimo y el máximo permitidos por la legislación vigente en lo referente a productos fertilizantes con inhibidores de la ureasa.

	C_{amonio} (mM)	% Inhibición
<i>Control</i>	2,9 ± 0,5	0
<i>0,09% NBPT</i>	0,51 ± 0,03	82
<i>0,20% NBPT</i>	0,35 ± 0,07	88

Tabla 4. Concentración de amonio (mM) con el error estándar y porcentaje de inhibición (%) para el control y muestras con un 0,09% y un 0,20% de NBPT.

Como era de esperar, se muestra un porcentaje de inhibición superior al 80% en las dos cantidades de NBPT estudiadas. Al ser uno de los inhibidores más ampliamente estudiados y utilizados, se va a utilizar como de referencia para cotejar los productos que se van a estudiar a continuación.

4.2.2. Producto 1

En la **Figura 10** se muestran los resultados obtenidos de la incubación enzimática para diferentes volúmenes añadidos de la disolución del Producto 1. Para cantidades menores de 1,0 mL de la dilución 1:50 del Producto 1 se observa una mayor cantidad de amonio que el

control, por lo que, además de no producirse inhibición de la actividad de la ureasa, hay algún interferente que hace que la señal sea más alta. Sin embargo, a partir de 1,0 mL de la dilución del Producto 1 sí se aprecia una inhibición de la actividad de la ureasa, llegando a un máximo de inhibición de un 78% para la máxima cantidad de Producto 1 añadida, correspondiente a 2,5 mL, es decir, 53,3 mL·g⁻¹(urea). Los resultados se han ajustado a una ecuación exponencial con un coeficiente de correlación de 0,994, lo que se corresponde con un nivel de significación del 0,0005; de acuerdo a esta tendencia, se obtendría una mayor inhibición para volúmenes mayores del Producto 1. A pesar de ello, no se llevan a cabo ensayos con mayor cantidad del inhibidor debido al pequeño volumen disponible de los productos a estudiar, y de que el objetivo de estos inhibidores es ralentizar la hidrólisis de la urea para controlar la liberación de amonio, por lo que tampoco es necesario conseguir un 100% de inhibición.

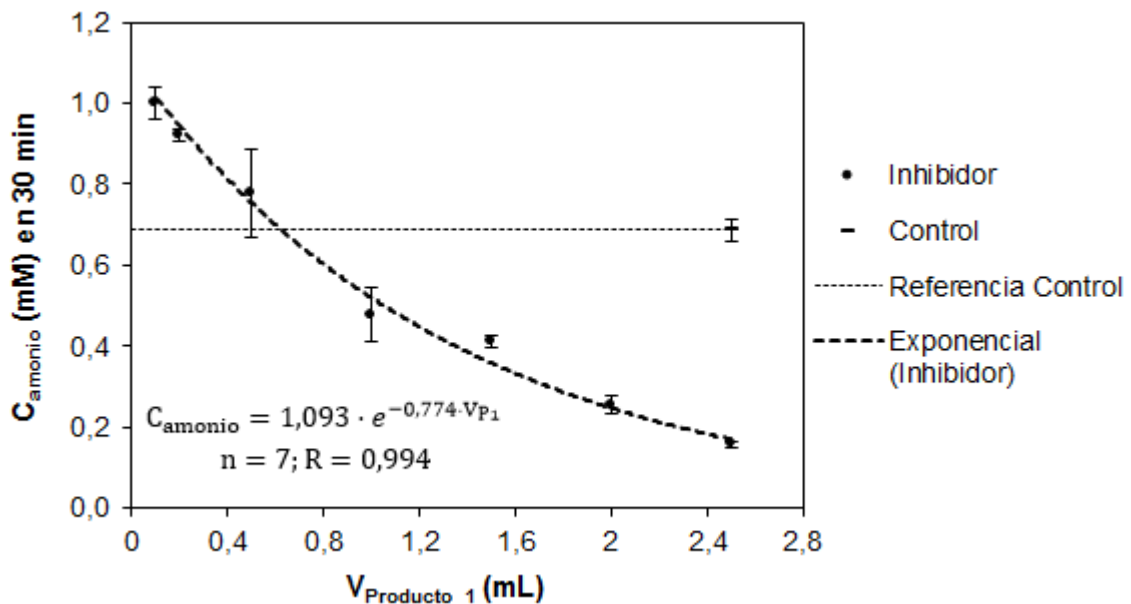


Figura 10. Concentración de amonio frente al volumen añadido de la dilución 1:50 del Producto 1 tras 30 minutos de incubación. También se incluyen los datos del control. Las barras de error se corresponden con el intervalo de confianza al 95% para n=3. Se ha realizado un ajuste exponencial por mínimos cuadrados a los resultados, mostrado en la figura.

4.2.3. Producto 2

En la **Figura 11** se muestran los resultados obtenidos de la incubación enzimática para diferentes volúmenes añadidos de la dilución 1:50 del Producto 2. Al igual que en el caso del Producto 1, se observa una mayor cantidad de señal que la del control para cantidades menores a 0,5 mL de la dilución 1:50 del Producto 2, y a partir de aquí se aprecia una inhibición de la actividad enzimática. El máximo de inhibición, con un 93%, se encuentra para una cantidad de 2,5 mL de la dilución del Producto 2. El ajuste de los datos muestra un coeficiente

de correlación de 0,98, lo que se corresponde con un nivel de significación del 0,0005, menor que el que se observaba para el Producto 1, debido a la mayor variabilidad de los datos. De nuevo, atendiendo a la tendencia de los resultados, parece que se podría llegar a un mayor porcentaje de inhibición al aumentar el volumen del Producto 2.

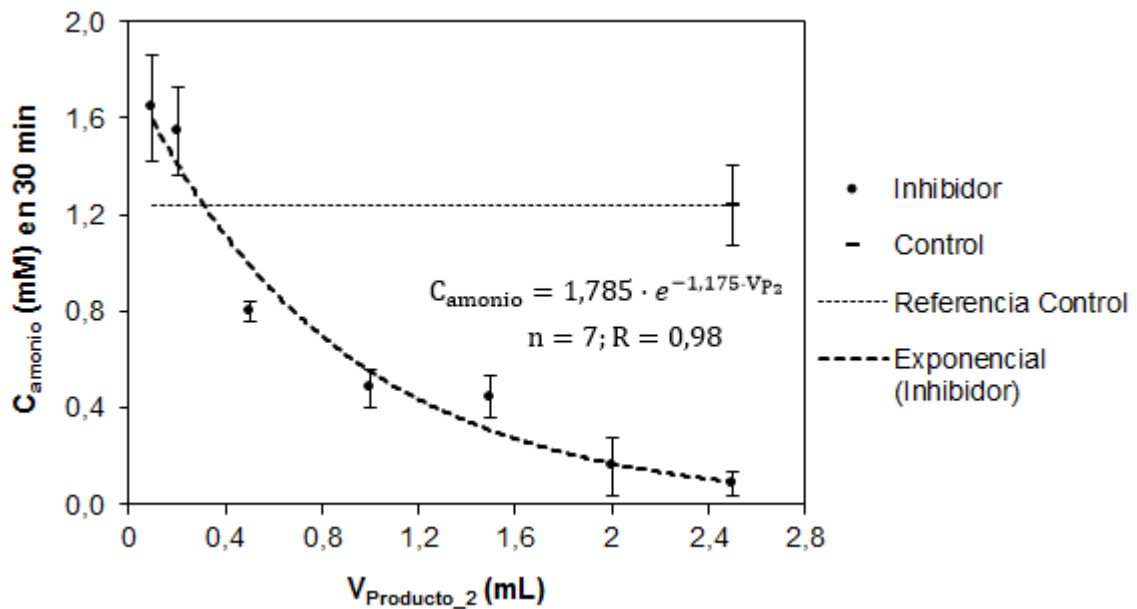


Figura 11. Concentración de amonio frente al volumen añadido de la dilución 1:50 del Producto 2 tras 30 minutos de incubación. También se incluyen los datos del control. Las barras de error se corresponden con el intervalo de confianza al 95% para $n=3$. Se ha realizado un ajuste exponencial por mínimos cuadrados a los resultados, mostrado en la figura.

4.2.4. Producto 3

En la **Figura 12** se muestran los resultados obtenidos de la incubación enzimática para diferentes volúmenes añadidos de la disolución del Producto 3. Se comenzó añadiendo volúmenes pequeños por ser más concentrado que los productos 1 y 2, sin observarse inhibición. Es más, se observa un incremento de la señal de amonio respecto del control, al igual que en los casos anteriores para volúmenes pequeños. Por ello se decidió probar a añadir 2,5 mL de Producto 3, ya que este volumen es el que presenta mejores resultados de inhibición para los productos 1 y 2, nuevamente sin observarse inhibición.

Ante la posibilidad de producirse una inhibición a menores cantidades del Producto 3, debido a su alta concentración, se procedió a llevar a cabo este ensayo (**Figura 13**). Sin embargo, tampoco se observa inhibición con estas cantidades, por lo que finalmente se deduce que este producto no tiene capacidad inhibidora de la actividad ureasa.

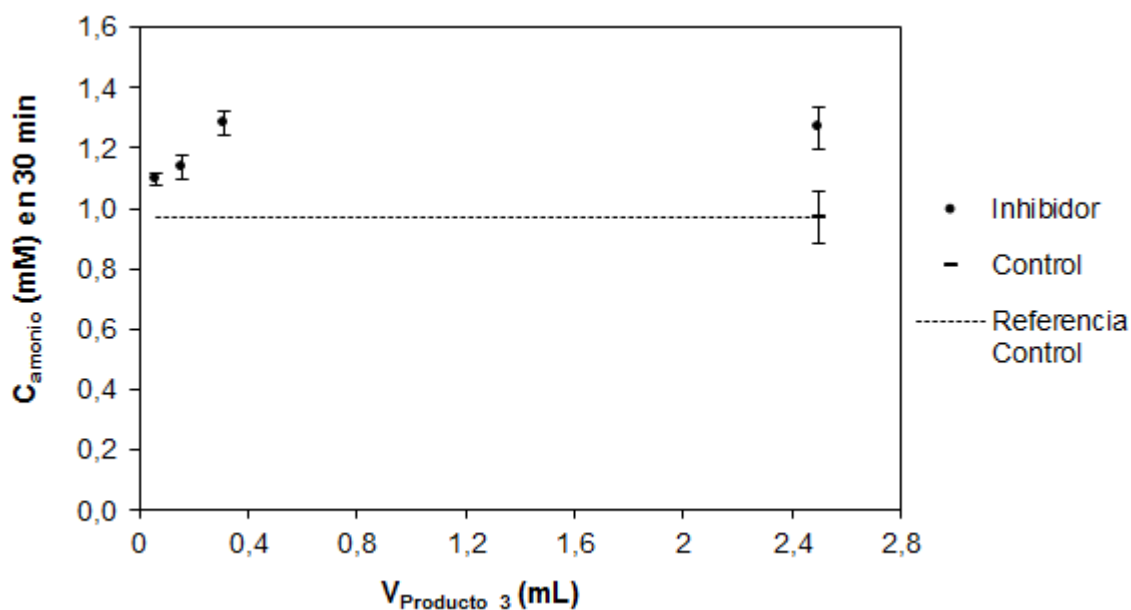


Figura 12. Concentración de amonio frente al volumen añadido de la disolución del Producto 2 tras 30 minutos de incubación. También se incluyen los datos del control. Las barras de error se corresponden con el intervalo de confianza al 95% para n=3.

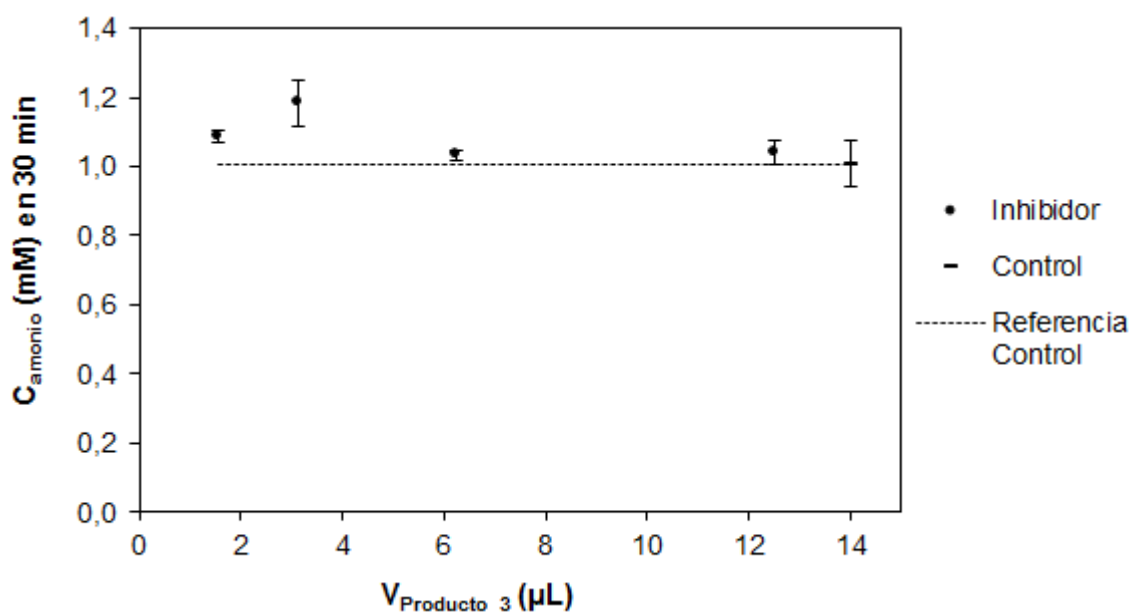


Figura 13. Concentración de amonio frente al volumen añadido de la disolución del Producto 2 tras 30 minutos de incubación. También se incluyen los datos del control. Las barras de error se corresponden con el intervalo de confianza al 95% para n=3.

4.3. Inhibición de la actividad ureasa en suelos

Se procede a estudiar la capacidad inhibidora de la ureasa de los Productos 1 y 2 así como del NBPT, utilizado como referencia, en dos suelos de carácter básico, ya que es en este tipo de suelos donde hay una mayor problemática de pérdidas de nitrógeno por volatilización de amoníaco. Del Producto 3 no se realiza este ensayo debido a que no ha mostrado inhibición en los resultados anteriores. Además durante la realización del ensayo anterior se agotó el producto.

4.3.1. Suelo de Valencia

En la **Figura 14** se muestran los resultados para el ensayo de inhibición de la actividad de la ureasa del suelo de Valencia. Se observa como los tres productos estudiados, los dos provenientes del extracto natural y el NBPT, presentan una inhibición de la ureasa.

Sin embargo, es evidente que el proceso se ve afectado por el tampón que se utiliza durante la incubación, ya que con el tampón fosfato la cantidad máxima de amonio generado, la correspondiente al control, alcanza los $11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, frente a los casi $16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a los que se llega con el tampón borato. Con el suelo de Valencia parece que el tampón borato ofrece mejores resultados de inhibición, llegando con el Producto 2 y el NBPT a una inhibición del 100%, mientras que con el tampón fosfato alcanzan un 73 y un 87% de inhibición, respectivamente. Para ambos tampones, la menor inhibición se produce con el Producto 1. De hecho, el test de Duncan señala que no hay diferencias significativas entre los resultados del control y del Producto 1 para el tampón fosfato, pero sí las hay para el tampón borato, confirmando de nuevo que la incubación ofrece mejores resultados de inhibición para este suelo con el tampón borato que con el tampón fosfato.

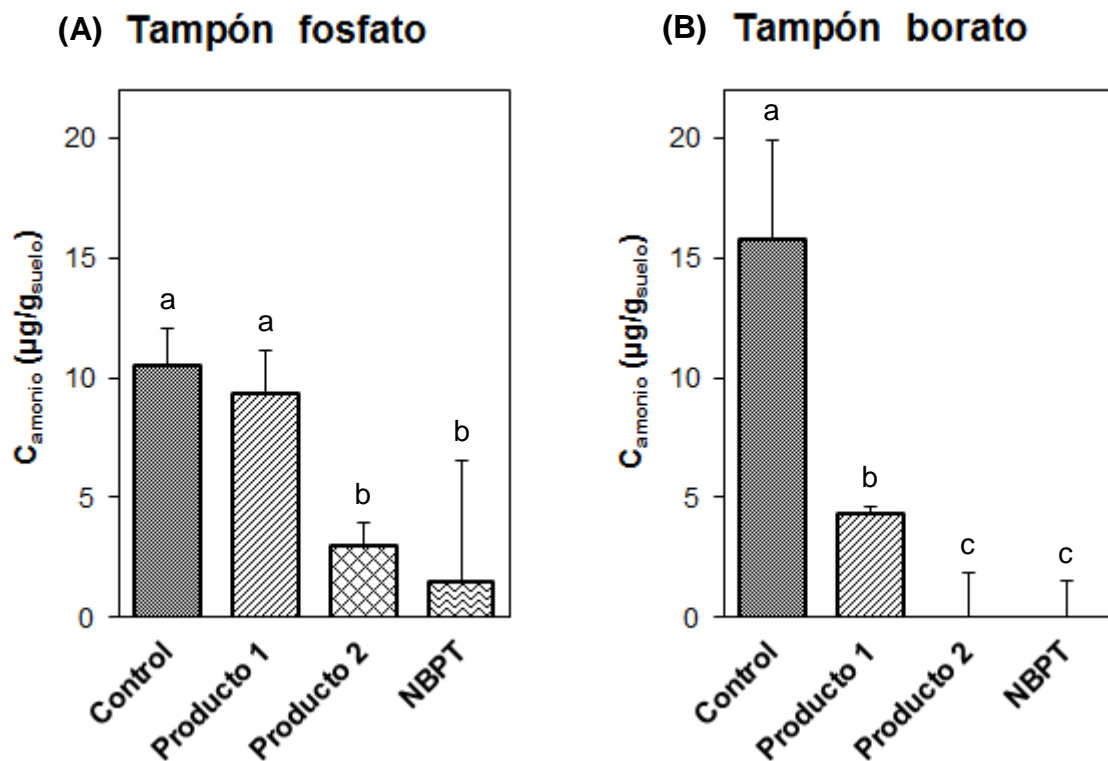


Figura 14. Concentración de amonio en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suelo}}$ para los ensayos de control, Producto 1, Producto 2 y NBPT con el suelo de Valencia. Las barras de error se corresponden con el intervalo de confianza al 95% para $n=3$. Se muestran los resultados para la incubación con **(A)** tampón fosfato y **(B)** tampón borato. Las letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre medias mediante el test de Duncan.

4.3.2. Suelo de Barcenilla

En la **Figura 15** se muestran los resultados para el ensayo de inhibición de la actividad de la ureasa del suelo de Barcenilla.

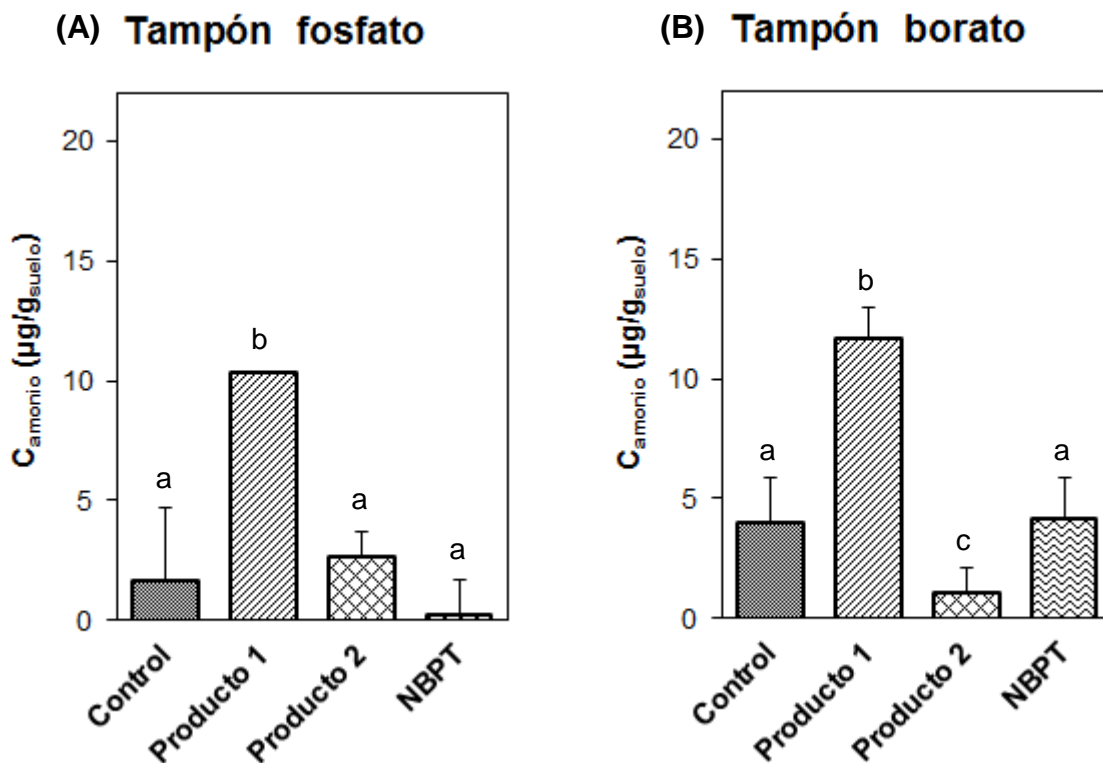


Figura 15. Concentración de amonio en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suelo}}$ para los ensayos de control, Producto 1, Producto 2 y NBPT con el suelo de Barcenilla. Las barras de error se corresponden con el intervalo de confianza al 95% para $n=3$. Se muestran los resultados para la incubación con **(A)** tampón fosfato y **(B)** tampón borato. Las letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre medias mediante el test de Duncan.

Con el tampón fosfato no se aprecian diferencias significativas entre el control, el Producto 2 y el NBPT, pero el Producto 1 difiere significativamente de todos ellos, hecho que se repite con el tampón borato. Como ya se vio que ocurría con la ureasa de “jack bean”, el Producto 1 mostraba más señal que el control para la zona inicial de la curva (**Figura 10**), y parece que en este ensayo se repite este hecho; aunque también es posible que se deba a que el Producto 1 sufre algún tipo de interacción con este suelo.

En cuanto al Producto 2 y al NBPT, aunque no existen diferencias con el control para el tampón fosfato debido a los elevados errores que muestran las repeticiones, parece que con el NBPT la cantidad generada de amonio es algo menor, por lo que podría presentar cierta inhibición.

Finalmente, con el tampón borato el Producto 2 presenta una inhibición de la ureasa de aproximadamente el 70%, ofreciendo los mejores resultados de inhibición para este suelo. Con este tampón el NBPT no presenta diferencias significativas con el control.

Se aprecia claramente que la actividad ureasa de este suelo es muy baja comparada con el suelo de Valencia. Ambos suelos presentan un porcentaje de arcilla del 16%, sin embargo, el suelo de Barcenilla contiene sólo un 0,8% de materia orgánica oxidable frente al 2,1% que contiene el suelo de Valencia. La ureasa del suelo se retiene en las arcillas y en la materia orgánica, y al tener menor cantidad de esta última, el suelo de Barcenilla contiene menos enzima y por tanto la actividad es más baja. Esto también implica que la cantidad de urea añadida puede estar saturando, y por lo tanto inhibiendo, la actividad de la ureasa. De esta forma se complica el estudio de inhibición por los productos de interés.

4.4. Discusión general

Se ha demostrado que los productos 1 y 2 funcionan como inhibidores de la ureasa, pero aún no se ha alcanzado el propósito de relacionar su composición con la efectividad. Es necesario conocer la presencia de la pulcherrimina, de saber cómo actúa con la ureasa y en particular su reacción con el níquel y su degradación en suelos, para determinar plazos de acción.

5. CONCLUSIONES

A raíz de los resultados del presente Trabajo de Fin de Máster se concluye que:

- Los Productos 1 y 2, procedentes del extracto de *Candida pulcherrima*, muestran una inhibición de la ureasa de “jack bean” en condiciones controladas, con unos porcentajes de inhibición comparables a los del NBPT, uno de los inhibidores más utilizados en todo el mundo.
- Los procesos de obtención de los Productos 1 y 2 están directamente relacionados con su capacidad inhibidora.
- Los ensayos con suelos indican que la inhibición puede estar afectada por factores endógenos que habrá que estudiar por separado.

Estos resultados son muy prometedores, y ofrecen una alternativa natural y sostenible a los inhibidores de la actividad ureasa que existen en el mercado. Sin embargo, es necesario profundizar en los ensayos con suelos para ver qué factores afectan a la inhibición con estos productos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Boer J.L., Mulrooney S.B. y Hausinger R.P.**, 2014. Nickel-dependent metalloenzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 544: 142-152.
- Carlini C.R. y Ligabue-Braun R.**, 2016. Ureases as multifunctional toxic proteins: a review. *Toxicon* 110: 90-109.
- Cook A.H. y Slater C.A.**, 1954. Metabolism of Wild Yeasts. I. Chemical Nature of Pulcherrimin. *Journal of the Institute of Brewing* 60: 213-217.
- Creason G.L., Schmitt M.R., Douglass E.A. y Hendrickson L.L.**, 1990. Urease Inhibitory Activity Associated with N-(n-butyl)thiophosphoric triamide is due to Formation of its Oxon Analog. *Soil Biology & Biochemistry* 22 (2): 209-211.
- Dixon N.E., Gazzola C., Blakeley R.L. y Zerner B.**, 1975. Jack bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel? *Journal of the American Chemical Society* 97 (14): 4131-4133.
- Estiu G., Suárez D. y Merz K.M.**, 2006. Quantum Mechanical and Molecular Dynamics Simulations of Ureases and Zn β -Lactamases. *Journal of Computational Chemistry* 27 (12): 1240-1262.
- Follmer C.**, 2008. Review. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 69 (1): 18-28.
- Gianfreda L., De Cristofaro A., Rao M.A. y Violante A.**, 1995. Kinetic behavior of synthetic organo- and organo-mineral-urease complexes. *Soil Science Society of America Journal* 59 (3): 811-815.
- IFADATA.** *International Fertilizer Association*. (<http://ifadata.fertilizer.org/ucSearch.aspx>) (última fecha de consulta: 02-09-2016).
- Karplus P.A., Pearson M.A. y Hausinger R.P.**, 1997. 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned? *Accounts of Chemical Research* 30 (8): 330-337.
- Kot M., Zaborska W. y Orlinska K.**, 2001. Inhibition of Jack Bean Urease by N-(n-butyl) thiophosphoric triamide and N-(n-butyl) phosphoric triamide: Determination of the Inhibition Mechanism. *Journal of Enzyme Inhibition* 16 (6): 507-516.
- Krajewska B.**, 2009. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. *Journal of Molecular Catalysis, B: Enzymatic* 59 (1-3): 9-21.
- Krajewska B. y Wieslawa Z.**, 1999. The effect of phosphate buffer in the range of pH 5.80-8.07 on jack bean urease activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6 (1-2): 75-81.
- Lindsay W.L.**, 1979. Chemical Equilibria in Soils. *Wiley Interscience* 164-165.
- Manunza B., Deiana S., Pintore M. y Gessa C.**, 1999. The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Soil Biology and Biochemistry* 31 (5): 789-796.

- MacDonald J.C.**, 1963. The Structure of Pulcherriminic Acid. *Canadian Journal of Chemistry* 41: 165-172.
- Marangoni A.G.**, 2003. Enzyme Kinetics. A Modern Approach. *Wiley Interscience* 44-49. SI
- Modolo L.V., de Souza A.X., Horta L.P., Araujo D.P. y de Fátima A.**, 2015. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research* 6 (1): 35-44.
- Paulson K.N. y Kurtz L.T.**, 1969. Locus of Urease Activity in Soils. *Soil Science Society of America Proceedings* 33 (6): 897-901.
- Pettit N.M., Smith A.R.J., Freedman R.B. y Burns R.G.**, 1976. Soil urease: activity, stability and kinetic properties. *Soil Biology & Biochemistry* 8 (6): 479-484.
- Rhine E.D., Sims G.K., Mulvaney R.L. y Pratt E.J.**, 1998. Improving the Berthelot Reaction for Determining Ammonium in Soil Extracts and Water. *Soil Science Society of America Journal* 62 (2): 473-480.
- Rubin A.**, 2013. Statistics for Evidence-Based Practice and Evaluation. *Cengage Learning* 214-215.
- Searle P.L.**, 1984. The Berthelot or Indophenol Reaction and Its Use in the Analytical Chemistry of Nitrogen. A Review. *Analyst* 109 (5): 549-568.
- Singh R. y Nye P.H.**, 1984. The effect of soil pH and high urea concentrations on urease activity in soil. *Journal of Soil Science* 35 (4): 519-527.
- Sumner J.B.**, 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. Preliminary paper. *Journal of Biological Chemistry* 69: 435-441.
- Weber M., Jones M.J. y Ulrich J.**, 2008. Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization. *Food and Bioproducts Processing* 86 (1): 43-52.
- Zambelli B., Musiani F., Benini S. y Ciurli S.**, 2011. Chemistry of Ni²⁺ in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis. *Accounts of Chemical Research* 44 (7): 520-530.
- Zerner B.**, 1991. Review. Recent Advances in the Chemistry of an Old Enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry* 19 (1): 116-131.

Anexo

N	Nivel de significación para una cola				
	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0005
5	0,8054	0,8783	0,9343	0,9587	0,9912
6	0,7293	0,8114	0,8822	0,9172	0,9741
7	0,6694	0,7545	0,8329	0,8745	0,9507
8	0,6215	0,7067	0,7887	0,8345	0,9249
9	0,5822	0,6664	0,7489	0,7977	0,8982
10	0,5494	0,6319	0,7155	0,7646	0,8721
11	0,5214	0,6021	0,6851	0,7348	0,8471
12	0,4973	0,5760	0,6581	0,7079	0,8233
13	0,4762	0,5529	0,6339	0,6835	0,8010
14	0,4575	0,5324	0,6120	0,6614	0,7800
15	0,4409	0,5139	0,5923	0,6411	0,7603
20	0,3783	0,4438	0,5155	0,5614	0,6787

Tabla 1. Valores críticos para el coeficiente de correlación, R.