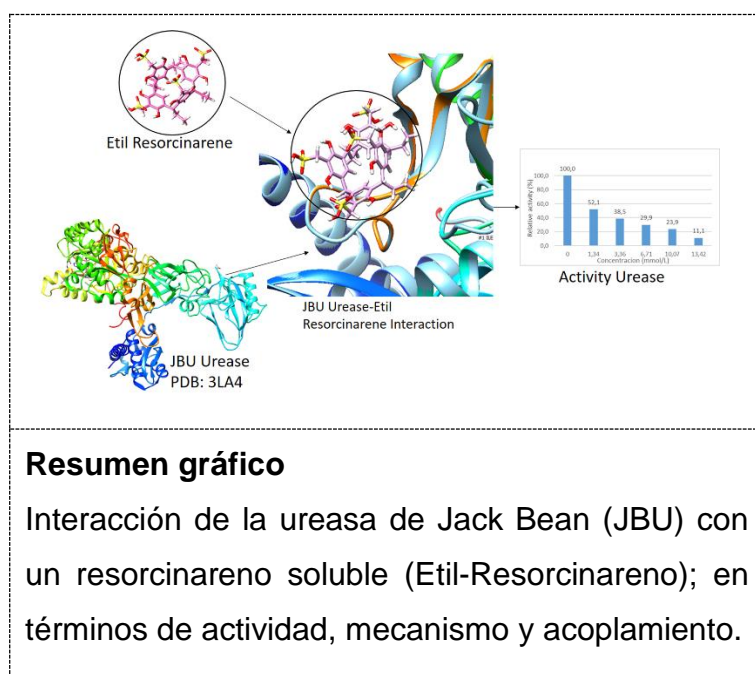


Efecto de una serie de resorcinarenos solubles en la actividad enzimática de ureasa de Jack Bean (*Canavalia ensiformis*)

A series soluble resorcinarenes effect on the enzymatic activity of urease of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*)



Resumen gráfico

Interacción de la ureasa de Jack Bean (JBU) con un resorcinareno soluble (Etil-Resorcinareno); en términos de actividad, mecanismo y acoplamiento.

Efecto de una serie de resorcinarenos solubles en la actividad enzimática de ureasa de Jack Bean (*Canavalia ensiformis*)

A series soluble resorcinarenes effect on the enzymatic activity of urease of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*)

Leidy Catherine Páez Pedraza*

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por: Dr. Edwin Malagón M.Sc. Ph.D

Resumen

Las propiedades químicas y la estructura molecular de la ureasa de *Canavalia ensiformis* han sido estudiadas ampliamente. La ureasa es una metaloenzima dependiente de níquel que cataliza la hidrólisis de la urea, permitiendo que el nitrógeno esté disponible como nutriente para las plantas. En la agricultura, las pérdidas de nitrógeno por volatilización y en la medicina las enfermedades gastrointestinales causadas por patógenos han hecho que el estudio de las ureasas sea importante en varios campos de aplicación. La interacción de la ureasa de Jack Bean (JBU) con cinco resorcinarenos sulfonados solubles con diferente estructura química se evaluó en términos de actividad, mecanismo de interacción y simulación de acoplamiento molecular. Los resultados de los experimentos de espectroscopia UV-VIS sugieren cambios conformacionales en la estructura que reflejan la disminución de la actividad de la enzima en más del 50%, siendo el inhibidor más fuerte *p*-sulfonatoresorcin[4]areno (Na₄ESRA), seguido por *m*-propilsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄PrRA), *n*-ethylsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄EtRA), *n*-methylsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄MeRA) y el inhibidor más débil *o*-

metiltioetilsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄SRA). Los cálculos de acoplamiento sugieren una inhibición no competitiva y muestran que los resorcinarenos se unen mediante interacciones hidrofóbicas a diferentes dominios de la enzima y que no se unen al sitio catalítico.

Abstract

The chemical properties and molecular structure of *Canavalia ensiformis* urease have been extensively studied. Urease is a nickel-dependent metalloenzyme that catalyzes the hydrolysis of urea, allowing nitrogen to be available as a nutrient for plants. In agriculture, volatilization nitrogen losses and in medicine gastrointestinal diseases caused by pathogens have made the study of ureases important in several fields of application. The interaction of Jack Bean urease (JBU) with five soluble sulfonated resorcinarenes with different chemical structure was evaluated in terms of activity, interaction mechanism and simulation of molecular coupling. The results of UV-VIS spectroscopy experiments suggest conformational changes in structure that reflect the decrease in enzyme activity by more than 50%, with the strongest strong inhibitor being *c*-sulfonatoresorcin [4] arene (Na₄ESRA), followed by *c*-propylsulfonaterosorcin [4] arene (Na₄PrRA), *c* ethylsulfonatoresorcin [4] arene (Na₄EtRA), *c* methylsulfonatoresorcin [4] arene (Na₄MeRA) and the weakest inhibitor *c*-methylthioethylsulfonatoresorcin [4] arene (Na₄SRA). Docking calculations suggest non-competitive inhibition and show that resorcinarenes bind through hydrophobic interactions to different enzyme domains and that they do not bind to the catalytic site

Keywords: Urease, resorcinarene, inhibition, non-competitive, enzymatic activity.

1. Introducción

La ureasa de Jack Bean (JBU) (EC 3.5.1.5) es una metaloenzima dependiente de níquel que cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco y carbamato, este último se descompone espontáneamente a pH fisiológico en ácido carbónico y otra molécula de amoníaco (Ver figura 1) [1], [2], [3]. La ureasa es una metaloenzima que se encuentra en hongos, levaduras, plantas y en las semillas leguminosas se sugiere que está relacionada con la germinación y la defensa química [4]. En la agricultura es muy importante porque provee una fuente de nitrógeno inorgánico a partir de fertilizantes comunes como la urea, también tiene aplicaciones industriales, ambientales y representa un problema en las infecciones causadas por *Helicobacter pylori* en el tracto gastrointestinal [5], [6], [7].

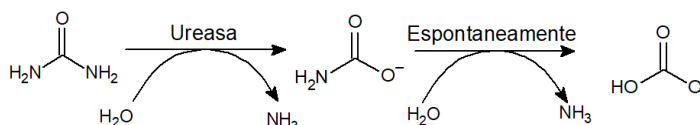


Figura 1. Reacción de hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa [2],[3]

Anteriormente compuestos para inmovilizar, estabilizar o mejorar la actividad catalítica de la ureasa se han evaluado para ser empleados en procesos biotecnológicos[5],[8]. La estabilización de enzimas ha sido un campo de estudio de interés para ampliar las aplicaciones de estos biocatalizadores en la industria [9]. Interacciones con diversos compuestos han sido objetivo de investigación con ese fin, incluidos macrociclos[10],[11], que han sido muy relevantes en la química supramolecular como un ligando de reconocimiento de biomacromoléculas [12].

Dentro de la amplia variedad de macrociclos el resorcinareno tiene propiedades químicas que permiten adoptar diferentes isómeros conformacionales, siendo la conformación tipo corona la más estable, con una cavidad rica en electrones π y grupos hidroxilo, que hacen posible la interacción con residuos de aminoácidos, formando complejos huésped-

hospedero (Ver figura 2) [13], [14]. Se han realizado estudios de resorcinarenos con enzimas como la lipasa donde se ha mejorado la actividad catalítica y metaloenzimas como la catalasa donde se ha obtenido como resultado la inhibición [15], [16].



Figura 2. Resorcinareno en conformación tipo corona. (A). Interacciones en el borde superior e inferior. (B) Complejo huésped-hospedero.

La ureasa también ha sido blanco de inhibición en los trabajos para tratamiento de infecciones causadas por patógenos y representa el principal factor de virulencia para una gran variedad de estos microorganismos que con frecuencia son resistentes a los antibióticos [17], [18], [19], [20]. De igual manera, en la agricultura la actividad excesiva de la ureasa requiere ser controlada para evitar pérdidas de nitrógeno por volatilización y otras consecuencias como la alcalinización de los suelos que causan daños en las raíces y disminución de absorción de nutrientes [20].

El mecanismo de la actividad de la ureasa se ha estudiado y ha sido importante en los trabajos de inhibición de la enzima. Como se mencionó previamente, es una enzima dependiente de níquel, que tiene dos centros metálicos Ni^{+2} (1) y Ni^{+2} (2). Se han propuestos dos mecanismos principales como se ilustra en la figura 3. En el primero la urea se une con su oxígeno carbonilo a Ni^{+2} (1) y retiene una molécula de agua en el Ni^{+2} (2), el bolsillo enzimático se cierra y el hidroxilo unido a Ni^{+2} (2) actúa como un nucleófilo, atacando el carbonilo de la urea que está polarizado por la unión a Ni^{+2} (1) (Figura 3B) [2], [4], [21]. El intermediario tetraédrico con His320 que actúa como un ácido, libera amoníaco y procede

la reacción. El segundo mecanismo de reacción consiste en la unión de manera bidentada de la urea con su oxígeno carbonilo a Ni^{+2} (1) y uno de los grupos amino unido a Ni^{+2} (2), reemplazando tres moléculas de agua y dejando el hidróxilo puente que ataca a la urea para dar el estado de transición tetraédrico y finalmente conducir a la formación de carbamato y amoniacó (Figura 3C) [1], [4], [21].

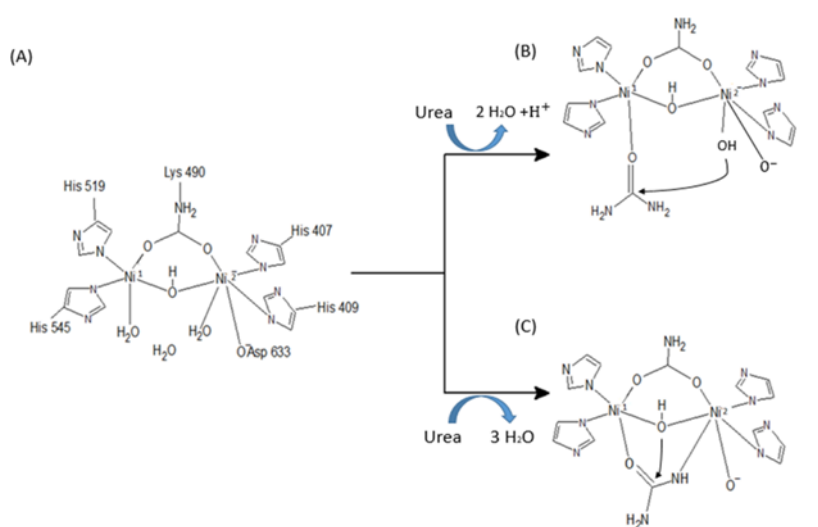


Figura 3. Principales mecanismos de reacción propuestos para la ureasa. (A) Esquema del sitio catalítico de JBU. (B) Mecanismo propuesto por Karplus y cols. en 1997 basado en la estructura cristalina de *K. aerogenes*^[2]. (C) Mecanismo propuesto por Benini y cols. en 1999 basado en la estructura cristalina de *B. pasteurii*^[2].

Aunque no se ha evaluado la interacción de la ureasa con resorcinarenos, otros macrociclos como el polipseudorotaxano se han estudiado recientemente y han servido como estabilizadores [22]. La ureasa es una metaloenzima que contiene en su sitio activo níquel (Ni^{+2}) y la química de coordinación de los resorcinarenos, mediante interacciones catión- π hacen de estas estructuras unos ligandos polidentados [13]. Los grupos hidroxilo situados en el borde superior del resorcinareno permiten que la corona tenga un extremo abierto y hacen disponible el resorcinareno para la unión de cationes, aniones e interacciones hidrofóbicas [13]. En este sentido, teniendo en cuenta las propiedades de química supramolecular de los resorcinarenos y metaloenzimas como la ureasa, su mecanismo catalítico y estructura molecular, es conveniente conocer esta interacción y los efectos que

puede tener en la actividad enzimática.

En este trabajo se evaluó la interacción de cinco resorcinarenos solubles en agua con JBU por métodos espectroscópicos y cálculos de acoplamiento molecular. Los resultados obtenidos se discuten en términos de actividad, acoplamiento y mecanismo de interacción. Este estudio aporta a las investigaciones sobre la interacción de macrociclos con proteínas desde el punto de vista estructural y funcional.

2. Materiales y métodos

2.1 Productos químicos

Se empleó ureasa de Jack Bean (EC 3.5.1.5) del proveedor Sigma Aldrich (E.E.U.U.) que tiene una actividad enzimática de 50000 a 100000 U/g. El hipoclorito de sodio 10%, dihidrógeno fosfato de sodio, cloruro de amonio, nitroprusiato de sodio y el fenol para los ensayos enzimáticos fueron adquiridos de PanReac (E.E.U.U). El buffer de fosfatos pH 7.5 de concentración 0.1 M se empleó en todos los ensayos de espectrofotometría y fluorescencia. Se midió pH con el potenciómetro Boeco (Alemania) y se empleó agua ultra pura para preparar las soluciones utilizando un sistema milliQ con resistividad de 18 $\mu\Omega$ /cm.

2.1.1. Resorcinarenos

Una serie de 5 resorcinarenos solubles para evaluar la interacción con JBU fueron sintetizados según los procedimientos reportados en la literatura ^[23]. Sodio c-methylsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄MeRA), c-ethylsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄EtRA), c-propylsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄PrRA), c-methyltioethylsulfonatoresorcin[4]areno (Na₄SRA), y c-sulfonatoresorcin[4]areno (Na₄ESRA) se caracterizaron por resonancia

magnética nuclear (^1H -RMN). La pureza de estos compuestos fue mayor al 98% y todos presentan una conformación tipo corona. En la figura 4 se representa la estructura molecular.

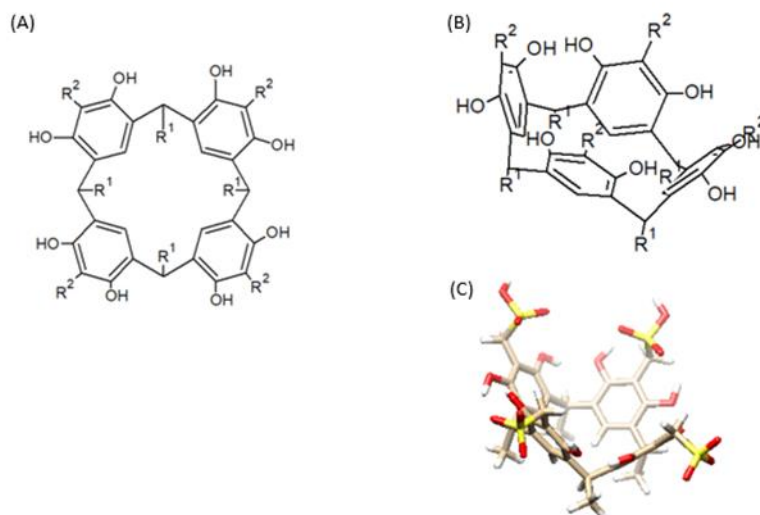


Figura 4. Estructuras moleculares de los resorcinarenos. (A) Resorcinarenos, donde R_2 es $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ para todos los compuestos, a excepción de Na_4ESRA donde R_2 es H y R_1 corresponde a Na_4MeRA , $\text{R}_1 = -\text{CH}_3$; Na_4EtRA , $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$; Na_4PrRA , $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; Na_4SRA , $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$; Na_4ESRA , $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$. (B) Conformación tipo corona. (C) Na_4MeRA en conformación tipo corona.

2.2 Determinación de la actividad de JBU

En la determinación de la actividad de JBU se aplicó un diseño experimental 2^n donde se mantuvo constante la concentración de enzima en 8,7 mM y varió la concentración de sustrato en 0.1M, 0.2M y 0.3M y pH en 6.0, 7.5 y 8.5. Se aplicó el método basado en la reacción de Berthelot^[24], que consiste en la determinación y cuantificación del producto de la reacción de descomposición de la urea. El amoníaco liberado en la reacción catalizada por la ureasa JBU reacciona con hipoclorito para formar monocloramina. Posteriormente, este producto reacciona con el fenol para formar un complejo azul que absorbe a 630 nm y corresponde a indofenol^[24].

2.3 Mediciones de absorción UV-VIS

Un espectrofotómetro Cary 60 (Agilent, E.E.U.U.) se usó para medir la actividad de la enzima a 630 nm en una cubeta de cuarzo de un cm de longitud. La concentración de urea fue de 0.2 M y la ureasa se mantuvo en una concentración de 8.7 mM a un pH de 7,5 y una temperatura de 298.15 K para evaluar la actividad enzimática en presencia de 0.80, 2.00, 4.00, 6.00 y 8.00 mM del resorcinareno objetivo. Para cuantificar el amoniaco producto de la reacción enzimática mediante la reacción de Berthelot ^[24], se realizó una curva de calibración de amoniaco, con las siguientes concentraciones en mM: 0.0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 y 0.40, respectivamente. El coeficiente de correlación (r^2) fue de 0.995.

En la determinación de actividad enzimática se midió cada 60 segundos, durante los primeros de 15 min de reacción, donde se mantiene una tendencia lineal de la concentración de amoniaco con respecto al tiempo y se empleó la pendiente de la recta para definir la actividad de JBU. Los datos obtenidos de actividad se expresaron en porcentaje de actividad relativa, donde el 100% corresponde a la actividad de la enzima cuando cataliza en ausencia de resorcinareno y la inhibición de JBU se expresó en valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria media máxima), una medida que indica la cantidad de sustancia para inhibir en un 50% un proceso biológico, en este estudio, se refiere a la actividad de JBU.

Todos los ensayos se hicieron por triplicado y los valores se presentaron como medias \pm error estándar de la media (SD). Se utilizó ANOVA y la prueba de Tukey para comparar entre múltiples experimentos con diferentes concentraciones de resorcinareno y grupos control.

2.4 Modelamiento de la interacción de JBU con resorcinarenos

Los resorcinarenos se modelaron usando el software Avogadro ^[26] con método gaussiano. La interacción de JBU con los resorcinarenos objetivo se modeló en el servidor Swiss Dock ^[25] que mediante cálculos teóricos sigue un método ciego en el que se selecciona toda la proteína para el acoplamiento. Para este estudio se seleccionó solo una cadena α de JBU de la estructura cristalina de RCSB Protein Data Bank PDB código 3LA4, teniendo en cuenta que la enzima se compone de 6 cadenas iguales. Finalmente, se usó Chimera ^[27] para visualizar los resultados del acoplamiento de JBU con cada uno de los resorcinarenos.

3. Resultados y discusión

3.1 Efecto de los resorcinarenos en la actividad de la ureasa

La actividad de JBU se ve disminuida por efecto de la presencia de los cinco resorcinarenos evaluados como se muestra en la figura 5, lo que indica que hubo una inhibición enzimática y puede representarse en el siguiente orden $\text{Na}_4\text{ESRA} > \text{Na}_4\text{PrRA} > \text{Na}_4\text{EtRA} > \text{Na}_4\text{MeRA} > \text{Na}_4\text{SRA}$, donde la inhibición más fuerte es por c-sulfonateresorcin [4]arene (Na_4ESRA), según los valores IC_{50} que se ilustran en la tabla 1, ordenados desde el menor valor IC_{50} , que indica la inhibición más fuerte hasta el valor IC_{50} más alto, que se refiere a la inhibición más débil.

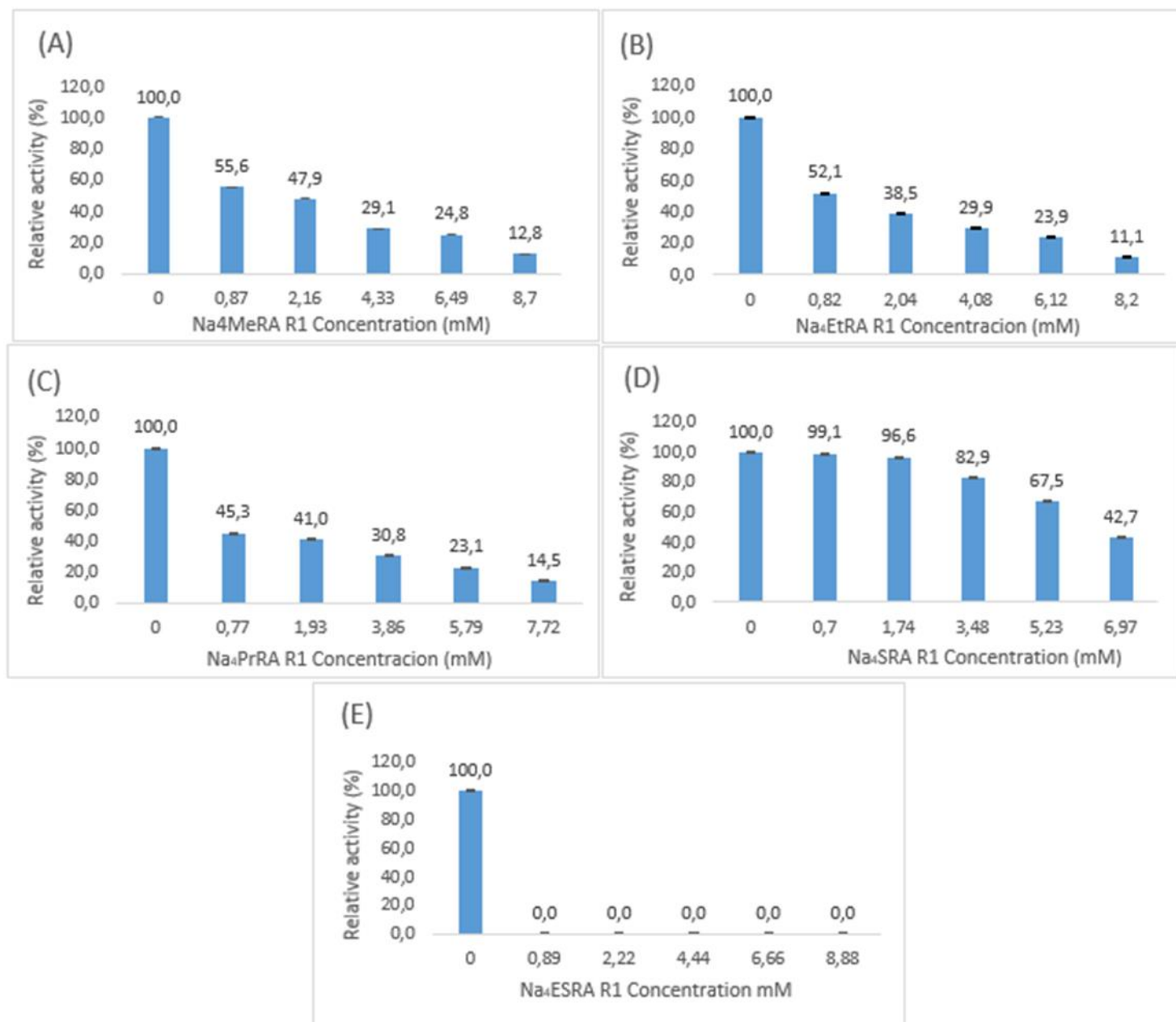


Figura 5. Cambios en la actividad de JBU en presencia de diferentes concentraciones de resorcinarenos. (A) Na₄MeRA, (B) Na₄EtRA, (C) Na₄PrRA, (D) Na₄SRA, (E) Na₄ESRA. Los valores son medias ± SD (n = 3).

La actividad enzimática está relacionada estrechamente con la estructura, la disposición de los aminoácidos a lo largo de la cadena en una proteína determina la forma tridimensional, lo que significa que puede ser afectada por cualquier cambio conformacional. Los datos de IC₅₀ ilustrados en la tabla 1 muestran una tendencia de inhibición que se relaciona con la cadena lateral sustituida de los resorcinarenos (Sustituyente R1). Cuando la cadena lateral es más larga e hidrófoba como el propilo y el etilo, el inhibidor es más potente y el valor IC₅₀

menor y por el contrario cadenas laterales muy cortas como el metilo, inhiben menos la enzima con un valor IC_{50} mayor. La forma de una proteína es específica y las interacciones entre los residuos de aminoácidos, en especial las no covalentes mantienen el plegamiento y la estructura que definen la funcionalidad.

Tabla 1. Inhibición de la ureasa por resorcinarenos

| Resorcinareno | Sustituyente R_1 | IC_{50} |
|----------------------|---|-----------|
| Na ₄ ESRA | -CH ₂ CH ₂ SO ₃ Na | ----- |
| Na ₄ PrRA | -CH ₂ CH ₂ CH ₃ | 1,66 |
| Na ₄ EtRA | -CH ₂ CH ₃ | 1,84 |
| Na ₄ MeRA | -CH ₃ | 2,26 |
| Na ₄ SRA | - CH ₂ CH ₂ SCH ₃ | 6,56 |

La inhibición de Na₄PrRA, Na₄EtRA y Na₄MeRA siguen una tendencia similar (Tabla 1) a diferencia de los resorcinarenos sustituidos con cadenas más polares como Na₄SRA, donde y Na₄ESRA donde la inhibición no sigue una tendencia y, por lo tanto, no se puede describir mediante un modelo matemático (tabla 1 y figura5).

3.2 Acoplamiento molecular de los complejos resorcinareno-JBU

Con el fin de simular posibles sitios de unión de los resorcinarenos a JBU, se hizo acoplamiento molecular que permite dilucidar la posible interacción del ligando y la proteína, deduciendo el mecanismo de los cambios estructurales y la actividad.

La estructura de JBU está compuesta por una única subunidad α de 840 aminoácidos con un peso molecular de 91,50 KDa y consta de cuatro dominios (como se describe en la figura 6A); un dominio $\alpha\beta$ N-terminal (Met 1 -Pro 134), un segundo dominio $\alpha\beta$ (Gly 135 -Pro 285), un dominio β (Thr 286 -Ala 401 y Leu 702 - Ser 761) y un dominio barril C-terminal ($\alpha\beta$) 8

TIM (Gly 402 -Lys 701 & Ile 762 -Phe 840), datos de Protein Data Bank, (código PDB: 3LA4) [3]. [4]. El programa de acoplamiento SwissDock que se empleó en este estudio tiene un enfoque ciego, donde no se limita a una región de la proteína y los cálculos de acoplamiento se basan en toda la cadena, obteniendo la mayor probabilidad de unión del ligando a la enzima. Se seleccionó solo una cadena α de JBU para el modelamiento. Las subunidades α de la ureasa se ensamblan formando homotrímeros que conforman un dímero $(\alpha_3)_2$ con seis sitios activos, formando un hexámero como la estructura funcional de la enzima (Figura 6B) [4].

El sitio catalítico de JBU es muy similar al de las ureasas bacterianas, conformado por dos centros de níquel separados por una distancia de 3,5 Å a 3,7 Å, unidos por los átomos de oxígeno de un residuo de lisina carbamylada y unidos a dos histidinas [4].

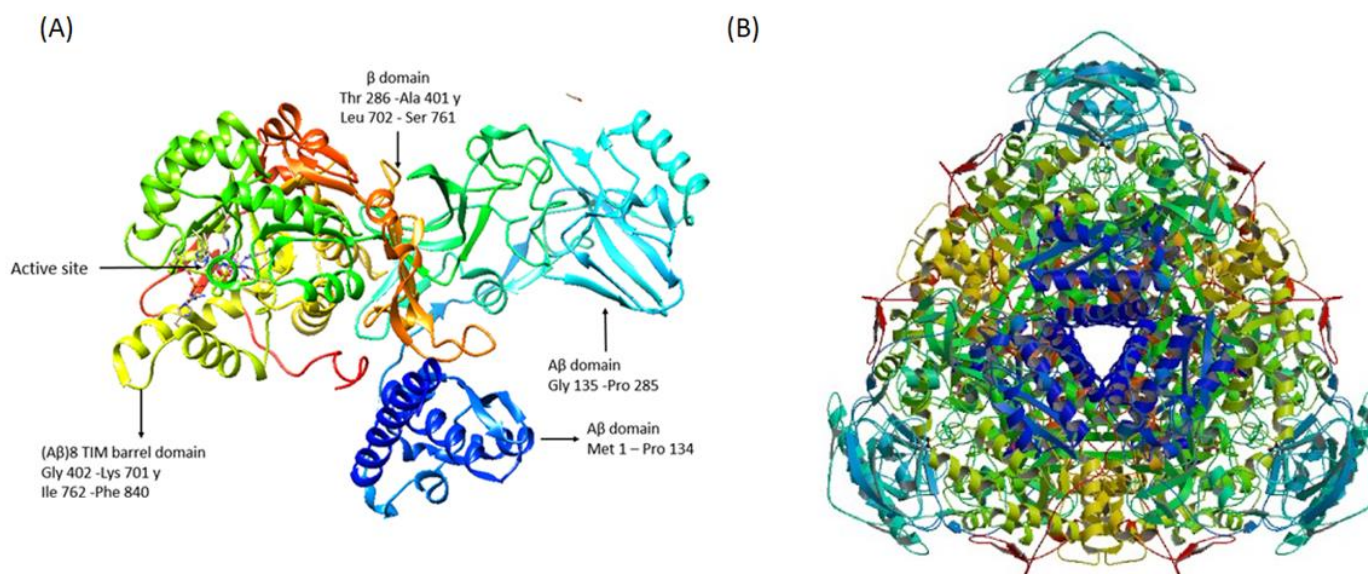


Figura 6. Estructura molecular de JBU, PDB Código 3LA4. (A) Subunidad α monómero de JBU y los dominios conformacionales. (B) Ensamblaje hexamérico de JBU como estructura funcional.

Los resultados de acoplamiento muestran que los resorcinarenos Na₄MeRA, Na₄EtRA y Na₄SRA se unen a diferentes dominios de la enzima que no se relacionan con el sitio

catalítico y los resorcinarenos Na₄PrRA y Na₄ESRA se unen al dominio donde se encuentra el sitio catalítico, sin embargo, a una distancia lejana como se muestra en la tabla 2. La figura 7 muestra las interacciones de cada resorcinareno con los dominios de la cadena α de la enzima. Los cálculos de acoplamiento indican que las interacciones son principalmente hidrófobas y de fuerzas van der Waals como se ha reportado anteriormente en estudios relacionados de enzimas y proteínas con macrociclos [16], [28].

Na₄MeRA está orientado de manera regular: el borde superior donde se encuentra los residuos sulfonados interactúa directamente con la proteína y el borde inferior hidrófobo esta opuesto a la cadena polipeptídica. La interacción de Na₄MeRA con el dominio β es por van der Waals, algunos puentes de hidrógeno con los residuos sulfonados y también existen interacciones hidrofóbicas tipo huésped-hospedero específicamente con Phe 380 y los anillos aromáticos del resorcinareno al interior de la corona (figura 7A y figura 8A) [13], [14]. En contraste, Na₄EtRA está orientado de manera en que el borde inferior del resorcinareno donde se encuentra la cadena hidrófoba, es el principal que interactúa con residuos de la proteína (figura 7B y figura 8B). Na₄PrRA, Na₄SRA y Na₄ESRA están orientados en una forma similar a Na₄MeRA, aunque la mayor interacción con la cadena polipeptídica es por el borde superior de los resorcinarenos, a diferencia de Na₄MeRA, el borde inferior con cadenas hidrófobas también presenta una menor superficie de interacción con la enzima (Figura 7 y figura 8C, 8D, 8E) [13], [14].

Tabla 2. Sitios de unión de resorcinarenos, residuos y distancias al sitio catalítico

| Resorcinareno | Dominio | Residuos de unión | Distancia a Ni ⁺² 1 y a Ni ⁺² 2 sitio catalítico (Å) |
|----------------------|-------------------------|---|--|
| Na ₄ MeRA | β domain | Asn 382, Phe 380, Ala 365, Ser 366, Ile 367. | Ni 1: 40,774 Ni 2: 38,797 |
| Na ₄ EtRA | β domain | Ile 731, Met 749, Ala 736, Pro 739, Asn 735 | Ni 1:35,698 Ni 2: 31,160 |
| Na ₄ PrRA | (Aβ)8 TIM barrel domain | Thr 830, Arg 835, Leu 833, Ser 834, Pro 832 | Ni 1: 31,292 Ni 2: 31,237 |
| Na ₄ SRA | Aβ domain | Met 1, Ser 4, Arg 6, His 14, Ala 37, Ser 41, Glu 45, Thr 86 | Ni 1: 44,836 Ni 2: 41,765 |
| Na ₄ ESRA | (Aβ)8 TIM barrel domain | Thr 830, Val 831, Leu 833, Ser 834, Pro 832, Arg 835, Asn 836 | Ni 1: 24,736 Ni 2: 23,669 |

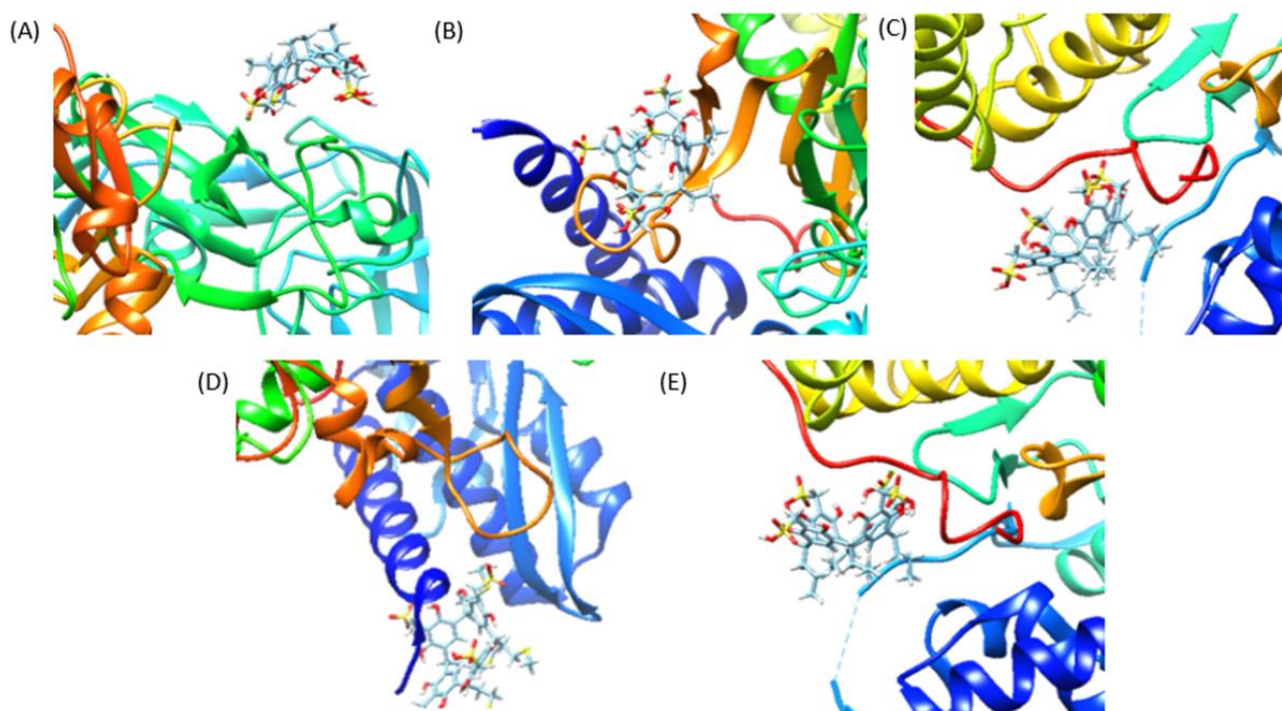


Figura 7. Estructura de los resorcinarenos acoplados al monómero α de la ureasa (JBU). (A) Na₄MeRA, (B) Na₄EtRA, (C) Na₄PrRA, (D) Na₄SRA y (E) Na₄ESRA.

En la estructura de las ureasas bacterianas se ha sugerido un colgajo móvil que cubre el sitio activo y regula la entrada del sustrato, en las ureasas vegetales como JBU la comparación estructural ha demostrado que este colgajo está conformado en la región

Met590 a His607 del dominio de(A β)₈ TIM barril [4], [29]. Na₄PrRA y Na₄ESRA se unen al dominio (A β)₈ TIM barril, en la región de Thr 830 a Arg 835 (Tabla 2). Inhibiciones de ureasa dirigidas al sitio catalítico o mediante uniones con residuos que conforman el colgajo móvil han sido reportadas [30], [31], [32]. Aunque estos resorcinarenos no se unen directamente al sitio catalítico o al colgajo móvil, se sugiere que esta interacción perturba la estructura, haciendo un cambio conformacional en el colgajo móvil o directamente en el sitio catalítico disminuyendo la afinidad.

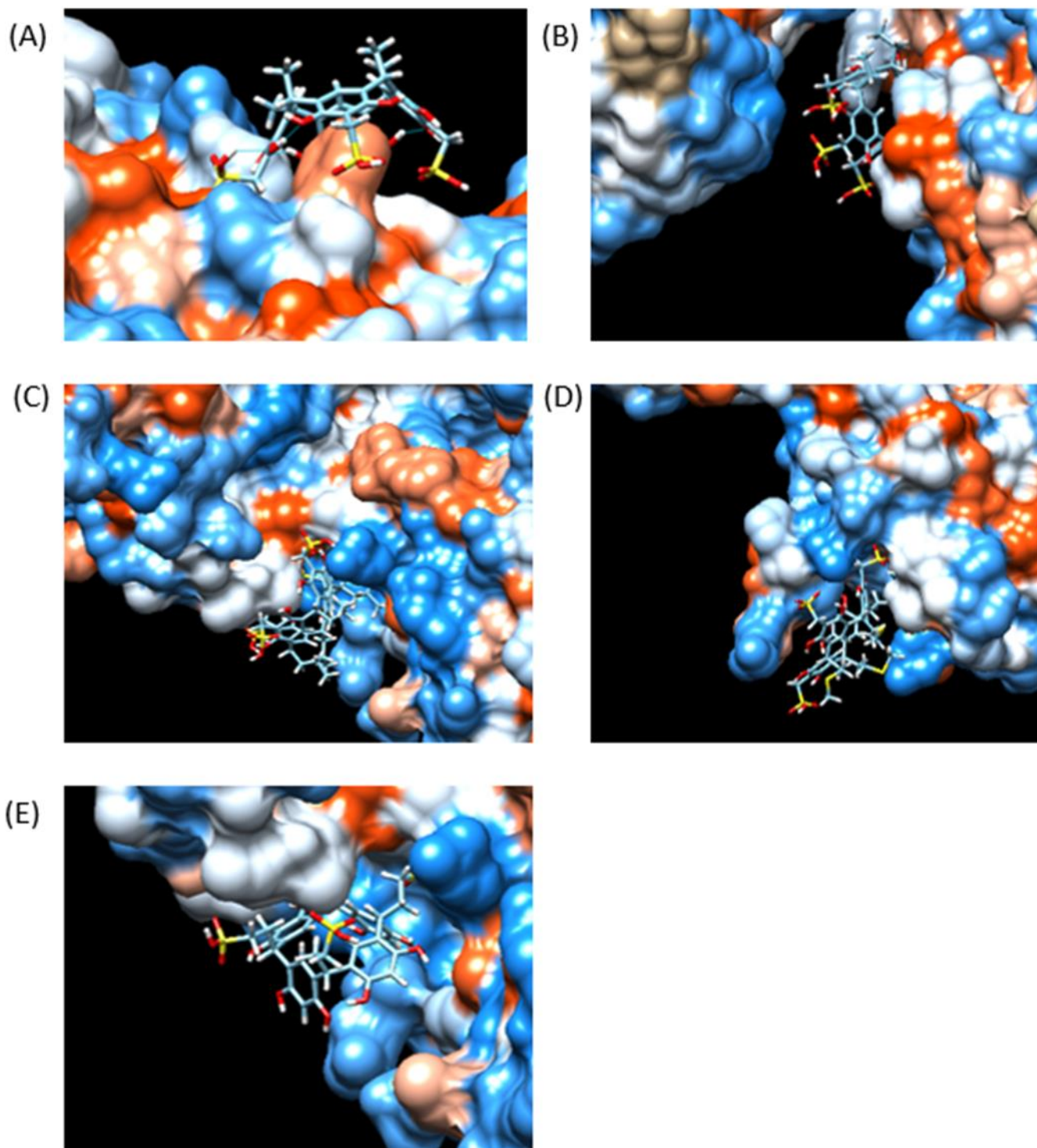


Figura 8. Superficie de hidrofobicidad de acoplamiento de resorcinarenos a JBU. (A) Na4MeRA, (B) Na4EtRA, (C) Na4PrRA, (D) Na4SRA y (E) Na4ESRA

Es importante destacar el rol de las interacciones hidrofóbicas, los resorcinarenos son macrociclos formados por cuatro anillos aromáticos que pueden hacer interacciones apolares, anión- π , catión- π , π - π con residuos de proteínas como se ha observado en los

acoplamiento de Na₄ESRA y Na₄EtRA que presentan un etilo como cadena lateral y Na₄PrRA un propilo (figura 8B, 8C y 8E) [13], [14]. Además, los anillos aromáticos de los resorcinarenos y la conformación tipo corona permite el sistema huésped-hospedero como se muestra en la figura 8A [12], [13]. Las interacciones hidrofóbicas han sido más frecuentes comparadas con otras como los puentes de hidrógeno que pueden formar los sulfatos de los resorcinarenos, o los grupos hidroxilo del borde superior de la estructura, representadas en la tabla 3. Esto contribuye a los resultados de inhibición de Na₄SRA, donde las cadenas laterales apolares han sido sustituidas con azufre y sulfato, aumentando la probabilidad de formar puentes de hidrógeno, o por cargas puntuales y disminuyendo las interacciones hidrofóbicas, por lo que la unión de Na₄SRA es más débil comparada con los otros resorcinarenos y presenta la menor inhibición de la enzima [14]. Con respecto a Na₄MeRA sucede un fenómeno similar, la cadena metilo del macrociclo no interactúa con la enzima y las interacciones solo son con los anillos aromáticos del compuesto.

Tabla 3. Puentes de hidrógeno en la interacción de resorcinarenos con JBU

| Resorcinareno | Numero de puentes de hidrógeno formados | Residuo de resorcinareno | Residuo de JBU |
|----------------------|---|--------------------------|----------------|
| Na ₄ MeRA | 1 | Sulfato borde superior | Ser 366 |
| Na ₄ EtRA | 1 | Sulfato borde superior | Met 749 |
| Na ₄ PrRA | 0 | ----- | ----- |
| Na ₄ SRA | 0 | ----- | ----- |
| Na ₄ ESRA | 1 | Sulfato borde inferior | Ser 834 |

Los resultados del acoplamiento respaldan los resultados experimentales del efecto en la actividad de JBU. Na₄ESRA es el resorcinareno que se une más cerca al sitio catalítico y mostró mayor inhibición con una diferencia significativa de los otros resorcinarenos y, por el contrario, Na₄SRA interactuó con residuos localizados más lejos del sitio catalítico y presenta una menor inhibición de la enzima (tabla 1 y figura 5). Las distancias del sitio de unión del resorcinareno al Ni⁺² 1 y Ni⁺²2 del bolsillo enzimático siguen la misma tendencia

que las inhibiciones descritas en la tabla 1 y figura 5 ($\text{Na}_4\text{ESRA} > \text{Na}_4\text{PrRA} > \text{Na}_4\text{EtRA} > \text{Na}_4\text{MeRA} > \text{Na}_4\text{SRA}$) y tienen relación directa con la longitud de las cadenas apolares. Aunque existe una diferencia en la inhibición entre Na_4MeRA , Na_4EtRA y Na_4PrRA , esta no es muy significativa y los valores de inhibición son muy cercanos entre estos macrociclos comparados con Na_4SRA y Na_4ESRA (Figura 5). De lo anterior, se deduce que cuando la cadena lateral del resorcinareno es más apolar se une a residuos más cercanos al bolsillo enzimático y el cambio conformacional que experimenta JBU es más intenso, afectando indirectamente la unión del sustrato al níquel del sitio activo como se ha descrito anteriormente en los dos mecanismos más estudiados propuestos por Benini y cols.^[1] y Karplus y cols.^[2], o el colgajo móvil que cubre el sitio activo no cambia de abierto a cerrado, manteniéndose en una sola conformación, ya sea impidiendo la entrada del sustrato o no permitiendo la salida de uno de los productos y evitando que la reacción proceda como en investigaciones anteriores se ha reportado ^[30], ^[31], ^[32]. Sin embargo, se requiere de más estudios para confirmarlo. Por ahora, se puede inferir a partir del acoplamiento molecular que la inhibición de JBU por los resorcinarenos es no competitiva porque ninguno se une directamente en el bolsillo enzimático.

4. Conclusiones

Con base en los resultados de investigación de actividad, mecanismo y simulación de acoplamiento de la ureasa de *Canavalia ensiformis* y los compuestos evaluados se puede concluir que JBU es inhibida por Na_4MeRA , Na_4EtRA , Na_4PrRA , Na_4SRA y Na_4ESRA y que la disminución de la actividad alcanza valores superiores al 50%, siendo el inhibidor más fuerte Na_4ESRA y el inhibidor más débil Na_4SRA . Los resultados de acoplamiento muestran que las interacciones entre JBU y los resorcinarenos son principalmente hidrofóbicas y que

se unen a diferentes dominios de la cadena polipeptídica, sugiriéndose la inhibición no competitiva. Por lo tanto, los resorcinarenos se postulan como objetivo de investigación en la inhibición de ureasas y merecen ser explorados para el tratamiento de suelos en la agricultura y eventualmente podrían tener aplicaciones medicinales en las infecciones gastrointestinales causadas por microorganismos.

Agradecimientos

Agradecemos las instalaciones de la Universidad Antonio Nariño y la Universidad pontificia Javeriana (Facultad de Ciencias), y el apoyo financiero de FODEIN-Universidad Santo Tomás (FodeinUSTA2020).

Bibliografía

1. Benini, S. R. (1999). A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure*, 7(2), 205-216.
2. Karplus, P. A. (1997). 70 years of crystalline urease: what have we learned? *Accounts of Chemical Research*, 30(8), 330-337.
3. Zambelli, B. M. (2011). Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis. *Accounts of chemical research*, 44(7), 520-530.
4. Balasubramanian, A. &. (2010). Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *Journal of molecular biology*, 400(3), 274-283.
5. Kutcherlapati, S. R. (2016). Urease immobilized polymer hydrogel: Long-term stability and enhancement of enzymatic activity. *Journal of colloid and interface science*, 463, 164-172.

6. Nabati, F. H.-R.-M. (2011). Dioxane enhanced immobilization of urease on alkyl modified nano-porous silica using reversible denaturation approach. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(1-2), 17-22.
7. Marshall, B. J. (1990). Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, 99(3), 697-702.
8. Kara, F. D. (2006). Immobilization of urease by using chitosan–alginate and poly (acrylamide-co-acrylic acid)/κ-carrageenan supports. *Bioprocess and biosystems engineering*, 29(3), 207-211.
9. Liese, A. &. (2013). Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6236-6249.
10. Sayin, S. Y. (2011). Improvement of catalytic properties of *Candida Rugosa* lipase by sol–gel encapsulation in the presence of magnetic calix [4] arene nanoparticles. *Organic & biomolecular chemistry*, 9(11), 4021-4024.
11. Matos, M. S.-L. (2012). Stabilization of glucose oxidase with cyclodextrin-branched carboxymethylcellulose. *Biotechnología Aplicada*, 29(1), 29-34.
12. Baldini, L. C. (2017). Biomacromolecule Recognition by Calixarene Macrocycles. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, 371-408.
13. Jain, V. K. (2011). Chemistry of calix [4] resorcinarenes. *Russian Chemical Reviews*, 80(1), 75.
14. Stoikov, I. I. (2016). Systems Based on Calixarenes as the Basis for the Creation of Catalysts and Nanocontainers. In *Organic Nanoreactors*, (pp. 85-110). Academic Press.
15. Ozyilmaz, E. C. (2019). Encapsulation of lipase using magnetic fluorescent calix [4] arene derivatives; improvement of enzyme activity and stability. *International journal of biological macromolecules*, 133, 1042-1050.

16. Collazos, N. G. (2019). Binding interactions of a series of sulfonated water-soluble resorcinarenes with bovine liver catalase. *International journal of biological macromolecules*, 139, 75-84.
17. Xiao, Z. P. (2010). The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catechol derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 5064-5070.
18. Amin, M. A. (2013). Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibition activities of some traditional medicinal plants. *Molecules*, 18(2), 2135-2149.
19. Taha, M. U. (2018). Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease: Synthesis and molecular modeling studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(1), 152-160.
20. Mazzei, L. C. (2019). Insights into urease inhibition by N-(n-butyl) phosphoric triamide through an integrated structural and kinetic approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(8), 2127-2138.
21. Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1-3), 9-21.
22. Zhao, J. Y. (2019). Spectroscopic and mechanistic analysis of the interaction between Jack bean urease and polypseudorotaxane fabricated with bis-thiolated poly (ethylene glycol) and α -cyclodextrin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 276-287.
23. Kazakova, E. K. (2000). Novel water-soluble tetrasulfonatomethylcalix [4] resorcinarenes. *tetrahedron Letters*, 41(51), 10111-10115.
24. Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, 39(8), 971-974.
25. Grosdidier, A. Z. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W270-W277.

26. Hanwell, M. D. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, 4(1), 17.
27. E.F. Pettersen, T. G. (2004). UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
28. Han, X. P. (2017). A resorcinarene for inhibition of A β fibrillation. *Chemical science*, 8(3), 2003-2009.
29. Moncrief, M. B. (1995). Urease activity in the crystalline state. *Protein Science*, 4(10), 2234-2236.
30. Zhou, J. T., Li, C. L., Tan, L. H., Xu, Y. F., Liu, Y. H., Mo, Z. Z., ... & Xie, J. H. (2017). Inhibition of *Helicobacter pylori* and its associated urease by palmatine: investigation on the potential mechanism. *PLoS one*, 12(1).
31. Mo, Z. Z. (2015). Andrographolide sodium bisulphite-induced inactivation of urease: inhibitory potency, kinetics and mechanism. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 238.
32. Yu, X. D. (2015). Biological evaluation and molecular docking of baicalin and scutellarin as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Journal of ethnopharmacology*, 62, 69-78.