

# Aplicación foliar de níquel en *Cucurbita ficifolia* Bouché para producción de ureasa (EC 3.5.1.5) cristalina

## Foliar nickel application to *Cucurbita ficifolia* Bouché for crystalline urease (EC 3.5.1.5) production

Pedro José Almanza M.<sup>1,3</sup>, Hugo Alfonso Rojas S.<sup>2</sup>, Gloria del Carmen Borda G.<sup>2</sup>, Alba Ruth Galindo A.<sup>2</sup> y Diana Rocío Galindo A.<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se evaluó el efecto de la aplicación foliar de níquel en plantas de *Cucurbita ficifolia* (lacayote), en concentraciones de 1,0; 2,5 y 5,0 mg L<sup>-1</sup> y un testigo sin aplicación; se valoró la incidencia en las semillas para la producción de ureasa cristalina, con el fin de realizar estudios enfocados a una mejor producción de ureasa y aprovechando la relación del níquel con esta enzima. Se observó el crecimiento y desarrollo morfológico de las plantas desde la primera aplicación hasta fructificación. Se determinó la cantidad de níquel y ureasa en las semillas, liofilizando la ureasa obtenida, el efecto de las concentraciones de enzima y sustrato, temperatura y pH sobre la actividad enzimática de la ureasa. Se analizó y se comparó la enzima obtenida con la ureasa de uso clínico en muestra de orina. En todas las plantas, el Ni causó fitotoxicidad; el crecimiento de frutos y semillas fue indirectamente proporcional a las concentraciones aplicadas. La adición de 1,0 y 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni fue soportada por las plantas, pero se presentó clorosis intervenal. Las concentraciones de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni causaron senescencia total de flores en 100% de las plantas, impidiendo la fructificación. La cantidad de ureasa obtenida fue directamente proporcional a las concentraciones de níquel aplicadas. En todos los estudios catalíticos evaluados, la actividad de la ureasa en su orden fue: 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni > testigo > 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni. La ureasa obtenida de cada uno de los tratamientos tuvo rendimiento menor que la ureasa comercial.

**Palabras clave:** actividad catalítica, enzimas, semillas, fitotoxicidad, liofilización.

### ABSTRACT

The effect of nickel foliar application to plants of *Cucurbita ficifolia* (tropical squash) was evaluated at 1.0, 2.5 and 5.0 mg L<sup>-1</sup> concentrations, and on a control experiment, in terms of later extraction of crystalline urease from the seeds. This work is intended to contribute to studies that aim at increasing the production of this enzyme, which is closely related to nickel. Thus, after determining seed nickel and urease contents, the extracted enzyme was lyophilized. The effects of enzyme and substrate concentrations, temperature and pH on extracted urease catalytic activity were analyzed and compared to conventional clinical urease, by testing their performance on urine samples. Nickel applications were found to cause phytotoxicity on all plants. Plant growth and vegetative development were registered from the initial application through fructification. Fruit and seed growth were indirectly proportional to the concentrations used. The 5.0 mg L<sup>-1</sup> Ni concentration caused flower senescence in 100% of the plants, therefore preventing fructification. The 1.0 and 2.5 mg L<sup>-1</sup> concentrations were tolerated by the plants, but intervein chlorosis was observed. Contrarily, extracted urease amounts were directly proportional to applied Ni concentrations. In all cases, urease catalytic response to Ni concentration was maximum at 1.0 mg L<sup>-1</sup>, medium for the control treatment, and minimum at 2.5 mg L<sup>-1</sup>. The extracted urease had a weaker performance when compared to the commercial one.

**Key words:** catalytic activity, enzymes, seeds, phytotoxicity, lyophilization.

## Introducción

La relación de algunos metales pesados con las enzimas de las plantas es un tema de importancia en la investigación de las últimas décadas. Por esta razón, se ha incrementado el interés por conocer los efectos de metales pesados sobre el metabolismo y desarrollo de las plantas, con el fin de hacerlos más provechosos para la generación de productos derivados de estas.

El níquel ha sido reconocido desde el año 2004 por la Asociación Americana oficial de Control de Nutrientes Vegetales, como elemento esencial en plantas (Wood *et al.*, 2004), dada su relación con la enzima ureasa como catalizador o inhibidor y constituyente de esta (Dixon *et al.*, 1975). El níquel es requerido por las plantas superiores en cantidades “traza” y es fitotóxico en altas concentraciones. Contreras *et al.* (2006) reportan que la planta *Chorella vulgaris* requiere níquel para su crecimiento, y se indica la

Fecha de recepción: 16 de julio de 2008. Aceptado para publicación: 19 de febrero de 2009

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Ecofisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja.

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Catálisis, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja.

<sup>3</sup> Autor de correspondencia. ppcalma@gmail.com

necesidad de este elemento para el crecimiento de la cebada. A pesar de los estudios realizados, es muy poco lo que se conoce acerca del metabolismo o la función metabólica del níquel, comparado con otros microelementos.

Las fuentes para la obtención de esta enzima se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, destacando microorganismos, residuos industriales y orgánicos, y semillas de plantas de las familias anonáceas, leguminosas y cucurbitáceas (Vicente *et al.*, 1975). En la actualidad, las principales fuentes de ureasa son los microorganismos y la semilla o frijol Jack bean, debido a que su rendimiento es considerable, con relación a las otras fuentes. La importancia de esta enzima está ligada a la hidrólisis de la urea para contribuir al metabolismo del nitrógeno, a sus aplicaciones en la industria alimentaria, en el campo agronómico y en la medicina.

Vicente *et al.* (1975) comprobaron que la ureasa se encuentra ligada a la fracción celulósica de la pared de células de cotiledones de diferentes variedades de cucurbitáceas, entre ellas *Cucurbita ficifolia*. Esta planta está estrechamente emparentada con las distintas variedades de *Cucurbita* spp., aunque es atípica en sus caracteres cromosómicos y bioquímicos con respecto a ellas. Actualmente *Cucurbita ficifolia* es cultivada en diferentes países, principalmente para su uso en gastronomía, empleándose las flores y los brotes como verdura, y el fruto maduro y su semilla para la elaboración de dulces (Barrera *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de diferentes dosis en aplicaciones foliares de níquel en plantas de calabaza y determinar la incidencia en las semillas en la producción de ureasa cristalina.

## Materiales y métodos

Las semillas de calabaza se obtuvieron de un cultivo en el municipio de Simijaca, Cundinamarca. El fertilizante "Lignosulfonato de níquel" fue donado por la empresa Nipan LLC en Valdosta, GE, USA. Para los procesos de laboratorio se utilizaron: acetona al 99,57%, urea al 99,3% de pureza y éter de petróleo de la casa comercial J. T. Baker, México; fosfato de ácido de potasio al 97%, fosfato diácido de potasio al 95%, nitroprusiato de sodio al 95% de pureza y ureasa liofilizada de Merck (Darmstadt, Alemania); ácido clorhídrico al 37% de la casa comercial Riedel-de Hën (Hannover, Alemania); carbón activado, fenol al 99,5% de Panreac, Barcelona (España) e hipoclorito de sodio al 30% de pureza.

Para el establecimiento del cultivo se seleccionaron semillas del tercio medio de frutos maduros de calabaza y se

sometieron a secado en sombra durante diez días en condiciones ambientales normales. La germinación se indujo cultivándolas en sustrato humus y aserrín en proporción 5:1, sembrando dos semillas por bolsa.

## Aplicaciones foliares de níquel y cosecha

La dilución del fertilizante se hizo en agua ultra pura, para asegurar así su efectividad y descartar posibles impurezas. Se hicieron tres aplicaciones foliares de "Níquel Plus", en concentraciones de 1,0; 2,5 y 5,0 mg L<sup>-1</sup> para los tratamientos 1, 2 y 3, respectivamente, y un testigo sin aplicación; la primera aplicación se hizo 157 días después del trasplante, cuando las plantas tenían entre 10 y 20 flores masculinas por una flor femenina. Las aspersiones foliares para todos los tratamientos se hicieron cada 15 d, cosechándose aleatoriamente tres frutos maduros por tratamiento.

## Determinación de la concentración de níquel en las semillas

Se tomaron 50 g de semillas de cada tratamiento, incluido el testigo, y se analizó la concentración de Ni mediante espectrofotometría de absorción atómica, con un equipo PerkinElmer 3110 (Boston, MA, USA) con lámpara múltiple de cátodo hueco para análisis de Co, Cr, Cu, Fe, Mn y Ni (calibrando con patrones Merck, bajo la norma AWWA 3500 Ni AB 92).

## Purificación de la enzima ureasa

Para la extracción de ureasa, se secaron 200 g de semillas de *C. ficifolia* por cada tratamiento a temperatura ambiente bajo sombra durante 15 d; triturando 100 g de cada muestra se delipidaron, sometiéndolas a reflujo (extracción Soxhlet) a temperatura de 40°C durante 12 h utilizando como solvente éter de petróleo. La ureasa se extrajo siguiendo el método propuesto por M. Alemany en 1982 (Borda *et al.*, 1998; Bolívar y Méndez, 2000). El filtrado resultante fue llamado "extracto crudo".

## Aislamiento enzimático o purificación de la enzima

Al extracto crudo se le adicionó acetona a 0°C en relación 2:1 para precipitar algunas proteínas y demás enzimas presentes; el aislamiento de ureasa se realizó con ultrafiltración utilizando un filtro con tamaño de poro de 0,45 µm. Se comprobó la pureza y concentración de la enzima extraída en cada una de las muestras mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); se usó una columna Synchropak Propil de fase reversa ID 100 \* 4,6 (volumen fijo inyectado de 20 µL, lectura de absorbancia 208 nm, velocidad de flujo 0,75 mL min<sup>-1</sup>, tiempo empleado de 15 min, y fase móvil buffer fosfato pH 7); como referencia para la cuantificación se utilizó la ureasa liofilizada de Merck. Las muestras de

ureasa obtenidas se liofilizaron empleando una temperatura de congelación de  $-50^{\circ}\text{C}$  y una presión de 7,6 mbar por 6 h, en un equipo de liofilización Synchropak Propyl Freeze Dry System/ freezone 4.5.

Para obtener resultados confiables en la evaluación de los parámetros cinéticos iniciales evaluados fue necesario realizar una determinación de amoniaco no ureico en la urea y en los extractos de ureasa provenientes de las semillas, mediante la prueba de Bertheloth modificado (Borda *et al.*, 1998; Bolívar y Méndez, 2000).

### Estudios cinéticos iniciales

Se observó el efecto de la concentración de enzima, concentración de sustrato, pH y temperatura sobre la actividad de la enzima liofilizada, utilizando el método colorimétrico Berthelot-modificado (Borda *et al.*, 1998; Bolívar y Méndez, 2000).

El paralelo de actividad se realizó en muestra de orina en el Hospital Regional San Rafael de Tunja. La muestra de orina fue diluida con agua destilada en proporción 1:50. La cuantificación de urea en muestra de orina se realizó en una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de esta muestra diluida; se tomó como cantidad de enzima liofilizado 2  $\mu\text{g}$  por cada tratamiento; se utilizó buffer fosfato pH 6,9 y temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , el equipo utilizado fue un espectrofotómetro UV-Visible PerkinElmer Lamda 2; la enzima usada por el hospital fue ureasa  $> 500 \text{ U mL}^{-1}$  de la casa comercial Biosystems (Barcelona, España).

**Análisis estadístico.** El cultivo fue establecido según un diseño experimental de bloques al azar, con tres réplicas,

sembrando a una distancia de 2,0 m entre plantas y 2,5 m entre surcos; con una densidad de siembra de 10 plantas por unidad experimental. Con el fin de controlar el efecto entre tratamientos adyacentes, se dejaron distancias de 1,0 m entre unidades experimentales y de 2,5 m entre bloques. Para el análisis de datos se utilizó el análisis de correlación múltiple, en donde se estudió la relación entre las variables. Sin embargo, este análisis se tuvo en cuenta como una orientación del posible comportamiento de la enzima, dado que la estadística no podría indicar datos concretos con respecto al comportamiento de las enzimas, considerando que estas no son estructuras estáticas y su actividad depende de diferentes factores.

## Resultados y discusión

### Efecto del níquel en el desarrollo y crecimiento de plantas

Las plantas con aplicación de níquel estuvieron afectadas fisiológicamente; experimentaron toxicidad gradual a través del tiempo y presentaron clorosis intervenal de hojas, siendo más notorio en las hojas viejas. En estudios realizados con respecto a la fitotoxicidad del níquel en trigo, el síntoma característico presentado en las hojas es una clorosis longitudinal (Mishra y Kar, 1994; Setia *et al.*, 1988 y Díaz *et al.*, 2001). La severidad de los síntomas aumentó después de las dos siguientes aplicaciones (Fig. 1); esta fue directamente proporcional a la concentración de Ni aplicado. Se corrobora que el níquel es un elemento fitotóxico cuando está presente en altas concentraciones en las plantas, como lo mencionan Sheoran y Singh.

Posterior a las fertilizaciones con níquel, el crecimiento de las plantas disminuyó y fue lento para plantas cuyas



**FIGURA 1.** Síntomas de fitotoxicidad por níquel en *Cucurbita ficifolia*, 15 d después de la tercera aplicación. Izq.  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de Ni. Der.  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de Ni.

aplicaciones fueron de 1,0 y 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni con respecto al testigo. La respuesta a estos efectos observados se debió posiblemente a que el Ni<sup>2+</sup> fue transportado rápidamente a los sitios metabólicamente activos ocasionando múltiples efectos tóxicos en el crecimiento como lo establecieron Mishra y Kar (1974); Krämer *et al.* (1997) y Díaz *et al.* (2001); e interfirió en la absorción y translocación de otros nutrientes a los diferentes órganos de las plantas provocando deficiencias, como lo comprobaron Rubio *et al.* (1994). Díaz *et al.* (2001) mencionan que el ion Ni<sup>2+</sup> puede competir por los sitios de transporte de los cationes divalentes (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>). De ahí que varios autores han sugerido que el síntoma de la clorosis intervenal en las hojas causado por el Ni se debe a una deficiencia de Fe, pero también a interferencias del Ni con la síntesis de clorofila.

En las plantas fertilizadas con 5,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni el crecimiento fue más lento a partir de la segunda aplicación comparado con los tratamientos de 1,0 y 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Las flores tanto femeninas como masculinas presentaron senescencia desde la base de los zarcillos hacia el ápice, por tanto no hubo producción de frutos. Se deduce que estos efectos fueron causa de acumulaciones de Ni<sup>2+</sup> en los órganos reproductores que impidieron la realización normal de las reacciones metabólicas de la planta, consecuencia de deficiencias por otros elementos.

Los efectos de las aplicaciones incidieron también en el tamaño de frutos y semillas, siendo estos indirectamente proporcionales a las cantidades aplicadas, así, los frutos de mayor tamaño fueron los del testigo y los de menor los del tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni aplicado. Sin embargo, todos tuvieron madurez igual en tiempo y desarrollo. Las semillas tuvieron un desarrollo normal, pero el crecimiento también se vio afectado.

### Concentración del níquel en las semillas

Las concentraciones de níquel en semillas fueron directamente proporcionales a las aplicaciones realizadas. Se podría asumir que el Ni aplicado fue transportado a las semillas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Sauerbeck (1991), quien sugirió una movilización de este elemento de las partes vegetativas a las reproductivas, para posteriormente acumularse en las semillas (Mishra y Kar, 1974).

El incremento de níquel entre tratamientos de aplicaciones de 1,0 y 2,5 mg L<sup>-1</sup> con respecto al testigo fue de 17% y 22%, respectivamente, y entre estos, de 3,6%. Por tanto, a mayor concentración de Ni aplicado, mayor será el contenido de níquel en las semillas de *C. ficifolia*, siempre y cuando las

aplicaciones de este elemento sean inferiores a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Estos resultados comprueban que la amplitud de la variación del contenido de este elemento en las plantas es acorde con la disponibilidad de níquel en el medio de desarrollo (Hernández, 2002).

### Determinación y pureza de ureasa en extractos enzimáticos

Se confirmó presencia de ureasa en las muestras de acuerdo con los resultados obtenidos mediante HPLC, lo cual reafirman los resultados de Vicente *et al.* (1975) en cucurbitáceas. Los cromatogramas del testigo y tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni mostraron elevada pureza; el cromatograma del tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni (Fig. 2), señaló impurezas que podrían ser péptidos o proteínas diferentes a la ureasa.

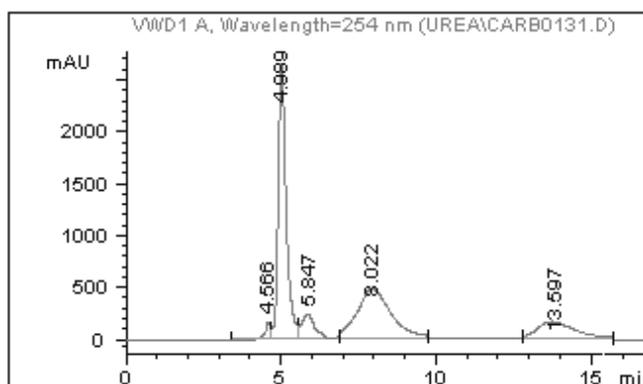


FIGURA 2. Cromatograma de la ureasa obtenida de semillas de *Cucurbita ficifolia*, en la aplicación de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni. Se observan impurezas entre los 7 a 9 min y entre los 13 a 15 min.

### Quantificación de ureasa en las semillas

El incremento de ureasa entre tratamientos de 1,0 y 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni aplicado con respecto al testigo fue de 17,25% y 20,70%, respectivamente, y entre estos, de 2,96%. Los resultados comprueban que las aplicaciones de níquel aumentaron el contenido de ureasa en las semillas de *C. ficifolia*. Se podría indicar que la adición de Ni incrementa la ureasa en la hoja, activando y previniendo la acumulación de urea (Hernández, 2002).

### Liofilización de la enzima ureasa

El color de la ureasa en todos los tratamientos fue marrón claro, coloración diferente a las ureasas comerciales que es blanco-cristalina. Esto se atribuyó posiblemente a la presencia de lípidos residuales como ácidos poliinsaturados linoléico o linolénico, que representan en las semillas de calabaza 50% de la grasa total contenida (Nuez *et al.*, 2000); estos son fácilmente oxidables, siendo muy sensibles a la luz, al oxígeno y a la temperatura.

### Determinación de amoniaco no ureico

No se presentó amoniaco libre como contaminante en la urea que se utilizó, ni en los extractos enzimáticos de los diferentes tratamientos; por tanto el amoniaco liberado en la determinación de los parámetros cinéticos realizados fue exclusivamente resultado de la acción de la enzima sobre la urea.

### Determinación de estudios cinéticos en la enzima liofilizada

El efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática en los extractos del testigo y tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni fueron similares; sin embargo en este último se registró mayor actividad, pues las cantidades de μM L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub> liberado fueron más altas. En el tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni la actividad estuvo por debajo de las dos anteriores. En la Fig. 3 se observa el comportamiento normal de la actividad enzimática de la ureasa con respecto al efecto de la concentración de enzima para el testigo y el tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni; dado el aumento de la cantidad de amoniaco liberado, corroborando así que a medida que se aumenta la concentración de ureasa, será mayor la producción de amoniaco, pues para el sustrato habrá más disponibilidad de los sitios activos de la enzima.

Con base en lo anterior se podría suponer que el níquel dirigido a las semillas fue utilizado para aumentar el contenido de ureasa, y por consiguiente el número de sitios activos de la enzima, considerando que el sitio activo está compuesto por un dímero de Ni (II) de alto espin, con geometría de coordinación octaédrica distorsionada. Herrera *et al.* (2002) postularon que la enzima puede tener entre tres o cuatro centros activos por subunidad; por tanto se podría pensar que la ureasa no tiene un número fijo de sitios activos, así que una parte del Ni aplicado se encontraría formando

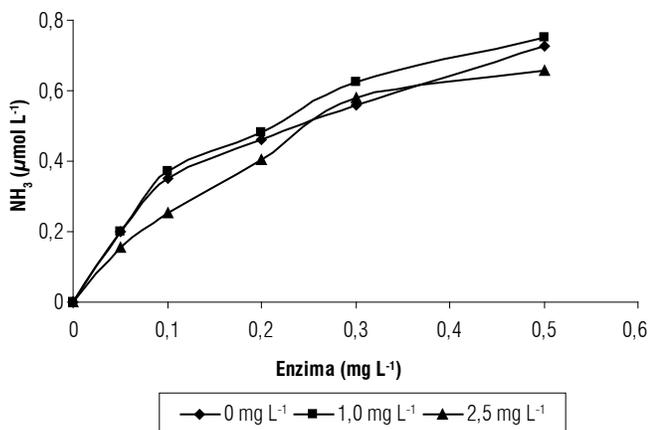


FIGURA 3. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática de la ureasa.

más centros activos dentro de la molécula de ureasa para los tratamientos de 1,0 y 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni aplicado. Por otra parte, el comportamiento inferior de actividad del tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni posiblemente estuvo influido por el Ni<sup>2+</sup>, porque con la fertilización se superaron los niveles permisibles del elemento en la planta, ocasionando seguramente una acumulación del metal en las semillas en estado divalente (Ni<sup>2+</sup>), lo que implicó una inhibición de la reacción. Hernández (2007) menciona que ciertos metales (Pb, Hg, As y Ag) inhiben enzimas de forma no competitiva que tienen en su centro activo grupos -SH libres.

### Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

Las actividades de la ureasa del testigo y el tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni tuvieron un comportamiento similar con respecto a la concentración de sustrato requerida para su saturación. En el tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni la ureasa requirió más sustrato para llegar a esta condición. Además, se observó entre estas una variación representativa de la cantidad de amoniaco liberado. La Fig. 4 muestra que las curvas resultantes de la variación en la concentración de sustrato en relación con la producción de amoniaco liberado son hiperbólicas para todos los tratamientos. Michaelis y Menten (1913) postularon que si se mantiene la concentración de la enzima constante variando la concentración de sustrato, se obtiene una curva hiperbólica para enzimas no alostéricas.

Para las muestras, la hidrólisis de la urea alcanzó un máximo con incremento en la concentración de sustrato, pero una vez superado este máximo y aumentando la concentración de urea, la actividad de la enzima disminuyó gradualmente. Esto permitió formular dos hipótesis: la primera, que la disminución en la actividad después

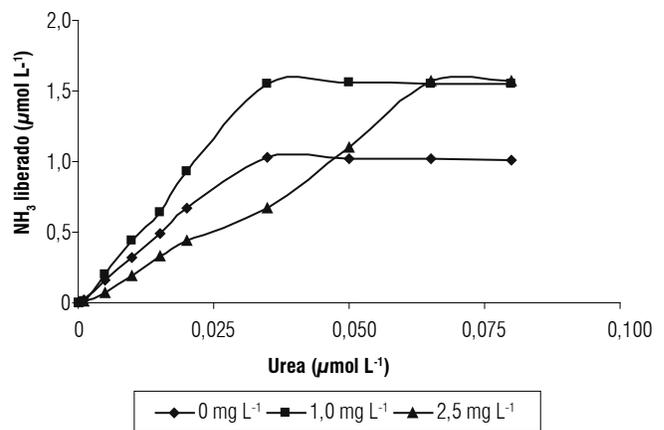


FIGURA 4. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la ureasa.

de saturada la enzima podría deberse a que la ureasa fue inhibida por el amonio producido. La segunda, que la ureasa fuera una enzima alostérica, pues aunque estudios realizados demuestran que no tiene este tipo de propiedades, algunos autores no descartan que pueda comportarse como tal, dadas sus características estructurales de trímero, tetrámero o hexámero con subunidades de alto peso molecular (Gerendás *et al.*, 1999). Entonces, si la ureasa fuera alostérica, el amonio producido sería un efector negativo que inhibe la enzima.

Aunque las curvas dadas por el testigo y el tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni tengan la misma tendencia, en el tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> se observa que hubo mayor liberación de amoniaco en las mismas concentraciones de sustrato. Si se tiene en cuenta que en la ureasa del tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> hubo formación de sitios activos adicionales causados por las aplicaciones de Ni en las plantas, la liberación de amoniaco sería superior que la del testigo, porque el sustrato adicionado tendría mayor disponibilidad de sitios activos para reaccionar.

No obstante, en la Fig. 4 se observa que la concentración de sustrato para saturar los sitios activos de la enzima es de 0,035 μM L<sup>-1</sup> de urea para el testigo y para el tratamiento, de 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Entonces, si se supone que la ureasa del testigo tiene menos centros activos, la concentración de sustrato para su punto de saturación no sería 0,035 μM L<sup>-1</sup> de urea, sino una concentración menor. Por el contrario, para el tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, la concentración de sustrato requerida para saturar sus sitios activos sería posiblemente mayor a 0,035 μM L<sup>-1</sup> de urea.

Por otra parte, al detallar los resultados de la concentración de sustrato requerida por la enzima del tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni para su saturación (Tab. 1), el amoniaco liberado superó los valores de los otros tratamientos.

Al respecto se podría deducir que así como el número de sitios activos aumentó en la enzima del tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> con la aplicación de Ni, lo mismo sucedió con el tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup>; no obstante la enzima probablemente pudo haber estado inhibida por el Ni<sup>2+</sup>; sin embargo si hubiera sido así, la liberación de amoniaco para esta enzima sería menor con respecto a las otras debido a que pocos sitios activos se encontrarían disponibles por la acción inhibidora del níquel.

#### Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La mayor actividad catalítica se observó a 20°C en todas las muestras. El comportamiento de los tratamientos fue igual

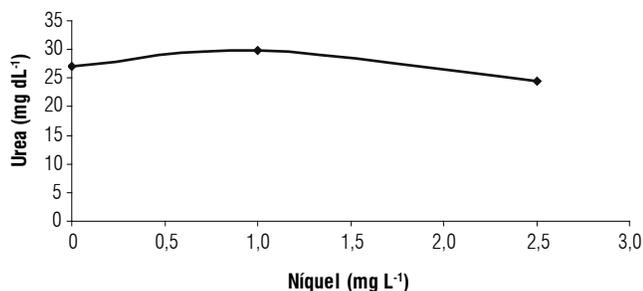
**TABLA 1.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la ureasa.

Urea (μmol L <sup>-1</sup> )	Níquel (mg L <sup>-1</sup> )		
	0	1,0	2,5
	Amoniaco liberado (μmol L <sup>-1</sup> )		
0,001	0,017	0,015	0,011
0,050	0,157	0,204	0,074
0,010	0,321	0,440	0,195
0,015	0,492	0,641	0,330
0,020	0,675	0,934	0,440
0,035	1,033	1,546	0,668
0,050	1,019	1,558	1,102
0,065	1,017	1,555	1,570
0,080	1,014	1,552	1,568

frente al cambio de temperatura; sin embargo, la curva del tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> tuvo una actividad menor con respecto a las demás pero no se responsabiliza a la temperatura de ello, sino a la posible inhibición causada por el Ni<sup>2+</sup>. Resulta importante señalar que no existe unanimidad en el grado de temperatura óptima para la actividad de la ureasa. Se ha encontrado que para el frijol, la temperatura óptima es de 60°C, para la ureasa de semillas de sandía y *Aspergillus niger* es de 40°C (Mohamed *et al.*, 1999) y para la ureasa de *Lactobacillus fermentum* es de 37°C (Castellucci, 2005). Teniendo en cuenta el análisis estadístico, se descarta la incidencia de las aplicaciones foliares de níquel con respecto a la temperatura sobre la actividad de la ureasa, siendo esto confirmado por la similitud de la curva del testigo con respecto a los demás.

#### Efecto del pH sobre la actividad catalítica

El comportamiento de la ureasa de los tratamientos y el testigo con respecto al pH fue similar, coincidiendo en que la mayor actividad de la enzima se reflejó a pH 7. Al igual que la temperatura, el pH no es específico para todas las ureasas. De acuerdo con el análisis estadístico, se descarta la incidencia de las aplicaciones foliares de níquel con respecto al pH sobre la actividad de la ureasa, dada la similitud de la curva del testigo con respecto a los otros tratamientos. Hernández (2007) menciona que como las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. Al igual que los resultados de los demás estudios enzimáticos realizados, el tratamiento de 2,5 mg L<sup>-1</sup> presentó menor actividad causada seguramente por la inhibición del Ni<sup>2+</sup>.



**FIGURA 5.** Contenido de urea en orina utilizando ureasa de los tratamientos 1, 2 y 3 con respecto a las aplicaciones foliares de níquel.

### Contenido de urea en muestra de orina

De acuerdo con los resultados, se identificó un mejor comportamiento de la enzima comercial para la cuantificación de urea en muestra de orina. La cuantificación de urea utilizando la ureasa del tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> estuvo por debajo del valor de la ureasa comercial en 1,25 mg dL<sup>-1</sup> de urea; se destaca que la enzima de este tratamiento fue más significativa con respecto a los demás tratamientos. No obstante, la actividad del tratamiento de 1,0 mg L<sup>-1</sup> fue superada por la ureasa comercial, porque las condiciones de estudio a las cuales fueron sometidas (pH 6,9 y temperatura de incubación 37°C) son establecidas como óptimas para la reacción de la ureasa comercial pero no para la enzima obtenida en la investigación.

La Fig. 5 muestra que sin aplicaciones foliares de Ni en plantas de *C. ficifolia*, la urea cuantificada es de 27 mg dL<sup>-1</sup>, y en la medida en que se aplica níquel a las plantas (concentraciones entre 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>), la cantidad de urea determinada aumenta. Pero concentraciones superiores o iguales a 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni causan disminución en la medición de urea en muestra de orina.

### Conclusiones

Aplicaciones foliares de níquel en *C. ficifolia* iguales o superiores a 2,5 mg L<sup>-1</sup>, posiblemente aumentan el contenido de Ni en estado divalente en las semillas, convirtiéndose en un inhibidor irreversible de la enzima ureasa, cuando se une a grupos sulfhidrilos de cisteínas presentes en la cadena polipeptídica de esta enzima.

La adición de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni presentó clorosis, pero, fue soportada por las plantas; tuvo efectos positivos con respecto al aumento del contenido de ureasa en semillas, proporcionándole características que le permitieron estar por encima de la actividad de las enzimas del testigo y 2,5 mg L<sup>-1</sup>, pero por debajo de la ureasa de uso clínico.

Las plantas que crecieron con 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni presentaron síntomas de fitotoxicidad, y la actividad enzimática fue menor frente a las demás, posiblemente debido a la inhibición de la enzima causada por el Ni en estado divalente.

En todos los estudios cinéticos evaluados la actividad de la ureasa con respecto a los tratamientos, en su orden, fue: 1,0 mg L<sup>-1</sup> de Ni > testigo > 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Ni.

### Literatura citada

- Barrera, N., R. Trujillo y A. Rebolledo. 2007. La victoria, bolo, mexicano o calabaza. *Cucurbita ficifolia*. Otro recurso genético que debemos rescatar. Corpoica, Palmira, Colombia.
- Bolívar, C. y G. Méndez. 2000. Extracción, identificación y caracterización de ureasa en semillas de la familia de las anonáceas. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, UPTC, Tunja, Colombia.
- Borda, G., M. Hurtado y H. Rojas. 1998. Identificación, extracción y caracterización de ureasa en semillas. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, UPTC, Tunja, Colombia.
- Castellucci, F. 2005. Resolución Oeno 5/2005 En: [http://news.reseau-concept.net/images/oiv\\_es/Client/Resolution\\_OENO\\_ES\\_2005\\_05.pdf](http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/Resolution_OENO_ES_2005_05.pdf); consulta: noviembre de 2007.
- Contreras, R., B. Fontal, M. Reyes, T. Suárez, F. Bellandini, I. Romero y P. Cancines. 2006. Algo más sobre alimentos: una visión desde la química. En: Universidad de los Andes, <http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/Ricardo/pdf>; consulta: junio de 2007.
- Díaz, I., M. Larqué, G. González, A. Alarcón, F. González y R. González. 2001. Acumulaciones tóxicas de níquel en el crecimiento y la nutrición de trigo. *Terra* 19, 199-299.
- Dixon, N., C. Gazzola, R. Blakely y R. Zemer. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme, a simple biological role for nickel. *J. Amer. Chem. Soc.* 97, 413-4133.
- El-Shintinawy, F. y A. El-Ansary. 2000. Differential effect of Cd<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> on amino acid metabolism in soybean seedlings. *Biol. Plant.* 43(1), 79-84.
- Gerendás, J., J. Polacco, S. Freyermuth y B. Sattelmacher. 1999. Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162(3), 241-256.
- Hernández, R. 2002. Nutrición mineral de las plantas. En: Libro botánica Online, versión 2.0., <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/nutricionmineral/#níquel>; consulta: febrero de 2009.
- Hernández, R. 2007. Enzimas. En: Libro botánica Online, versión 2.0., <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg>; consulta: febrero de 2009.
- Herrera, C., N. Bolaños y G. Lutz. 2002. Química de alimentos. Alambra, México D.F.
- Krämer, U., W. Smith, I. Wenzel y D. Salt, 1997. The role of metal transport and tolerance in nickel. Hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* hálácsy. *Plant Physiol.* 115, 1641-1650.
- Michaelis y Menten. 1913. Ecuación de Michaelis-Menten. En: Wikipedia, [http://es.wikipedia.org/wiki/Cin%C3%A9tica\\_de\\_Michaelis-Menten](http://es.wikipedia.org/wiki/Cin%C3%A9tica_de_Michaelis-Menten); consulta: febrero de 2009.

- Mishra, D. y M. Kar. 1994. Nickel in plant grown and metabolism. Bot. Rev. 40, 395-452.
- Mohamed, T., M. Mohamed, S. Mohamed y A. Fahmy. 1999. Purification of urease from water melon seeds for clinical diagnostic kits of Molecular Biology National Research Centre. Bioresource Technol. 68, 215-223.
- Nuez, F., J. Ruiz, J. Valcárcel y P. Fernández de Córdoba. 2000. Colección de semillas de calabaza del centro de conservación y mejora de la agrobiodiversidad. Monografías INIA. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid.
- Rubio, M., E. Martínez, C. López y A. Sanz. 1994. Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. Plant Growth Regulat. 14, 151-157.
- Sauerbeck, D. 1991. Plant, element and soil properties governing uptake and availability of heavy metals derived from sewage sludge. Water Air Soil Pollut. 1, 57-58.
- Setia, R., J. Kaila y C. Malik. 1988. Effects of NiCl<sub>2</sub> toxicity on stem growth and ear development in *Triticum aestivum* L. Phyto-morphology 38, 21-27.
- Srivastava, P. y A. Kayastha. 2000. Significance of sulfhydryl groups in the activity of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) seeds. Plant Sci. 159(5), 149-158.
- Vicente, C., N. Villalobos y A. Hernández. 1975. Ureasa de cucurbitáceas y su localización citológica. Inst. Bot. Cavanilles 32 (1), 269-277.
- Wood, B., Ch. Reilly y A. Nyczepir. 2004. Nickel deficiency is occurring in orchard trees. HortScience 39(4), 858.