

TRABAJOS DE COLABORACION

INSTITUTO «LOPEZ-NEYRA» DE PARASITOLOGIA.
SECCION DE FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA DEL PARASITISMO

INHIBICION DE LA UREASA POR PESTICIDAS (*)

MONTIEL, M.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M.

SUMMARY

The seed of *Citrullus vulgaris* is the one that shows a bigger urease activity of all seeds tested.

The inhibition of the urease activity produced by the different compounds tested, is given in %: Sevin, 66,7 %; Thiram, 35,2 %; Diuron, 8,5 %; and Guanidine, 11,8 %.

For the compounds that show a bigger power of inhibition (Sevin and Thiram), the type of inhibition is competitive.

It is possible to use this enzyme for the measure of pesticide residues from the groups of the carbamates and thiocarbamates.

INTRODUCCION

El empleo de pesticidas químicos para combatir plagas agrícolas ha tenido un amplio desarrollo a partir de la Segunda Guerra Mundial. Desde entonces se han vertido toneladas de componentes al medio sin tener en cuenta sus efectos nocivos sobre los seres vivos.

En diciembre de 1975 el Ministerio de Agricultura prohibió el uso de pesticidas clorados en España a partir de enero de 1977. Al restringir éstos es lógico que aumente el uso de otros pesticidas, entre ellos los carbamatos y organoclorados.

En el siguiente trabajo se ensaya la posibilidad de utilizar la enzima ureasa como reactivo analítico, para determinar la concentración de residuos de pesticidas en diferentes medios.

(*) Trabajo subvencionado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

MATERIAL Y METODOS

Se ha empleado ureasa obtenida de diferentes semillas de las familias Cucurbitáceas y Papilionáceas.

Preparación de la ureasa: Se pulverizan finamente, en un mortero, 10 gr. de semillas y se maceran con 50 ml. de fosfato dipotásico 0,01 M. Se centrifuga y, después de separar la capa lipídica, el sobrenadante se pasa por una columna de DEAE-celulosa DE-11 equilibrada con fosfato dipotásico 0,01 M. y se eluye con fosfato monopotásico 0,2 M. más ClNa 0,2 M. Se recogen dos fracciones de 50 ml. cada una, de las cuales la segunda es la que tiene actividad ureásica.

Esta fracción se dializa frente a agua desionizada durante 24 horas, renovando el agua de diálisis dos veces. Se observa después de la diálisis la formación de un precipitado que se separa por centrifugación. Este precipitado carece de actividad ureásica por lo que es desechado.

Para la determinación de la actividad se sigue la técnica de Sumner (2), usando urea al 3 por 100, tampón fosfato 0,2 M. de pH 7,0 con un tiempo de incubación de 30 minutos a 20° C.

El amoníaco liberado se mide con el reactivo de Nessler preparado según Vanselow (3) y haciendo la lectura del color producido a 430 nm. en espectrofotómetro.

La determinación de proteínas se hace por medida de la densidad óptica a 280 nm. en espectrofotómetro Beckman DBG empleando el coeficiente de extinción de 1,023 (4).

La actividad enzimática se expresa en u.u.: mg. de nitrógeno amoniacal liberado a pH 7, a 20° C durante 30 minutos.

Los inhibidores ensayados y concentración empleadas son:

Naftil —N— metil carbamato (sevin)	1,9 · 10 ⁻⁴ M.
Disulfuro de tetrametil tiuram (thiram)	— 1,2 · 10 ⁻⁴ M.
3 (3-4 diclorofenil) 1,1 dimetil urea (diuron)	1,8 · 10 ⁻⁴ M.
Guanidina	5,0 · 10 ⁻³ M.

RESULTADOS

TABLA I
ACTIVIDAD UREASICA DE LAS DIFERENTES SEMILLAS ENSAYADAS

Citrullus vulgaris (sandía)	7,22 u. u./g.
Cucumis sativus (pepino)	0,08 »
Cucumis melo (melón)	0,08 »
Cucurbita pepo (calabaza)	2,80 »
Pisum sativum (guisante)	0,22 »

Como se puede apreciar la máxima actividad corresponde a la semilla de sandía, por consiguiente los ensayos siguientes se referirán a ésta.

TABLA II
INFLUENCIA DE LA GOMA ARABIGA AL 2 %

	N.º ensayos	Media u. u./g.
Valor medio con goma y agua desionizada	5	15,37
Valor medio con goma y agua destilada	5	14,11
Valor medio sin goma y agua desionizada	5	9,32
Valor medio sin goma y agua destilada	5	7,81

TABLA III
PURIFICACION DE LA UREASA

	Actividad específica	Enriquecimiento
Extracto bruto centrifugado	0,63 u. u./mgr. prot.	—
2.ª fracción de columna	1,45 » »	242
2.ª fracción dializada	1,71 » »	269
2.ª fracción dializada y centrifugada	3,89 » »	611

TABLA IV
INHIBICION POR PESTICIDAS (MEDIA DE 10 ENSAYOS)

	Sin pesticida	Con pesticida	% de inhibición
	u. u./ml.	u. u./ml.	
Sevin	5,41	1,81	66,70
Diurón... ..	9,90	9,05	8,59
Thiram... ..	9,90	6,40	35,20
Guanidina... ..	9,90	8,73	11,82

TABLA V
TIPO DE INHIBICION. THIRAM (CON UREASA PURIFICADA)

Urea al 1 %		Urea al 3 %	
Concentración	Actividad	Concentración	Actividad
0	u. u./ml. 2,77	0	u. u./ml. 3,75
$1,25 \cdot 10^{-4}$	1,20	$1,25 \cdot 10^{-4}$	1,45
$0,25 \cdot 10^{-4}$	2,30	$0,25 \cdot 10^{-4}$	2,50
$0,12 \cdot 10^{-4}$	2,70	$0,12 \cdot 10^{-4}$	2,62

TABLA VI
TIPO DE INHIBICION. SEVIN (CON UREASA PURIFICADA)

Urea al 1 %		Urea al 3 %	
Concentración	Actividad	Concentración	Actividad
0	u. u./ml. 3,75	0	u. u./ml. 2,77
$1,99 \cdot 10^{-4}$	1,57	$1,99 \cdot 10^{-4}$	1,25
$0,38 \cdot 10^{-4}$	2,76	$0,38 \cdot 10^{-4}$	2,32
$0,19 \cdot 10^{-4}$	2,92	$0,19 \cdot 10^{-4}$	2,65

La representación gráfica del tipo de inhibición se ha hecho según Dixon (5); figura núm. 1.

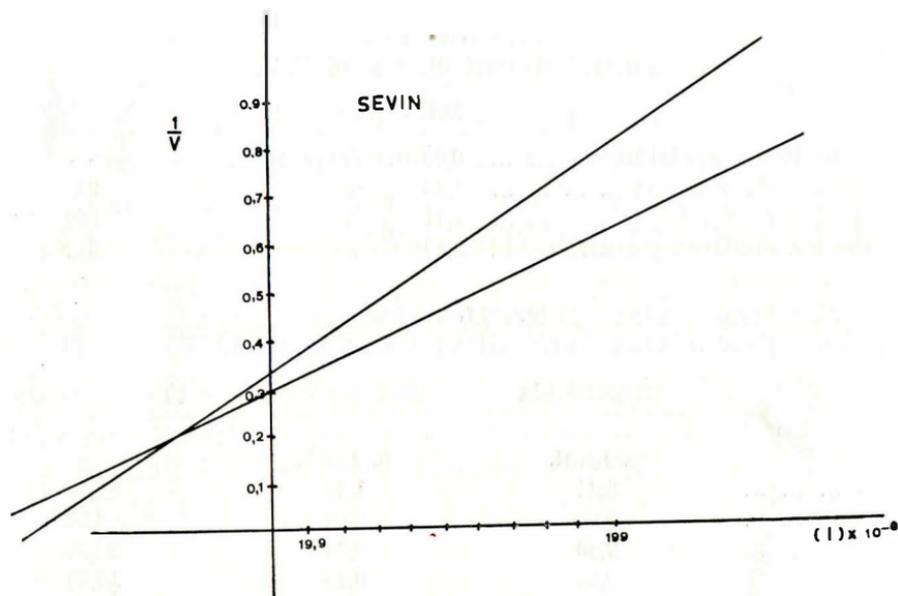


figura 1

DISCUSION

El extracto directo de la semilla de sandía presenta una gran turbidez que hace imposible la determinación colorimétrica de la actividad por lo que se ensayó una purificación por columna de DEAE-celulosa DE-11 en las condiciones antes reseñadas.

En estas condiciones se retienen en la columna la mayor parte de las proteínas (6, 7) y pasan los polisacáridos responsables de la turbidez.

En cada etapa se midió la actividad específica como se observa en la tabla III, siendo el enriquecimiento de 611.

Son varios los autores (2, 8) que han utilizado goma arábica como protectora de la reacción, por lo que decidimos ensayarla. Los resultados se expresan en la tabla II; además se ensayó con agua destilada y desionizada.

Se observó una mayor actividad cuando se usa agua desionizada y una acción protectora de la goma arábica al 2 por 100 siendo la actividad doble que cuando no se usa ésta y en presencia de agua destilada.

Esto confirma los resultados obtenidos por otros autores (2) de la acción protectora de la goma arábica y el que los iones metálicos inactivan en parte a la ureasa, ya que el agua destilada de ciertos laboratorios contiene una gran cantidad de ellos por lo que se usó agua desionizada.

Se ha encontrado una mayor inhibición para el sevin con 66,7 por 100, y el thiram, 35,2 por 100. En ambos, el tipo de inhibición es competitiva.

Dada la estructura de los inhibidores, el tanto por ciento de inhibición y el tipo de inhibición podría considerarse que la inhibición de la ureasa se produce en la segunda fase de la hidrólisis de la urea, supuesto que ésta (9) pasa a CO_2 y NH_3 a través de la formación de carbamato amónico.

Actuarían como inhibidores fuertes los carbamatos (sevin) y tiocarbamatos (thiram) y débilmente los derivados de la urea (diuron) e iminourea (guanidina).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

De todas las semillas ensayadas la que manifiesta mayor actividad ureásica es la semilla de *Citrullus vulgaris* (sandía).

Los tantos por ciento de inhibición de la actividad ureásica producidos son:

Sevin, 66,7 por 100; thiram, 35,2 por 100; diuron, 8,5 por 100, y guanidina, 11,8 por 100.

El tipo de inhibición, para los de mayor poder de inhibición (sevin y thiram), es competitivo.

Es posible utilizar este enzima para la medida de residuos de pesticidas del grupo de los carbamatos y tiocarbamatos.

SOMMAIRE

De toutes les semences essayées, celle qui démontre la plus grande activité uréasique est la semence du *citrullus vulgaris* (melon d'eau).

Le pourcentage d'inhibition de l'activité uréasique produit est: Sevin, 66,7 %; Thiram, 35,2 %; Diuron, 8,5 %; et Guanidine, 11,8 %.

Le type d'inhibition, pour ceux qui ont un plus grand pouvoir d'inhibition (Sevin et Thiram), est compétitif.

On peut utiliser cet enzyme pour la mesure de résidus de pesticides du groupe des carbamates et thiocarbamates.

SUMARIO

De todas las semillas ensayadas la que manifiesta mayor actividad ureásica es la semilla de *Citrullus vulgaris* (sandía).

Los tantos por ciento de inhibición de la actividad ureásica producidos son: Sevin, 66,7 %; Thiram, 35,2 %; Diuron, 8,5 %; y Guanidina, 11,8 %.

El tipo de inhibición, para los de mayor poder de inhibición (Sevin y Thiram) es competitivo.

Es posible utilizar este enzima para la medida de residuos de pesticidas del grupo de los carbamatos y tiocarbamatos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) B. O. E. núm. 308, de 24 de diciembre de 1975. Orden del Ministerio de Agricultura 26553, de 4 de diciembre de 1975, por la que se restringe el uso de ciertos plaguicidas de elevada persistencia.
- (2) SUMMER, J. B., and HAND (1928). Citado por Sumner, J. B. *Ureasa. Methods in Enzymology*, 2, 378. Academic Press, 2.^a ed. 1960.
- (3) VANSELOW, A. P. (1950). Citado por Zamora, A. (1954). Determinación del contenido de Amoníaco en la sangre. Nivel normal en la sangre humana. *Rev. Inst. Ibys*, 3, 188.
- (4) MONTEOLIVA HERNÁNDEZ, M. (1973): Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. I. Componentes del líquido perivisceral. *Rev. Iber. Parasitol.*, 33, 407.

- (5) DIXON, M. (1953): The determination of enzyme inhibitor constant. *Biochem. J.*, 55, 170.
- (6) LÓPEZ GORGÉ, J., y MONTEOLIVA HERNÁNDEZ, M. (1966): Algunas aportaciones al fraccionado proteico del suero con DEAE-celulosa. *Rev. esp. Fisiol.*, 22, 127.
- (7) HERMOSO, R., y MONTEOLIVA, M. (1974): Bioquímica del *Ascaris lumbricoides*. V. Variaciones durante la supervivencia en ayunas de los componentes azucarados, en diversos tejidos. *Rev. Iber. Parasitol.*, 34, 295.
- (8) SUMNER, J. B., and MYRBACK, K. Z. (1930). Citado por Sumner, J. B., and Somers, G. F. *Chemistry and methods of enzymes*, 159. Academic Press, 3.^a ed. 1953.
- (9) SUMNER, J. B.; HAND, D. B., and HOLLOWAY, R. G. (1931). Citado por Sumner, J. B., and Somers, G. F. *Chemistry and methods of Enzymes*, 158. Academic Press, 3.^a ed. 1953.