



UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD, BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Aislamiento de inhibidores de la ureasa presentes en un extracto metanólico de raíz de cholla (*Cylindropuntia cholla*) por cromatografía en columna

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

RAÚL ARMANDO GALVÁN GUTIÉRREZ

DRA. DIANA ELINOS CALDERÓN
ASESOR INTERNO

DR. JOSÉ ALBERTO NÚÑEZ GASTÉLUM
ASESOR EXTERNO

INDICE

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 3 |
| Justificación..... | 5 |
| 1. Marco teórico..... | 6 |
| 1.1. Ureasa..... | 6 |
| 1.2. Importancia biomédica..... | 6 |
| 1.3. Inhibición de la ureasa..... | 7 |
| 1.3.1. Tipos de inhibición enzimática..... | 8 |
| 1.3.2. Inhibidores comerciales..... | 8 |
| 1.3.2.1. Ácido acetohidroxámico..... | 9 |
| 1.3.2.2. Fluorofamida..... | 9 |
| 1.4. <i>Cylindropuntia cholla</i> | 10 |
| 1.4.1. Distribución..... | 10 |
| 1.4.2. Descripción..... | 10 |
| 1.4.3. Uso medicinal..... | 11 |
| 1.4.4. Composición fitoquímica..... | 11 |
| 1.4.5. Técnicas cromatográficas para la purificación de sustancias... | 12 |
| 1.4.5.1. Cromatografía en columna..... | 12 |
| 1.5. Hipótesis..... | 14 |
| 1.6. Objetivo general..... | 14 |
| 1.6.1. Objetivos específicos..... | 14 |
| 2. Materiales y métodos..... | 15 |
| 2.1. Recolección de raíces y obtención del extracto..... | 15 |
| 2.3. Evaluación de la actividad enzimática..... | 17 |
| 2.4. Aislamiento del inhibidor de ureasa del extracto de <i>C. cholla</i> ... | 17 |
| 2.5. Capacidad inhibitoria de las fracciones de <i>C. cholla</i> | 17 |
| 2.6. Determinación del tipo de inhibición..... | 18 |



| | | |
|------|---|----|
| 3. | Resultados..... | 19 |
| 3.1. | Evaluación de la actividad enzimática..... | 19 |
| 3.2. | Aislamiento del inhibidor de ureasa..... | 19 |
| 3.3. | Capacidad inhibitoria de las fracciones del extracto de <i>Cylindropuntia cholla</i> | 20 |
| 3.4. | Determinación del tipo de inhibición..... | 20 |
| 4. | Discusión..... | 23 |
| 5. | Conclusión..... | 24 |
| | Bibliografía..... | 25 |



Resumen

Algunos microorganismos patógenos emplean la urea como fuente de nitrógeno, por lo que esta es crucial para su supervivencia y es el motivo por el cual se ha establecido que la presencia de la ureasa es un factor de patogenicidad, ya que su hidrólisis libera amoníaco y bicarbonato, lo que produce respectivamente interferencia en el metabolismo de la glucosa y el oxígeno, daños en la superficie celular, así como cambios en la acidez al incrementar el pH.

Este tipo de microorganismos patógenos al producir infecciones bacterianas en el estómago produce gastritis crónica y a largo plazo se le ha relacionado con la aparición de adenocarcinomas. En el caso de infecciones en las vías urinarias, ocasiona la formación de urolitos por precipitación de los minerales al combinarse el amoníaco con el magnesio (estruvita) o con el calcio (carbonato de calcio).

Debido a que la ureasa no se encuentra presente en el organismo humano, su inhibición puede ser utilizada para tratamiento de infecciones ocasionadas por microorganismos dependientes de la urea.

Los inhibidores de la ureasa que se encuentran actualmente disponibles presentan múltiples efectos secundarios y presentan baja estabilidad, se usan en combinación con antibióticos, pero el surgimiento de resistencias a la antibioticoterapia aunado a las desventajas de dichos inhibidores hace necesaria la búsqueda de inhibidores entre los metabolitos secundarios de las plantas, los cuales se caracterizan por ser menos tóxicos.

La planta *Cylindropuntia cholla* es una cactácea que es utilizada en la medicina tradicional como tratamiento empírico para los dolores de estómago y piedras de la orina. Se ha demostrado que los extractos metanólicos de la raíz de *C. cholla* tienen



actividad antiureasa en estudios de cinética enzimática lo que demuestra su eficacia como agente terapéutico.

Es necesario realizar la separación de los compuestos que tienen actividad anti-ureasa en el extracto metanólico de la raíz, para seleccionar aquellos con actividad inhibitoria y que son susceptibles de ser utilizados en el tratamiento de infecciones de microorganismos dependientes de la ureasa.



Justificación

La presencia de ureasa es un factor de patogenicidad en las bacterias que disminuye la eficacia terapéutica de los antibióticos en algunas enfermedades infecciosas, llegando incluso a producir cálculos en las vías urinarias, lo que dificulta la erradicación bacteriana.

Se han desarrollado inhibidores de la ureasa, y se ha observado una mejoría en la respuesta terapéutica a los antibióticos cuando se usan en conjunto con inhibidores de la ureasa, pero estos últimos tienen la desventaja de ser inestables, tener múltiples efectos secundarios.

Existen reportes de que metabolitos secundarios de las plantas son los responsables de la eficacia terapéutica de la medicina herbolaria, misma que suele tener menos efectos secundarios que los fármacos de síntesis.

Disponer de fitoquímicos con actividad anti-ureasa eficaces y de bajo costo permite hacer económicamente más accesible el tratamiento de enfermedades en los que la actividad de la ureasa tiene un efecto significativo en el metabolismo bacteriano. La separación de los compuestos que tienen actividad anti-ureasa en el extracto de *C. cholla* permite seleccionar aquellos que tienen mayor actividad inhibitoria, susceptibles de ser utilizados en el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano dependientes de la ureasa.

1. Marco teórico

1.1. Ureasa

Es la enzima clave en el ciclo del nitrógeno, se descubrió en las plantas (Modolo *et al.*, 2015), y fue la primera proteína en ser cristalizada hacia 1926 por James Sumner, a partir de lo cual se postuló que todas las enzimas son proteínas (Nelson y Cox, 2013). La ureasa se encuentra presente en bacterias, algas, hongos y plantas, si bien con diferentes secuencias aminoacídicas, cumplen con la misma función, al hidrolizar la urea a dos moléculas de amoníaco y una de dióxido de carbono (Núñez-Gastélum *et al.*, 2016), véase la figura 1.

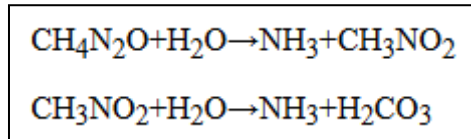


Figura 1. Se ilustra la catálisis de la urea, imagen obtenida de Rutherford, 2014.

1.2. Importancia biomédica

La urea se genera como resultado del catabolismo de los aminoácidos. Los seres humanos no poseen la enzima ureasa, por lo que la urea se desecha del organismo como producto final. Hay varios tipos de microorganismos (bacterias y hongos) algunos de ellos patógenos, que utilizan la urea como fuente de nitrógeno, por lo que la ureasa es crucial para su supervivencia y patogenicidad (Salehi, 2018) por este motivo por el cual se considera que la ureasa es un factor de patogenicidad en ellos. La liberación del amoníaco y bicarbonato por parte de la ureasa produce cambios locales en el pH disminuyendo la acidez (Rutherford, 2014).

Aunado a esto, el amoníaco es tóxico para la célula debido a que interfiere en el metabolismo de la glucosa y el oxígeno, además de originar daños en la superficie celular (Williams, 2006).



Este tipo de microorganismos patógenos produce infecciones bacterianas en el estómago, la infección en forma crónica está relacionada con la aparición de adenocarcinomas gástricos (Salehi, 2018). En las vías urinarias, las principales infecciones bacterianas se caracterizan por ser productoras de ureasa y ocasionan la formación de urolitos por precipitación de los minerales al combinarse el amoníaco con el magnesio (estruvita) o con el calcio (carbonato de calcio) (Johnson *et al.*, 1993).

La respuesta celular a la infección por parte de los macrófagos convierte la arginina a ornitina y urea, lo que incrementa aún más los niveles locales de urea. Los cambios en el pH ocasionados por la ureasa reducen la acidificación y maduración de los fagolisosomas en las células con capacidad de fagocitosis, perdiendo su capacidad de eliminar a los microorganismos a través de este mecanismo (Rutherford, 2014).

Algunos ejemplos de microorganismos patógenos son: *Helicobacter pylori*, que es el principal causante de gastritis crónica, úlceras y algunos tipos de cáncer (González-Cantú, 2014) es interesante conocer que casi la mitad de la población a nivel mundial se encuentra colonizada por esta bacteria, y que solamente el 20% presenta sintomatología clínica (Salehi, 2018); *Proteus mirabilis* que ocasiona infecciones en las vías urinarias, y es responsable de la producción de urolitos que contienen estruvita, se le atribuyen del 10 al 20% de las urolitiasis (Johnson *et al.*, 1993).

1.3. Inhibición de la ureasa

Debido a que la ureasa no se encuentra presente en el organismo humano, su inhibición puede ser utilizada como coadyuvante en el tratamiento de infecciones ocasionadas por microorganismos dependientes de la urea.



1.3.1. Tipos de inhibición enzimática

Las enzimas pueden ser inhibidas por compuestos similares al sustrato con el que compiten para unirse al sitio activo (inhibición competitiva). Otros compuestos modifican el sitio activo al unirse en forma covalente con los aminoácidos (inhibición no competitiva). Existe un tercer tipo de inhibición enzimática (acompetitiva) que se une al complejo enzima-sustrato y que impide la formación de los productos (Campbell, 2006).

1.3.2. Inhibidores comerciales

El desarrollo de inhibidores de la ureasa ha sido difícil porque el sitio activo no se encuentra fácilmente accesible, además de ser altamente específico. La búsqueda de inhibidores se ha centrado en el sitio activo (inhibición competitiva) utilizando sustancias estructuralmente similares al sustrato, desafortunadamente no se han podido obtener resultados satisfactorios. La inhibición acompetitiva puede ser utilizada para diseñar o buscar nuevos tipos de inhibidores debido a que es un área de oportunidad relativamente inexplorada (Yang *et al.*, 2018).

Entre los agentes farmacológicos disponibles se encuentran los fosfodiamidatos (véase imagen A de la figura 2), y los derivados del ácido acetohidroxámico (véase la imagen B de la figura 2), los cuales al ser tóxicos y con baja estabilidad, no se usan en forma frecuente. Por esta razón es necesario buscar nuevos inhibidores de la ureasa, que tengan una mayor estabilidad y una menor toxicidad (Modolo *et al.*, 2015).

Se han realizado múltiples estudios *in vitro*, *in vivo* e incluso ensayos clínicos, en los que se ha comprobado la eficacia de agentes antibacterianos procedentes de partes de plantas, extractos enriquecidos de plantas y aún de moléculas bioactivas purificadas, en los que la actividad inhibitoria varía de concentraciones desde 1.56 a 100,000 µg/mL, de tal manera que se ha observado incluso una inhibición

completa de la colonización por *H. pylori* lo que equivale al potencial terapéutico de un antibiótico (Salehi, 2018)

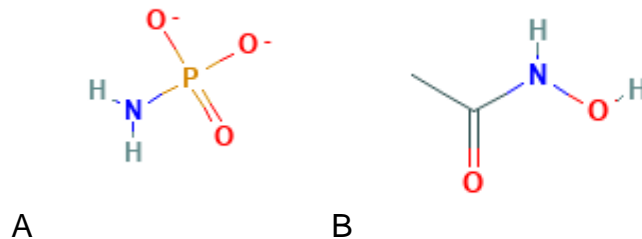


Figura 2. Se muestran las estructuras químicas del fosfodiamidato (A) y del ácido acetohidroxámico (B) (Pubchem, 2019).

1.3.2.1. Ácido acetohidroxámico

Es el único inhibidor de la ureasa que ha sido aprobado para ser utilizado clínicamente que si bien no es comercializado en México, es utilizado en otros países para disminuir y limitar la formación de urolitos causados por infecciones urinarias. Su uso se encuentra limitado por sus efectos secundarios, entre los que se encuentran: síntomas psicológicos, neurológicos, tegumentarios y musculares. La reducción de estos efectos secundarios se ha logrado al bajar la dosis y combinar este fármaco con antibióticos, teniendo como desventaja en surgimiento de resistencia a los antibióticos (Hassan y Šudomová, 2017).

1.3.2.2. Fluorofamida

Las pruebas clínicas en animales han mostrado que tiene un efecto potente *in vivo*, pero no ha sido aprobada aún para su uso clínico porque se hidroliza rápidamente con los jugos gástricos (Pope *et al.*, 1998).

1.4. *Cylindropuntia cholla*

1.4.1. Distribución

Cylindropuntia cholla es una cactácea, de la cual no se cuenta con datos sobre la región de origen, pero que se encuentra distribuida tanto en Norteamérica como en Sudamérica. En nuestro país se distribuye en la región norte (véase la figura 3), particularmente en los estados de Sonora y las Bajas Californias (Vera, 2016).



Figura 3. Muestra la distribución geográfica de *Cylindropuntia cholla* (Vera, 2016)

1.4.2. Descripción

Semejante a un árbol, alcanza hasta los tres metros de alto, su tronco y tallos tienen espinas y alcanzan hasta los quince centímetros de diámetro (figura 4). Posee raíces poco profundas pero extensas que se encuentran asociadas a bacterias nitrificantes que le proporcionan el nitrógeno que capturan del aire (Zarate-Velázquez, 2018).



Figura 4. Aspecto macroscópico de *Cylindropuntia cholla* (Vera, 2016)

1.4.3. Uso medicinal

En Sonora se usa el jugo, la cáscara y la pulpa de la fruta, además de la raíz de la planta. Se emplea para tratar el dolor de riñones (mal de piedra), en este caso se hierve la raíz y se toma un vaso tres veces al día hasta que desaparezca el dolor. También se utiliza para curar la disentería en estos casos se consume el fruto previamente asado, diariamente, hasta que se quite la enfermedad (BDMTM, 2009).

1.4.4. Composición fitoquímica

No hay estudios específicos dirigidos a la planta de *Cylindropuntia cholla*, pero la información disponible indica que en la raíz se encuentran alcaloides (isoquinolina) y compuestos adicionales; tales como: la mescalina, tiramina, 3-metoxi-tiramina, cumarinas, glucósidos y taninos (Núñez-Gastélum *et al.*, 2016).

Todos estos compuestos son relevantes, en el caso de la isoquinolina, toda vez que algunos derivados de esta tienen un efecto anti-ureasa (Alamzeb *et al.*, 2018). De la misma manera compuestos tales como la tiourea procedente de la tiramina presentan un efecto inhibitorio de la ureasa en forma no competitiva (Khan, 2017). En relación con las cumarinas, estas producen una inhibición enzimática dual de la



ureasa y de la anhidrasa carbónica (Parada-Contreras, 2016). Por otra parte, también se ha demostrado que los taninos tienen un efecto anti-ureasa (Márquez-Lara y Suárez-Londoño, 2008).

Los estudios realizados recientemente demuestran que el extracto metanólico de la raíz de *C. cholla* tiene una actividad anti-ureasa a través de una inhibición no competitiva (Nuñez-Gastélum *et al.*, 2016). También se detectó la presencia de fenoles simples y complejos en dicho extracto (Zarate-Velázquez, 2018).

1.4.5. Técnicas cromatográficas para la purificación de sustancias

Es un método de separación que se aplica en todas las áreas de la ciencia, fue inventada por el botánico ruso Mikhail Tswett, para separar pigmentos vegetales al hacerlos pasar por una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, al observar la separación de los pigmentos en bandas coloreadas bautizó al método como cromatografía (Skoog, 2008). Esta técnica se perfecciona continuamente, por lo que se desarrollan nuevas técnicas que permiten la separación e identificación de los componentes que se encuentran presentes en mezclas complejas. La separación se realiza a través de dos fases, una de ellas, la fase móvil que puede ser gas o líquido, en donde se disuelve la muestra que pasa a través de la fase estacionaria, inmisible y fija en una columna o superficie sólida. Las fases utilizadas se eligen para que los componentes de la muestra se distribuyan en grados distintos entre ambas fases, al desplazarse la fase móvil sobre la estacionaria. La configuración de los cromatógrafos puede ser en columna o en placa (Skoog, 2008).

1.4.5.1. Cromatografía en columna

En este tipo de cromatografía la columna consiste en un tubo angosto que se encuentra relleno de un sólido inerte, que mantiene a la fase estacionaria en su superficie. La fase móvil se mueve entre los espacios abiertos entre las partículas del material de empaque de tal manera que los componentes de la muestra se van



separando de acuerdo con sus características físicas y químicas. Además de la separación, es posible realizar una identificación cualitativa y determinar en forma cuantitativa los componentes que han sido separados (Skoog, 2008).

Uno de los métodos de cromatografía más versátiles es la cromatografía de gel de exclusión por tamaño Sephadex G-25, que fue desarrollada por Porath y Flodin hacia 1959, en la que se utiliza un gel de Dextrano que tiene porosidades que varían de 20 a 300 micras (Porath y Flodin, 1959). El cual tiene propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas y es utilizado ampliamente para la separación de metabolitos secundarios de los extractos de plantas de la medicina tradicional china, con el que se pueden utilizar una gran variedad de solventes, los cuales se muestran en la figura 5 (GE, 2014).

| Solvent | Approx. bed volume (ml/g dry Sephadex LH-20) |
|-----------------------------------|---|
| Dimethyl sulfoxide | 4.4 to 4.6 |
| Pyridine | 4.2 to 4.4 |
| Water | 4.0 to 4.4 |
| Dimethylformamide | 4.0 to 4.4 |
| Methanol | 3.9 to 4.3 |
| Saline | 3.8 to 4.2 |
| Ethylene dichloride | 3.8 to 4.1 |
| Chloroform* | 3.8 to 4.1 |
| Propanol | 3.7 to 4.0 |
| Ethanol [†] | 3.6 to 3.9 |
| Isobutanol | 3.6 to 3.9 |
| Formamide | 3.6 to 3.9 |
| Methylene dichloride | 3.6 to 3.9 |
| Butanol | 3.5 to 3.8 |
| Isopropanol | 3.3 to 3.6 |
| Tetrahydrofuran | 3.3 to 3.6 |
| Dioxane | 3.2 to 3.5 |
| Acetone | 2.4 to 2.6 |
| Acetonitrile [‡] | 2.2 to 2.4 |
| Carbon tetrachloride [‡] | 1.8 to 2.2 |
| Benzene [‡] | 1.6 to 2.0 |
| Ethyl acetate [‡] | 1.6 to 1.8 |
| Toluene [‡] | 1.5 to 1.6 |

* Containing 1% ethanol.

[†] Containing 1% benzene.

[‡] Solvents that give a bed volume of less than 2.5 mg/ml dry Sephadex LH-20 are not generally useful.

Figura 5. Solventes para uso en cromatografía en columna de Sephadex-G25 (GE, 2014).

1.5. Hipótesis

El empleo de una columna cromatográfica empacada con Sephadex-G25 permitirá la obtención de una fracción purificada de los componentes del extracto de raíz de *C. cholla* con actividad anti-ureasa.

1.6. Objetivo general

Obtener una fracción purificada de los compuestos anti-ureasa presentes en el extracto de la raíz de *Cylindropuntia cholla* mediante cromatografía en columna con Sephadex-G25.

1.6.1. Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones cromatográficas para la obtención de la fracción purificada de los componentes anti-ureasa del extracto metanólico de *C. cholla*.
- Determinar el efecto de las fracciones purificadas sobre la actividad de la ureasa mediante espectrofotometría.

2. Materiales y métodos

2.1. Recolección de raíces y obtención del extracto

Se recolectaron raíces de *Cylindropuntia spp* mediante excavación, se lavaron con agua para retirar la tierra, se cortaron en trozos y se dejaron secar a temperatura ambiente. En el diagrama de bloques de la Figura 6 se muestra en forma general la metodología seguida para la realización de este proyecto.

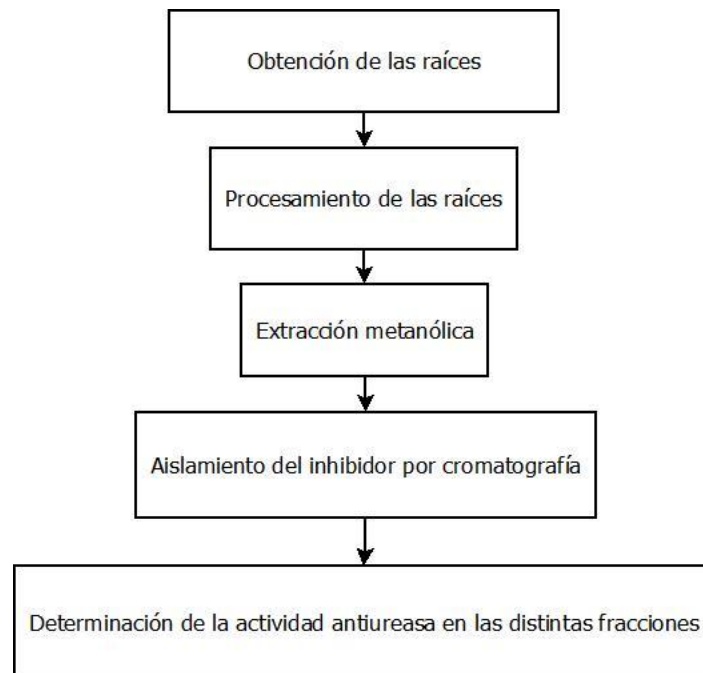


Figura 6. Esquema general de la metodología.

Las raíces fueron trituradas en un homogeneizador comercial de alimentos (Nutribullet®, mod. original). El extracto se obtuvo con 10 g de la raíz agregando 100 mL de metanol acuoso (99.95%, CTR®) al 80%, sonicando (Branson®, mod. 5800) por 30 min a 40 kHz, y centrifugando (IEC Mod. HN-SII). El sobrenadante obtenido se sometió a roto-evaporación (BUCHI®, mod. R-3) para eliminar el metanol y reducir el volumen de agua.

Posteriormente, se colocó el extracto de las raíces en tubos Falcon de 50 mL y se congelaron en el ultracongelador (Thermo Scientific®, mod. EXF32086D) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

por 24 h. Después, las muestras se colocaron en el liofilizador (Labconco®, mod. 7754012L) durante dos días.

2.2. Obtención de ureasa a partir de semillas de *Citrullus vulgaris*

Se obtuvieron las semillas a partir de sandías, las cuales fueron lavadas con agua para retirar restos de la pulpa y secadas durante tres días a temperatura ambiente. Se obtuvo la ureasa a partir de las semillas utilizando el método de Lorenc (2008), por lo que se dejaron remojando 20 g de semillas en 200 mL de agua destilada durante la noche. Posteriormente, fueron trituradas en un homogeneizador comercial de alimentos (Nutribullet, mod. original) empleando 200 mL de agua milliQ (para todo procedimiento donde no se especifique otra cosa se empleó este tipo de agua), se filtró y se almacenó el filtrado obtenido en un recipiente de vidrio en refrigeración a 4 °C.

Se verificó que el extracto crudo de enzima presentara actividad de ureasa. Específicamente, se colocaron 0.25 mL de medio de reacción (MES 1 mM, NaCl 100 mM y rojo de fenol 10 μ M a pH 6.8), 0.05 mL de urea (5 mM) y 0.05 mL del extracto de ureasa en un tubo, finalmente se adicionó agua destilada hasta completar un volumen de 3 mL. Se observaron los tubos de ensayo para detectar cambios de coloración y se realizó la medición del pH con un potenciómetro (Orión, 420A).

2.3. Evaluación de la actividad enzimática

Se midió la actividad de la ureasa realizando una curva de saturación, al exponerla a diferentes concentraciones (0-10 mM) de sustrato (urea). Se utilizaron 150 μ L de medio de reacción y un volumen constante de 10 μ L del extracto crudo de enzima de *Citrullus vulgaris*, se agregó agua hasta alcanzar un volumen final de 300 μ L. Se determinó la absorbancia en un lector de microplaca (BIO-RAD modelo XMark) a



558 nm. Se graficaron los resultados obtenidos en forma de doble recíproco para obtener los parámetros cinéticos (Champe, 1994).

2.4. Aislamiento del inhibidor de ureasa del extracto de *C. cholla*

Las fracciones del extracto se obtuvieron por medio de la técnica de cromatografía en columna, la fase estacionaria fue Sephadex-G25. La preparación de la fase estacionaria se realizó mezclando 10 g en 50 mL de agua en un vaso de precipitado hasta formar una suspensión, luego se agregan 50 mL más de agua. La suspensión de Sephadex-G25 se introduce a la columna deslizando por la pared interna de la columna para evitar que atrapar aire. Luego se estandarizó la columna con usando agua como fase móvil y una bomba de HPLC (GBC mod LC1150) para generar un flujo controlado. Luego 31 mg del extracto concentrado de la raíz de *C. cholla* se disolvieron en 1 mL de agua, verificando que no existieran partículas insolubles. Se agregó la mezcla a la columna y se eluyeron los componentes con un flujo de 1 mL/min usando cuatro combinaciones para la fase móvil: agua (F1) y agua:etanol en proporciones de 25:75 (F2), 50:50 (F3) y 75:25 (F4). Se recolectaron 4 fracciones de 100 mL que se sometieron a destilación a baja presión (BUCHI®, mod. R-3) para eliminar etanol y reducir el volumen de agua.

2.5. Capacidad inhibitoria de las fracciones de *C. cholla*

Se verificó el efecto inhibitorio sobre la ureasa del extracto crudo de *C. cholla* y de las distintas fracciones obtenidas. Se usaron 150 µL de medio de reacción, 30 µL de urea (8 mM), 10 µL del extracto crudo de enzima de *Citrullus vulgaris* y 100 µL de extracto y/o fracción, al final se agregó agua hasta alcanzar un volumen final de 300 µL. Se midió la absorbancia en un lector de microplaca (BIO-RAD modelo XMark) a 558 nm. Se calculó la velocidad inicial que presentó la enzima y a partir de ésta el porcentaje de inhibición de acuerdo con la Ecuación 1:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(V_o \text{ blanco react} - V_o \text{ fracción n}^\circ X)100}{V_o \text{ blanco react}} \quad \text{Ecuación 1}$$



En donde:

V_o blanco react = Velocidad inicial de la ureasa sin presencia de inhibidor

V_o fracción nº X = Velocidad inicial de la ureasa en presencia de cada fracción

2.6. Determinación del tipo de inhibición

Al identificar la fracción con mayor efecto inhibitorio, se realizaron cinéticas enzimáticas bajo las mismas condiciones utilizadas para evaluar la actividad de la ureasa. Solo que en esta ocasión se usó la fracción (100 μ L) con mayor inhibición y se midió la absorbancia a 558 nm. A partir de los datos obtenidos se realizó un gráfico de doble recíproco a través del cual se determinó el tipo de inhibición.

3. Resultados

3.1. Evaluación de la actividad enzimática

La ureasa tiene una reacción de primer orden cuando el sustrato se encuentra a bajas concentraciones, es decir, la velocidad en la formación del producto es directamente proporcional a la concentración del sustrato. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración de la urea se llega al punto en donde la cinética enzimática es del orden cero, esto es causado por la saturación de la enzima con el sustrato. La gráfica de Michaelis-Menten (véase la figura 3.1) nos muestra el comportamiento de la enzima al incrementarse la concentración del sustrato formando una curva hiperbólica.

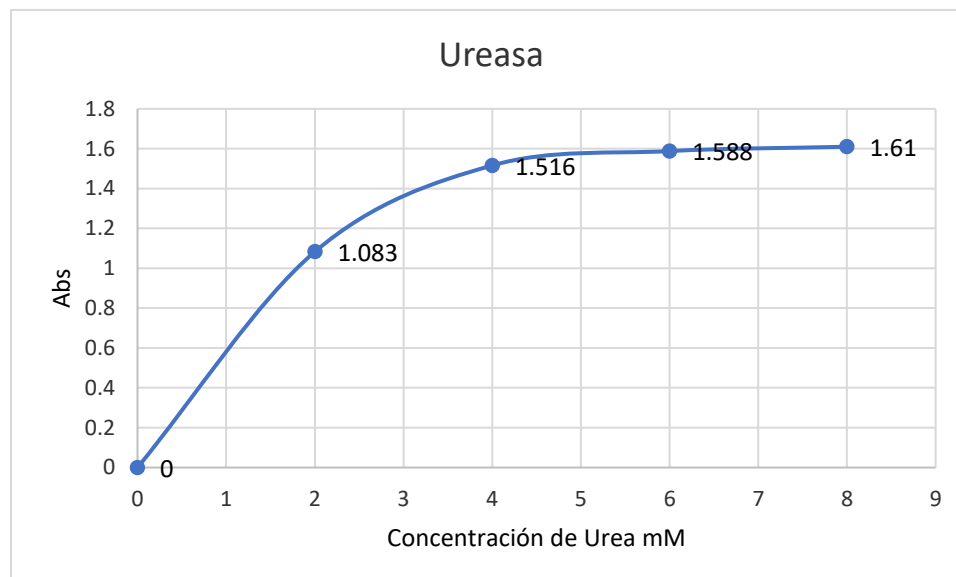


Figura 3.1. Gráfica Michaelis-Menten de la ureasa obtenida de semillas de *Citrullus vulgaris*.

3.2. Aislamiento del inhibidor de ureasa

Se diluyeron 31 mg del extracto en 1 mL de agua, obteniendo una disolución amarillenta. Al realizar la cromatografía se recolectaron cuatro fracciones de 100 mL cada una de ellas, las primeras dos de coloración amarillenta pálida y las dos

siguientes translúcidas. Se eliminó el metanol mediante destilación al vacío y se redujo el volumen de las fracciones a 10 mL.

3.3. Capacidad inhibitoria de las fracciones del extracto de *Cylindropuntia cholla*

Una vez obtenidas las diferentes fracciones cromatográficas, se procedio a analizar la capacidad del extracto y de cada fracción para inhibir la enzima. El efecto inhibitorio del extracto fue del 35.48%. Se obtuvieron cuatro fracciones y la que presentó mayor efecto inhibitorio (62.86%) fue la eluida con una proporción agua:etanol de 75:25 de la mezcla hidroalcoholica, seguida por la fracción eluida con una proporción 50:50 (51.9%) (Figura 3.2).

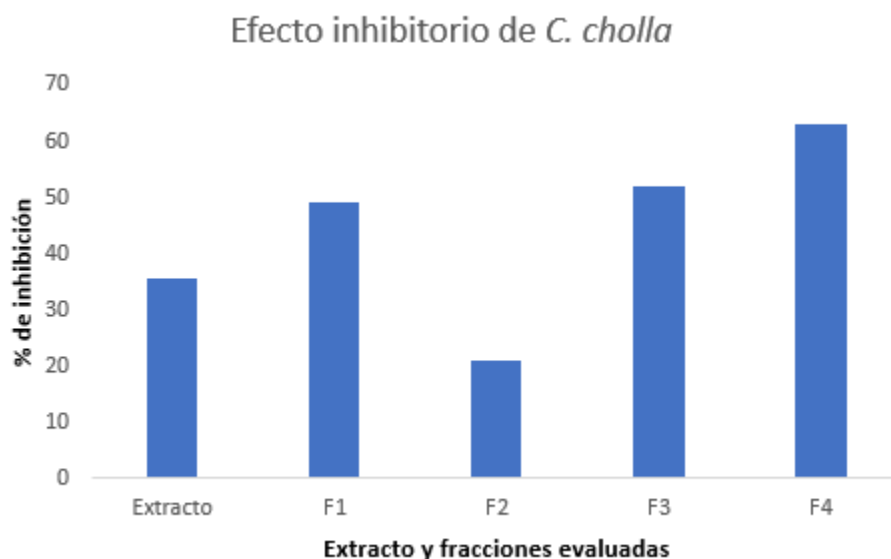


Figura 3.2. Efecto inhibitorio del extracto y de las distintas fracciones F1 (fracción 1), F2 (fracción 2), F3 (Fracción 3), F4 (fracción 4) expresadas como porcentaje.

3.4. Determinación del tipo de inhibición

Se realizó una gráfica comparativa de doble recíproco (Figura 3.3) con los datos de los parámetros cinéticos para determinar el tipo de inhibición que se produce por la

fracción obtenida del extracto de *C. cholla*. Los valores de $1/K_m$ se obtienen a una concentración de sustrato de $1/0.58$ y $1/V_{max}$ tiene una absorbancia de $1/0.49$ en ausencia de inhibidor, con presencia de inhibidor el valor de $1/K_m$ se obtiene a una concentración de sustrato de $1/1.72$ y $1/V_{max}$ tiene una absorbancia de $1/1.1$, es decir, existe una disminución en la velocidad máxima y un incremento en la cantidad necesaria de sustrato para obtener el valor de K_m .

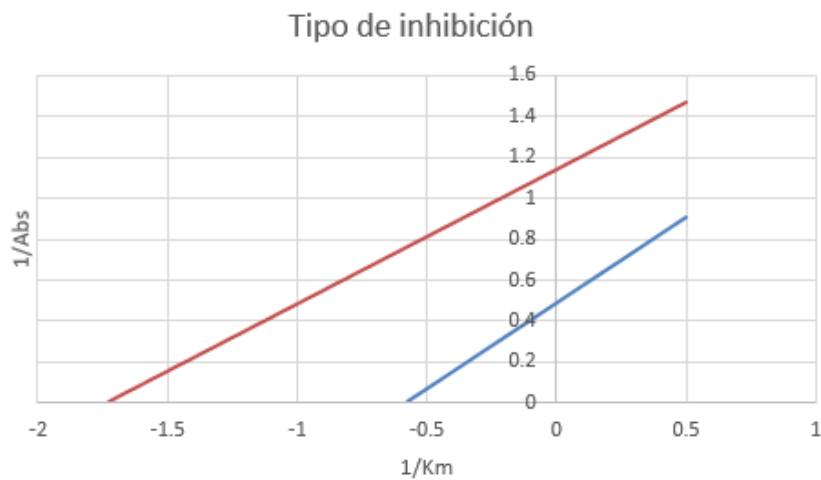


Figura 3.1. Gráfica Lineweaver-Burke de la ureasa la línea azul muestra la actividad enzimática en ausencia de inhibidor. La línea de color rojo muestra la actividad enzimática en presencia del inhibidor.



4. Discusión

La mayoría de los inhibidores de ureasa presentes en el extracto de cholla se lograron aislar cromatográficamente usando una fase móvil de agua:etanol 75:25 a través de una columna empacada con Sephadex-G25.

El Sephadex-G25 se ha utilizado exitosamente para la separación de polifenoles (taninos, lignina, flavonoides) desde que Somers separó taninos condensados del vino (Porter y Wilson 1972).

Debido a que el efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima consistió tanto en la disminución de la velocidad máxima de la enzima como en la afinidad de la enzima por el sustrato. En base a estos datos y utilizando el gráfico de Lineweaver-Burke se puede determinar que la inhibición que se produce en la ureasa con la fracción del extracto de cholla es del tipo no competitiva-mixta, lo que indica que el inhibidor se une en un lugar diferente al sitio activo, ya sea en la enzima o en el complejo enzima-sustrato (Voet, 2006).

Se ha demostrado que el extracto metanólico de la raíz de cholla tiene efecto anti-ureasa por inhibición no competitiva (Nuñez-Gastélum et al., 2016), en nuestro estudio encontramos que el tipo de inhibición es no competitiva mixta ya que se presentan cambios en V_{max} y K_m en forma simultánea y asimétrica.

Es necesario hacer notar que se encuentran presentes varios tipos de fenoles simples y complejos en dicho extracto (Zarate-Velázquez, 2018), lo que podría explicar la diferencia que encontramos en el tipo de inhibición respecto a los estudios anteriores, muy probablemente esto es ocasionado por diferencias en la concentración de fitoquímicos, ya que se ha reportado que varios de estos tienen la capacidad de inhibir a la ureasa.



Actualmente el 30% de los fármacos proceden en forma directa o indirecta de las plantas, y el 70% de estos han sido desarrollados en forma empírica (Devienne, 2004) México cuenta con una extensa medicina herbolaria, además de una extensa biodiversidad, lo que es una fuente rica y extensa en fitoquímicos y fitofármacos que pueden ser utilizados como herramienta terapéutica adicional para el tratamiento de enfermedades.

5. Conclusión

Empleando un sistema de cromatografía en columna empacada con Shepadex-G25 se logró obtener una fracción con casi 2 veces el porcentaje de inhibición del extracto crudo de *C. cholla* sobre la enzima ureasa. La fracción con la que se obtuvo el mejor efecto anti-ureasa fue la eluida con una mezcla agua:etanol (75:25) y se encontró una inhibición de tipo no competitiva-mixta.

Bibliografía

Alamzeb M, Omer M, Ur-Ras Mhid, *et al.* (mayo 2018). "NMR, Novel Pharmacological and In Silico Docking Studies of Oxyacanthine and Tetrandrine: Bisbenzylisoquinoline Alkaloids Isolated from *Berberis glaucocarpa* Roots. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Volume 2018, p.1-7.

Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana (BDMTM). (2009). Choya. Agosto 2018, de UNAM Sitio web:
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=Choya&po=&id=6685&clave_region=8

Campbell P, Smith A, Peters T. (2006). *Bioquímica ilustrada*. España: Masson. GE Healthcare Life Sciences. (2014). *Size Exclusion Chromatography*. USA: GE.

Champe P, Harvey R. (1994). *Biochemistry*. USA: J.B. Lippincott Company.

Devienne, K. F.; Raddi, G.; Pozetti, G. L. (2004). Das plantas medicinais aos fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 6, n. 3, p. 11-14.

González-Cantú G. (2014). Aislamiento y caracterización de compuestos de plantas derivados de la familia *Agavaceae* con efecto antimicrobiano sobre *Helicobacter pylori* (tesis doctoral). México: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Hassan, S. T. S., & Šudomová, M. (2017). The Development of Urease Inhibitors: What Opportunities Exist for Better Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Children? *Children*, 4(1), 2. <http://doi.org/10.3390/children4010002>



Johnson D et al. (July 1993). Contribution of *Proteus mirabilis* Urease to persistence, urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infection and immunity*, Vol. 61, No. 7, p. 2748-2754.

Loya-Arellano V. (2018). Obtención de una fracción concentrada del inhibidor de ureasa presente en la raíz de la cholla (*Cylindropuntia cholla*) (tesis de pregrado). México: UACJ.

Márquez-Lara D y Suárez-Londoño A. (2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista de medicina veterinaria*, número 16, pp. 87-109.

Modolo L, Souza A, Horta L, Araujo D, de Fátima A. (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, Vol 6, p. 35-44.

Nelson D y Cox M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry*. USA: W. H. Freeman and Company.

Parada-Contreras V. (2016). Inhibición dual de ureasa y anhidrasa carbónica como estrategia para limitar la capacidad de colonización de *Helicobacter pylori* por parte de procianidinas naturales y sus derivados semisintéticos (tesis de maestría). Chile: Universidad de Concepción.

Pope A, Toseland N, Rushant B, Richardson S, McVey M, Hills J. (January 1998). Effect of Potent Urease Inhibitor, Fluorofamide, on *Helicobacter* sp. in Vivo and in Vitro. *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 43, No. 1, p. 109-119.



Porath J & Flodin P. (1959.). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, Vol. 183, p. 1657-9.

Porter L, Wilson R. (20 September 1972). The separation of condensed tannins on Sephadex G-25 eluted with 50% aqueous acetone. *Journal of Chromatography A*, Volume 72, Issue 3, Pages 570-572.

PubChem. (2018). Acetohydroxamic acid. Agosto 2018, de National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine Sitio web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1990#section=Top>

PubChem. (2018). Phosphoramidate. Agosto 2018, de National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine Sitio web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/211207#section=2D-Structure>

Rutherford JC (2014) The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog* 10(5): e1004062. doi:10.1371/journal.ppat.1004062

Salehi B et al. (2018). Phytochemicals in *Helicobacter pylori* Infections: What Are We Doing Now? *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 2361, doi:10.3390/ijms19082361.

Skoog D, Holler J, Crouch S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. México: Cengage learning.

Vera G. (2016). Evaluación de la actividad antiureasa y antimicrobiana de los extractos metanólicos de la raíz de cholla (*Cylindropuntia cholla*) (tesis de pregrado). México: UACJ.

Voet, D. 2006. Bioquímica. Técnicas de purificación de proteínas. Panamericana. Buenos Aires. pp 145.

Williams R. (2006). bacterial flora and pathogenesis in hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther*, 25 (Suppl. 1), 17–22.

Yang X, Koohi-Moghadam M, Wang R, Chang Y-Y, Woo PCY, Wang J, et al. (2018) Metallochaperone UreG serves as a new target for design of urease inhibitor: A novel strategy for development of antimicrobials. *PLoS Biol* 16(1): e2003887. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003887>

Zarate-Velázquez O. (2018). Actividad anti-ureasa y antioxidante de los extractos de la raíz de *Cylindropuntia cholla* (tesis de pregrado). México: UACJ.

Zhou J-T, Li C-L, Tan L-H, Xu Y-F, Liu Y-H, Mo Z-Z, et al. (2017) Inhibition of *Helicobacter pylori* and Its Associated Urease by Palmatine: Investigation on the Potential Mechanism. *PLoS ONE* 12(1): e0168944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168944>