

Estudio *in vitro* de la inhibición de ureasa por compuestos derivados del ácido piridin-hidroxámico

Carlos Michell Alvarado Ramírez¹, Miguel A. Vázquez-Guevara², Yolanda Alcaraz-Contreras³

¹Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

²Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

³Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio sobre la enzima ureasa de cuatro compuestos derivados del ácido piridin-hidroxámico. La actividad enzimática fue medida mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción fenol-hipoclorito para cuantificar el amoníaco liberado. Los compuestos fueron preparados en soluciones de 1 mg/mL y se ensayaron en concentraciones decrecientes, utilizando tiourea como el estándar de referencia. De los cuatro compuestos evaluados, tres mostraron una buena actividad inhibitoria dependiente de la concentración. El derivado con grupo metoxi fue el más efectivo, con un 65.1% de inhibición a una concentración de 1 mg/mL; seguido del compuesto halogenado, que presentó un 54.1% de inhibición a 0.7 mg/mL, y finalmente el no sustituido, con un 49.6% a 1 mg/mL. Por otro lado, el compuesto con un grupo nitro en su estructura, no mostró actividad inhibitoria. Estos resultados sugieren que la presencia de grupos funcionales donadores o aceptores de electrones influyen de manera significativa en la capacidad inhibitoria sobre la ureasa. Este estudio contribuye al diseño de nuevos inhibidores de ureasa, con potencial aplicación en el ámbito clínico para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

Palabras clave: Ureasa; ácido piridin-hidroxámico; tiourea; *Helicobacter pylori*.

Introducción

La ureasa es una enzima expresada por diversas plantas, hongos y bacterias y está directamente asociada con el factor de virulencia de muchas bacterias, ya que, cataliza la hidrólisis de la urea para producir amoníaco y dióxido de carbono, que generan un microambiente alcalino que protege a las bacterias de la acidez gástrica de tal forma que permiten su desarrollo y crecimiento (Fiori-Duarte, A. T. et al. 2020). Esta enzima, es producida por diversas especies bacterianas como *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). (Kolopaking M. S. 2022).

H. pylori es una bacteria gramnegativa, microaerófila y flagelada que se encuentra predominantemente en el tracto gastrointestinal. Esta bacteria también es conocida por cambiar su forma de espiral a cocoide, lo que le ayuda a sobrevivir mejor en el ambiente gástrico. Se sabe que se transfiere principalmente entre personas por vía oro-oral o fecal-oral. *H. pylori* está clasificada como un carcinógeno de clase uno y su presencia en el tracto gastrointestinal está asociada a padecimientos como úlceras duodenales, gástricas, gastritis, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a las mucosas. La infección por *H. pylori* es la más común en el mundo, alcanzando una prevalencia del 50%, mientras que en México se ha reportado una prevalencia del 66%, con rangos del 48% al 83%. (Tabesh, A. et al 2024).

El tratamiento actual para *H. pylori* se basa en una combinación de antibióticos, como claritromicina, amoxicilina y metronidazol, y fármacos supresores de ácido como los inhibidores de la bomba de protones. Sin embargo, las tasas de erradicación de este esquema terapéutico han estado disminuyendo principalmente por los altos niveles de resistencia a los antibióticos (Sharaf, M. et al 2021). La ureasa al ser la principal enzima responsable de la hidrólisis de la urea en amoníaco, un proceso esencial para el suministro energético de la bacteria como para la creación de un microambiente favorable que le permite sobrevivir, representa un blanco terapéutico de interés. En este sentido, varios estudios han demostrado que los inhibidores de la ureasa pueden ser útiles para el tratamiento de una infección por *H. pylori* (Asgari, M. S. et al 2020).

Los ácidos hidroxámicos, son agentes quelantes derivados de las hidroxilaminas y los ácidos carboxílicos. Recientemente, estas moléculas y sus derivados han recibido gran atención debido a sus múltiples actividades biológicas, tales como promotores del crecimiento, antibióticos, antifúngicos, inhibidores de enzimas, antitumorales y antioxidantes (Chello, A. 2022). Los ácidos hidroxámicos poseen una importante

propiedad quelante, ya que tienden a formar complejos fuertes con una variedad de metales de transición, y suele intervenir en la unión de los iones metálicos del sitio activo para inactivar la ureasa. Por lo tanto, se han sintetizado algunos derivados de ácidos hidroxámicos y se han evaluado como posibles agentes para tratar las infecciones por *H. pylori* (Shi, W.K. et al 2016).

En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación *in vitro* de la capacidad inhibitoria de compuestos derivados del ácido piridin-hidroxámicos sobre la actividad de la enzima ureasa.

Metodología

El ensayo para evaluar la actividad de compuestos derivados del ácido piridin-hidroxámico sobre la inhibición de la enzima ureasa, se basó en la cuantificación del amoníaco liberado mediante la reacción colorimétrica de fenol-hipoclorito, conforme al método descrito por Weatherburn (1967). Esta metodología fue probada y posteriormente ajustada a las condiciones experimentales descritas a continuación.

Se prepararon cuatro soluciones principales: un amortiguador de fosfatos 100 mM ajustado a pH de 7.4; la solución A, compuesta por 5 g de fenol, 25 mg de nitroprusiato de sodio y 500 mL de agua destilada; la solución B, con 2.5 g hidróxido de sodio, 4.2 mL de hipoclorito de sodio y 500 mL de agua destilada; y finalmente una solución de urea a 30 mM como sustrato.

Se evaluaron 4 compuestos derivados del ácido piridin-hidroxámico, los cuales fueron sintetizados y proporcionados por el grupo de investigación de síntesis orgánica del Dr. Miguel A. Vázquez. Las estructuras de los compuestos se muestran en la figura 1. Para su evaluación se prepararon soluciones de cada uno a una concentración de 1 mg/mL, su solubilidad fue evaluada en metanol, etanol, acetonitrilo, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF).

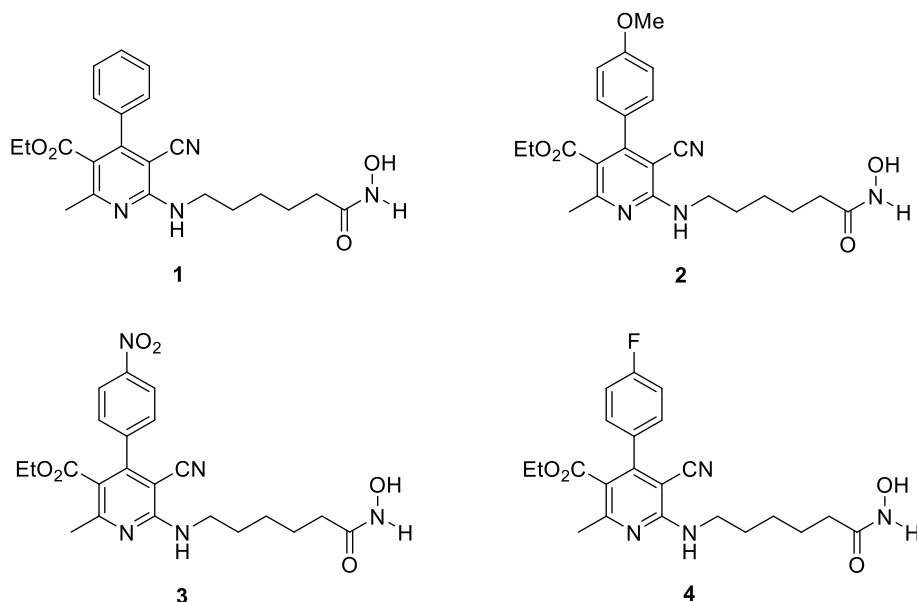


Figura 1. Moléculas derivadas del ácido piridin-hidroxámico utilizadas para el ensayo de inhibición de la ureasa

Para evaluar el potencial de inhibición de la ureasa, se prepararon cinco diluciones de los compuestos en un rango de 0.04375 a 1 mg/mL las cuales fueron comparadas con la tiourea como un inhibidor estándar.

La reacción enzimática se llevó a cabo en tubos de 1.5 mL, donde se mezclaron 850 μ L de solución de urea (30 mM), 100 μ L de la solución del compuesto evaluado y 15 μ L de una solución de la ureasa a una concentración de 1 U/mL. La mezcla fue agitada brevemente en un vórtex a velocidad media y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalizado este periodo, se transfirieron 0.5 mL de la mezcla de reacción a tubos de ensayo, y se añadieron 1 mL de la solución A y 1 mL de la solución B. Posteriormente, la mezcla se agitó suavemente y se dejó incubar durante 50 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del complejo colorimétrico.

La mezcla resultante fue transferida a una celda para lectura en el espectrofotómetro UV para medir la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm.

El porcentaje de inhibición de la enzima fue calculado utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de inhibición} = [100 - (A_p/A_c)] \times 100$$

donde A_p = absorbancia del compuesto de prueba, A_c = absorbancia del control negativo.

Resultados

Los 4 compuestos presentaron buena solubilidad en acetonitrilo, DMSO y DMF, sin embargo, al evaluar el efecto de los disolventes en el sistema de reacción enzimática encontramos que había interferencia con la reacción. Por un lado, el acetonitrilo aumentó la formación de complejo mientras que el DMSO inhibió completamente la formación del complejo colorimétrico. La DMF no interfirió con la reacción ni alteró los resultados del ensayo mostrando resultados similares a los del amortiguador de fosfatos por lo que fue el solvente elegido para disolver los compuestos. En la tabla 1 se muestran la proporción de DMF y amortiguador de fosfatos que fue utilizada para preparar los compuestos.

Tabla 1. Solubilidad de los compuestos para la preparación de soluciones a concentración de 1 mg/mL

Compuesto	Solubilidad
1	300 µL DMF + 700 µL amortiguador
2	200 µL DMF + 800 µL amortiguador
3	100 µL DMF + 900 µL amortiguador
4	150 µL DMF + 850 µL amortiguador

Respecto a los resultados de inhibición de la ureasa encontramos que los compuestos **1, 2 y 4** mostraron inhibición de la ureasa en diferente proporción, en cambio el compuesto **3** no mostró efecto a ninguna concentración evaluada. En la tabla 2 se muestran el porcentaje de inhibición de ureasa a las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición enzimática de los compuestos analizados a diferentes concentraciones.

Concentración (mg/mL)	% inhibición Compuesto			Concentración (mg/mL)	% inhibición Compuesto
	1	2	3		4
1	49.6	65.1	SA	0.7	54.1
0.5	35.4	44.1	SA	0.35	26.6
0.25	4.9	24.6	SA	0.175	6.9
0.125	SA	3.5	SA	0.0875	SA
0.0625	SA	SA	SA	0.04375	SA

SA=sin actividad

Discusión

Debido a la asociación de la ureasa con diferentes infecciones bacterianas, se han sintetizado varios tipos de inhibidores de la ureasa, como las bases de Schiff-sulfonamidas, los derivados de fosfato, los derivados de tiourea, el ácido hidroxámico, los quelantes de níquel en el sitio activo, los compuestos de tiolato, los análogos del ácido barbitúrico (tiobarbitúricos, barbitúricos) y las tiosemicarbonas. (Yaqoob, S. et al. 2022). Los derivados del ácido piridin-hidroxámico evaluados en el presente trabajo fueron sintetizados y seleccionados considerando incluir compuestos con grupos funcionales con diferentes propiedades electrónicas en la posición C4 del anillo aromático. Los resultados mostraron que tres de los compuestos evaluados fueron activos sobre la ureasa mostrando una capacidad de inhibición que fue dependiente de la concentración. El compuesto **1** el cual no tiene sustituyente en el anillo aromático, en su concentración más alta, mostró una inhibición enzimática del 49%. El compuesto **2** con el grupo metoxi, un grupo donador de densidad electrónica mostró, en su concentración más alta, una inhibición del 65%. El compuesto **4** con el halógeno, mostró, en su concentración más alta, una inhibición del 54%. Encontramos que el grupo nitro, un atractor de densidad electrónica, afectó la capacidad de inhibición enzimática ya que el compuesto **3** en ninguna de las concentraciones evaluadas mostró actividad. Si bien, la cadena alquílica que conecta al heterociclo con el hidroxámico puede ser determinante para la actividad, encontramos que la presencia de grupos funcionales que atraen la densidad electrónica puede afectar el poder de inhibición enzimática.

Se han descrito numerosas moléculas antiureasa, entre ellas imidazoles y derivados del ácido benzohidroxámico. Sin embargo, lamentablemente, todos estos agentes también presentan efectos adversos. Por lo tanto, es necesario identificar agentes antiureasa más eficaces con baja toxicidad y alta biodisponibilidad. La clase de compuesto orgánico tiourea contiene azufre y tiene una semejanza estructural con la urea, es decir, el átomo de oxígeno es reemplazado por el átomo de azufre; mostraron excelentes aplicaciones biológicas, especialmente como una actividad antiureasa. Además de esto, también se ha encontrado que la tiourea y sus derivados exhiben varias actividades farmacológicas tales como actividad antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva, antiepiléptica, anticancerígena y antibacteriana para el tratamiento de varias coinfecciones y enfermedades mortales incluyendo insuficiencia renal, sepsis y varios tipos de cáncer. (Rasheed, S. et al. 2022) Recientemente, muchas investigaciones que examinan inhibidores de ureasa basados en tiourea han desarrollado derivados de tiourea que presentan mayor potencia inhibitoria que sus contrapartes de urea. Khan y colaboradores sintetizaron una variedad de tioureas sustituidas y han examinado su actividad inhibitoria de la ureasa. (Khan K. M. et al. 2014) Las sustituciones con grupos funcionales unidos al anillo fenilo o heterocíclico alrededor del núcleo de tiourea y los compuestos con sustituyentes que contienen pares de electrones solitarios ejercen un efecto decisivo en la actividad inhibitoria de la ureasa. (Rego, Y. F. et al., 2018)

Conclusiones

Este trabajo representa una primera etapa de un proyecto en el cual se considera continuar con el proceso de evaluación de compuestos donde se puedan incluir otros heterociclos y diferentes tamaños de cadena alquílica, entre los heterociclos considerados están cumarinas y triazoles por lo que el alcance de la estandarización de esta metodología contribuirá a la evaluación biológica de inhibidores de ureasas. Por otro lado, derivado de los resultados de este proyecto se tiene contemplado iniciar estudios teóricos-computacionales con la finalidad de evaluar la interacción con el sitio activo de la enzima y poder contribuir con la generación de conocimiento sobre el desarrollo de potenciales candidatos inhibidores de ureasa.

Bibliografía

- 1) Fiori-Duarte, A. T., Rodrigues, R. P., Kitagawa, R. R., & Kawano, D. F. (2020). Insights into the Design of Inhibitors of the Urease Enzyme - A Major Target for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infections. *Current medicinal chemistry*, 27(23), 3967–3982. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190301143549>
- 2) Kolopaking M. S. (2022). Urease, Gastric Bacteria and Gastritis. *Acta medica Indonesiana*, 54(1), 1–2.
- 3) Tabesh, A., Antillon, R. A., Kondradzhyan, M., & Tan, A. Z. (2024). Prevalence and resistance of *Helicobacter pylori* in a predominantly Hispanic population. *World journal of gastrointestinal endoscopy*, 16(9), 526–532. <https://doi.org/10.4253/wjge.v16.i9.526>

- 4) Sharaf, M., Arif, M., Hamouda, H. I., Khan, S., Abdalla, M., Shabana, S., Rozan, H. E., Khan, T. U., Chi, Z., & Liu, C. (2021). Preparation, urease inhibition mechanisms, and anti-*Helicobacter pylori* activities of hesperetin-7-rhamnoglucoside. *Current research in microbial sciences*, 3, 100103. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100103>
- 5) Asgari, M. S., Azizian, H., Nazari Montazer, M., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Asadi, M., Sepehri, S., ... & Mahdavi, M. (2020). New 1, 2, 3-triazole-(thio) barbituric acid hybrids as urease inhibitors: design, synthesis, in vitro urease inhibition, docking study, and molecular dynamic simulation. *Archiv der Pharmazie*, 353(9), 2000023.
- 6) Shi, W.-K., Deng, R.-C., Wang, P.-F., Yue, Q.-Q., Liu, Q., Ding, K.-L., Yang, M.-H., Zhang, H.-Y., Gong, S.-H., Deng, M., Liu, W.-R., Feng, Q.-J., Xiao, Z.-P., & Zhu, H.-L. (2016). 3-Arylpropionylhydroxamic acid derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors: Synthesis, molecular docking and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(19), 4519–4527. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.052>
- 7) Chello, A. (2022). Síntesis de ácidos grasos hidroxámicos (FHA) a partir de aceite de coco usando lipasa como catalizador. *Influence: International Journal of Science Review*, 4(2), 327-333.
- 8) Weatherburn, M. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, 39(8), 971-974.
- 9) Rasheed, S., Aziz, M., Saeed, A., Ejaz, S. A., Channar, P. A., Zargar, S., Abbas, Q., Alanazi, H., Hussain, M., Alharbi, M., Kim, S. J., Wani, T. A., & Raza, H. (2022). Analysis of 1-Aroyl-3-[3-chloro-2-methylphenyl] Thiourea Hybrids as Potent Urease Inhibitors: Synthesis, Biochemical Evaluation and Computational Approach. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11646. <https://doi.org/10.3390/ijms231911646>
- 10) Khan K.M., Naz F., Taha M., Khan A., Perveen S., Choudhary M.I., Voelter W. (2014). Synthesis and in vitro urease inhibitory activity of N,N'-disubstituted thioureas, *European Journal of Medicinal Chemistry*, (74), 314-323. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.001>
- 11) Rego, Y. F., Queiroz, M. P., Brito, T. O., Carvalho, P. G., de Queiroz, V. T., de Fátima, Â., & Macedo, F., Jr (2018). A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *Journal of advanced research*, 13, 69–100. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.003>
- 12) Yaqoob, S., Hameed, A., Ahmed, M., Imran, M., Qadir, M. A., Ramzan, M., ... & Muddassar, M. (2022). Antiurease screening of alkyl chain-linked thiourea derivatives: in vitro biological activities, molecular docking, and dynamic simulations studies. *RSC advances*, 12(10), 6292-6302.