



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**EFFECTO INHIBIDOR DE LAS SAPONINAS
DE *Vigna unguiculata* SOBRE LA ACTIVIDAD DE
LA UREASA**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR

**INGENIERO BIOQUÍMICO
JONATAN JAFET UUH NARVAEZ**

Asesores:

**DRA. MAIRA RUBÍ SEGURA CAMPOS
DR. ARTURO FRANCISCO CASTELLANOS RUELAS**

Mérida, Yuc., México Septiembre 2017



POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES



UADY

POGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**POGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

**ALUMNO: INGENIERO BIOQUÍMICO
JONATAN JAFET UUH NARVAEZ**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DR. LUIS CHEL GUERRERO
FIQ-UADY**

**DR. JUAN KU VERA
CCBA-UADY**

**DR. LUIS SARMIENTO FRANCO
CCBA-UADY**

**DR. RONALD SANTOS RICALDE
CCBA-UADY**

**DR. ARMÍN AYALA BURGOS
CCBA-UADY**

MÉRIDA, YUCATÁN, OCTUBRE DEL 2017

Declaratoria de originalidad

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

AGRADECIMIENTOS

Como todo en mi vida mi principal agradecimiento es a mi Padre Dios y a mi Madre la virgen María, quienes me han acompañado en este camino de crecimiento personal y profesional, concediéndome paciencia y fortalece en los momentos de necesidad, además de darme la oportunidad de conocer a grandes amigos y maestros durante el recorrido.

De manera especial agradezco a mis padres: Lucelly Narvaez y Casimiro Uuh quienes me han apoyado en todas las etapas de mi vida profesional, también es logro suyo. Doy gracias a mis hermanos Josafat y Josabet, por creer en mí y animarme en todo momento de una manera muy peculiar.

Gracias Cinthia también estuviste presente durante este proceso, tus palabras aliento, el tiempo de escucharme y aconsejarme cuando no encontraba luz. Te comparto este logro, porque también fuiste parte muy importante.

A mis asesores al Dr. Arturo Castellanos y la Dra. Maira Segura, por confiarme este proyecto, además de proporcionarme las herramientas necesarias para concluir mis estudios, con muy especial cariño a usted Dra. Maira, porque siempre creyó en mí, sus palabras de aliento en los momentos de mayor necesidad, motivación y apoyo incondicional no conocían horarios, siempre le estaré en deuda. Agradezco de igual manera al Dr. Víctor Arana por facilitarme su equipo del laboratorio de farmacología.

Agradezco al laboratorio de nutrición acuícola del CINVESTAV-MERIDA, por compartir sus instalaciones y equipos, haciendo posible un parte importante del proyecto, además de compartirme sus experiencias y conocimientos, gracias Dra. Lety, Químico Cesar y Víctor.

A mis compañeros de la fundación segura quienes me ofrecieron su sincera amistad y apoyo, sobre todo a los que aportaron su ayuda de manera directa a la conclusión de mi posgrado, Ulil, Gonzalo e Iván.

A mis compañeros de maestría especialmente con los que logré una gran amistad: Monse, Sara, Panchito, Maritza, May, Serch, tienen un lugar en mi corazón.

Finalmente agradezco a mi tutores por las recomendaciones realizadas durante el proceso del posgrado y al CONACYT por el otorgarme la beca para obtener mi grado.

RESUMEN

El incremento de la producción avícola, aumenta la emisión de gases tóxicos como amoníaco (NH_3), el cual proviene de la degradación de la urea por acción de la ureasa. Emisiones considerables de amoníaco en granjas, afectan negativamente la salud y el comportamiento productivo de las aves. Una estrategia usada para mitigar el NH_3 en granjas de aves, es el uso de aditivos que contienen saponinas, a las cuales se les atribuye tener un efecto inhibitor de la ureasa. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de las saponinas de cascarilla de *Vigna unguiculata* como extracto crudo (Vu-EC) y semipurificado (Vu-SP), sobre la actividad inhibitoria de la ureasa *in vitro*. Las cascarillas de *V. unguiculata* se consiguieron de semillas maduras, previamente secadas en un horno de flujo de aire caliente a 60°C durante 24 h. Posteriormente se obtuvieron las saponinas de las cascarillas, mediante una extracción asistida por microondas usando etanol al 50% (v/v), fueron semipurificadas por extracción por fase sólida. A los extractos obtenidos se les realizaron análisis cualitativos, para comprobar la presencia de saponinas y después se cuantificó por un método colorimétrico, usando diosgenina como estándar. Las fracciones fueron identificadas por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Se usó una reacción de indofenol e hipoclorito de sodio para medir la actividad inhibitoria de la ureasa, se establecieron diferencias significativas ($P < 0.05$) por medio de la prueba Tukey. Se determinó que las cascarillas de *V. unguiculata* contienen $3.24\% \pm 0.08$ de saponinas en base seca equivalentes a diosgenina; en Vu-EC y Vu-SP se determinó una concentración de saponinas de 57.7 ± 0.07 y $77.0 \pm 0.08\%$ respectivamente. Por CCF se identificaron dos fracciones pertenecientes a saponinas, y en CLAR se identificaron a una $\lambda = 215$, estas mismas dos fracciones en los tiempos de retención 2.43 y 2.63 min. El porcentaje máximo de inhibición de la ureasa fue de $48.32 \pm 0.08\%$, perteneciente a Vu-SP en una concentración de $4500\mu\text{g/ml}$, superior a la *Yucca schidigera* (YS) $32.87 \pm 0.27\%$ usada como testigo determinado en la misma concentración. Los resultados sugieren que las saponinas de *V. unguiculata* tienen un efecto inhibitor sobre la ureasa. Sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para identificar la estructura de las mismas.

Palabras clave: Amoníaco, saponinas, *Vigna unguiculata*, *Yucca schidigera*, ureasa

SUMMARY

The growth of poultry production, increases the emission of toxic gases such as ammonia (NH₃), produced from urea degradation by urease activity. Significant emissions of ammonia in farms, adversely affect the health and productive behavior of birds. To mitigate NH₃ in poultry farms, additives containing saponins have been used, which have an inhibitory effect on urease. The objective of this study was to evaluate the effect of the saponins of *Vigna unguiculata* as crude extract (Vu-CE) and semipurified extract (Vu-SP) on the enzymatic activity of urease *in vitro*. *V. unguiculata* husks were obtained from mature seeds previously dried in a forced air oven at 60° C for 24 h. Subsequently, saponins were obtained from the husks by microwave assisted extraction using 50% (v / v) of ethanol. Saponins were semipurified by solid phase extraction. The extracts obtained were qualitative analyzed to verify the presence of saponins. The content of saponins was quantified by a colorimetric method using diosgenin as standard. The fractions were identified using thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). A reaction of indophenol and sodium hypochlorite was used to measure the inhibitory activity of urease. Significant differences (P <0.05) were established using the Tukey test. It was determined that the *V. unguiculata* husks contain 3.24% ± 0.08 saponins of g of dry husks equivalent to diosgenin. In Vu-CE and Vu-SP, a concentration of saponins of 57.7 ± 0.07 and 77.0 ± 0.08% respectively was found. Two fractions from saponins were identified by TLC and in HPLC, at λ = 215, these two fractions were identified in retention times 2.43 and 2.63 min. The maximum percentage of inhibition of urease was 48.32 ± 0.08% with Vu-SP at a concentration of 4500µg / ml, higher than *Yucca schidigera* (YS) 32.87 ± 0.27% at the same concentration. *V. unguiculata* saponins have an inhibitory effect on urease. However, future research is necessary to identify the structure of the saponins.

Keywords: Ammonia, saponins, *Vigna unguiculata*, *Yucca schidigera*, urease

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	III
SUMMARY	IV
ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
CAPÍTULO I.....	3
1.INTRODUCCIÓN GENERAL	3
CAPÍTULO II.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 <i>Producción avícola</i>	5
2.2 <i>Emisión de gases en granjas avícolas</i>	5
2.2.1 Emisión de Amoniacó (NH ₃).....	6
2.2.2 Ácido úrico	6
2.2.3 Ureasa	8
2.2.4 Estructura de la ureasa.....	9
2.3 <i>Inhibición enzimática</i>	9
2.3.1. Inhibición de la ureasa	10
2.4 <i>Efectos del amoniacó producido en granjas avícolas</i>	11
2.4.1 Efecto del amoniacó en aves.....	11
2.4.2 Impacto ambiental	12
2.4.3 Estrategias de control del amoniacó en granjas	14
2.4.4 Aditivos alimenticios	15
2.5 <i>Saponinas</i>	15
2.5.1 Biosíntesis de las saponinas	16
2.5.2 Fuentes comerciales de saponinas	18
2.5.3 <i>Yucca schidigera</i>	18
2.5.4 <i>Quillaja saponaria</i>	20
2.6 <i>Vigna unguiculata</i>	21
REFERENCIAS	24
CAPITULO III.....	31
3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
CAPITULO IV.....	32
4.ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradación aeróbica del ácido úrico	7
Figura 2. Transformación de urea a amoníaco por la acción de la ureasa	8
Figura 3. a) Ureasa de origen bacteriano y estructura química de la ureasa del <i>Bacillus pasteurii</i>	9
Figura 4. Efectos concentración y tiempo de exposición de amoníaco en aves	12
Figura 5. Biosíntesis de los aglicones de las saponinas	17
Figura 6. Fuentes comerciales de saponinas <i>Yucca schidigera</i> y <i>Quillaja saponaria</i>	18
Figura 7. Estructura esteroideal de la <i>Yucca schidigera</i>	18
Figura 8. Estructura triterpenoide de la <i>Quillaja saponaria</i>	21
Figura 9. <i>Vigna unguiculata</i>	22

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estrategias de reducción de amoníaco producida por heces en granjas	14
Cuadro 2. Contenido de saponinas en los granos de <i>V. unguiculata</i>	23

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, la producción pecuaria se ha incrementado considerablemente; según informes de la SAGARPA el sector avícola es una fuente importante de proteína para la población, este alcanzó un crecimiento promedio del 2004-2015 de 26.5%. En Yucatán, el aumento en la producción de aves fue de 12% en el mismo periodo. El incremento en la producción origina la construcción de nuevas instalaciones, aumento en la adquisición de alimentos para los animales y creación de empleos directos e indirectos. Sin embargo, el crecimiento también aumenta la generación de residuos orgánicos contaminantes como las excretas.

Las heces de los animales en granjas emiten gases tóxicos como el metano, óxido nítrico, así como ácido úrico y urea, estos 2 últimos son precursores del amoníaco que se libera por la acción de la enzima ureasa. Estudios demuestran que emisiones considerables de amoníaco en granjas de pollos producen efectos negativos como son el impedir el desarrollo deseable de las aves, disminución del apetito y la producción de huevos, aumento de la susceptibilidad a enfermedades respiratorias, entre otros problemas; por tanto, para las granjas es importante mantener su manejo en condiciones óptimas para una mejor producción y no poner en peligro la salud de las aves.

Ante el problema de las emisiones de amonio en granjas se han tomado medidas, una de ellas es el uso de ventilación natural o forzada en las casetas y el empleo de aditivos alimenticios, lo anterior con la finalidad de incrementar el bienestar o la salud de las aves. Los aditivos se obtienen a partir de varias fuentes como, microorganismos, sustancias químicas, enzimas o metabolitos secundarios que se extraen de plantas.

Las saponinas son metabolitos secundarios presentes en diversas plantas, se caracterizan por tener cadenas de azúcares unidos a un elemento esteroidal o triterpénico. Esta estructura propicia diversos fenómenos desfavorables uno de los cuales durante muchos años culpó a las saponinas de ser tóxicas por crear espuma en el rumen; impedir la absorción adecuada de nutrientes o propiciar hemólisis. Esto

trajo como consecuencia la restricción del uso de alimentos conteniendo saponinas, sobre todo en la alimentación de rumiantes.

Sin embargo, estudios recientes han revelado que las saponinas también tienen características antiinflamatorias, anti citotóxicas, anti fúngicas, antihelmínticas, anti microbianas, y anti protozoarias, además inhiben la enzima ureasa y como consecuencia reduce las emisiones de amonio, lo cual es deseable en las instalaciones de las aves.

Por su contenido de saponinas la *Yucca schidigera* ha obtenido un valor comercial elevado como aditivo en la alimentación para animales. Esta planta se cultiva en México en lugares desérticos al norte del país y al sur de Estados Unidos. Actualmente, en el mercado mundial existe una amplia variedad de aditivos alimenticios que provienen de la *Yucca schidigera*, la mayoría de origen extranjero. Para México lo anterior ha generado una dependencia tecnológica parcial hacia otros países como Estados Unidos.

La *Vigna unguiculata* es una leguminosa proveniente de África que puede ser cultivada en zonas tropicales; en Yucatán esta planta es conocida como “X’pelon” y es parte de la dieta en poblaciones rurales. Posee concentraciones de saponinas de 2.53% y hasta de 4.73% en sus cáscaras, por lo cual se convierte en fuente potencial para extraer esta sustancia.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción avícola

La población mundial se encuentra en continuo crecimiento, se pronostica que para el año 2050 el planeta albergará 9 billones de habitantes (FAO, 2010), al incrementarse la población mundial, la sociedad enfrentará un aumento en la demanda de alimentos y en especial de proteína de origen animal que han experimentado un rápido crecimiento en todo el mundo y se prevé que continuarán aumentando. En México la producción pecuaria es muy dinámica, ya que se produjeron 6'114,713 de toneladas de carne de los cuales 2'879,686 eran de ave (SIAP, 2014), siendo la de mayor producción a nivel nacional y quinta a nivel mundial. En cuanto al consumo de huevo, México permanece como el primer lugar con consumo *per cápita* con 21.9 kg y produce anualmente 108 millones de cajas de huevo (UNA, 2014), colocándolo como el quinto mayor productor en el mundo.

En Yucatán, se produjeron 274,223 toneladas de carne, de los cuales 121,906 toneladas fueron de ave, un producto pecuario destacado según el informe agroalimentario de Yucatán realizado por la SIAP en el año 2014. Esta importantísima producción es esencial para proporcionar una alimentación correcta a la población. El aumento en las poblaciones de dicho sector ha conllevado al incremento de la generación de grandes cantidades de residuos orgánicos, como las excretas que generan emisiones capaces de repercutir en la salud de trabajadores y aves, además de crear polémica sobre su afectación al medio ambiente y a los cercos urbanos.

2.2 Emisión de gases en granjas avícolas

La industria avícola no es, según las estadísticas, la mayor contaminante con desechos orgánicos, pero cuando se presenta en cantidades suficientes puede tener serias consecuencias ambientales (Lon Wo, 2003). Wiseman (1992) estimó

que 1000 gallinas ponedoras con 2 kg de peso promedio producen 115 litros de desechos por día con un contenido de humedad de 70%, mientras que 1000 pollos de engorda de 1 kg producirán 36 litros/día incluyendo la cama con 30% de humedad. Se pueden usar como fertilizantes a razón de 5 y 15 ton de excretas/ha, según el contenido de N, equivalentes a 250 kg de N orgánico total / ha / año, por lo que 1 ha soportaría 435 gallinas y 715 pollos de engorda.

El exceso de excretas se convierten en uno de los principales problemas ambientales generados por la actividad avícola (Pescatore *et al.*, 2005) al estar vinculado al recurso del aire por la emisión de material contaminante y gases nocivos como: óxido nítrico, dióxido de carbono , sulfuro de hidrógeno, metano y amoníaco (Gates *et al.*, 2008).

2.2.1 Emisión de Amoniaco (NH_3)

El amoníaco (NH_3) es un gas incoloro de olor penetrante, responsable de la lluvia ácida; su ion el amonio (NH_4), es muy soluble y ambos se mantienen en el medio en un equilibrio dinámico, dicho equilibrio dependerá de diversos factores, entre otros: el pH (Hansen *et al.*, 2007) y la temperatura. El sector agrícola es responsable de un 94% de las emisiones de amoniaco en el mundo (Steinfeld *et al.*, 2006). A dicha emisión agrícola, la ganadería contribuye en un 64% (Steinfeld *et al.*, 2006) y dentro de las especies de abasto la emisión derivada de la producción avícola ascendía en año 1997 al 3.5% de la emisión global (Bouwman *et al.*, 1997). El amoniaco proviene de la degradación de la urea y por lo tanto tienen su origen en el nitrógeno que consumen los animales en los alimentos y forrajes, es decir, en la proteína de dichos alimentos (Hristov y Jouany, 2005); en las aves el nitrógeno no digerido es excretado en forma de ácido úrico (Carlile, 1984).

2.2.2 Ácido úrico

El ácido úrico es un compuesto nitrogenado, blanco, inodoro e insípido, de fórmula $C_3H_4N_4O_3$, que se forma como resultado del metabolismo de las purinas. En las aves, más del 50 % del N de los alimentos se excreta como ácido úrico, la formación de amoniaco en las casetas avícolas ha sido atribuida por diversos estudios a la descomposición microbiana del ácido úrico en las heces (Carlile, 1984). Dicha

degradación es el resultado de una serie de reacciones en la cual la urea es el producto final (Figura 1.) (Carlile, 1984).

La primera enzima en el proceso, es la uricasa la cual es una metaloenzima que contiene iones de Cu^{+2} y Fe^{+3} y un pH óptimo de 9.0, es altamente específica y actúa en presencia del oxígeno, por lo que la uricasa no está presente en anaerobiosis, afectando el proceso de degradación del ácido úrico. Bacterias como *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia kiliensis*, *Pseudomonas fluorescentes*, *P. aeruginosa* y *Bacillus* son capaces de descomponer el ácido úrico en anaerobiosis (Rouf y Lomprey, 1968), sin embargo no todos los microorganismos anteriores pueden convertir totalmente al ácido úrico en amoníaco. Algunos sólo lo pueden degradar a urea u otros compuestos intermedios y carecen de las enzimas necesarias para la conversión de estos compuestos intermedios en amoníaco, por lo tanto, dentro de las camas y las deyecciones deben existir grupos de microorganismos cuyo efecto combinado lleve a la conversión completa del ácido úrico en amoníaco y anhídrido carbónico (Carlile, 1984).

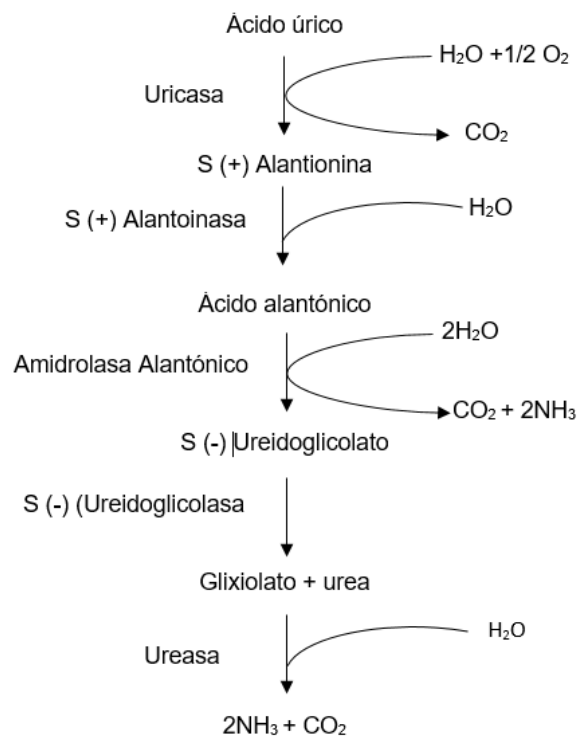


Figura 1. Degradación aeróbica del ácido úrico (Carlile, 1984)

2.2.3 Ureasa

La ureasa es una hidrolasa que cataliza a la urea para formar amoniaco, la velocidad de la reacción de la enzima es hasta 10^4 veces en el ser humano. Se encuentra ampliamente distribuida en bacterias, hongos y plantas (Longo y Melo, 2005), La actividad de la ureasa se ha detectado en muchas plantas (Witte y Medina-Escobar, 2001). Dicha enzima se encuentra en todos los tejidos de la planta responsable de reciclar la urea derivada metabólicamente y es la única metaloenzima identificada que contiene níquel en su sitio activo (Polacco y Holland, 1993).

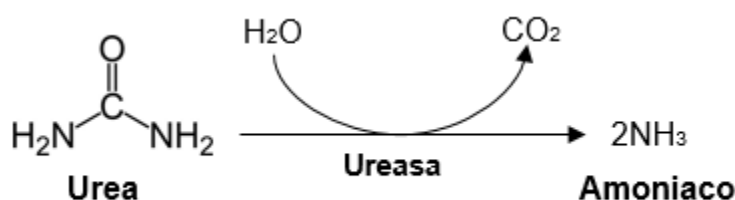


Figura 2. Transformación de urea a amoniaco por la acción de la ureasa (Beline *et al.*, 1998).

El amoniaco procede de la degradación enzimática de la urea (mamíferos) y ácido úrico (aves) (Figura 2); las enzimas responsables de dicha fermentación son ureasas de origen microbiano; bacterianas en su mayor parte (90%), pero también fúngicas y protozoarias (Aarnink y Versteegen, 2007) . Estos grupos enzimáticos son ubicuos y actuarán a pH neutro (pH óptimo 7,4), con una baja actividad debajo de los 5-10°C y sobre los 60°C, aunque son capaces de mantener elevados niveles de actividad a temperatura ambiente (Sommer *et al.*, 2006).

Su presencia en el suelo es de origen microbiano, considerándose que es liberada tanto por células vivas como por células microbianas que ya han sido degradadas (García Izquierdo, 2003), una de esas bacterias es *Micrococcus* que posee la enzima ureasa (Terrón, 1999) y transforma con relativa rapidez la urea en amoniaco; cuanto más rápida es la hidrólisis de la urea, más alta es la concentración del *Micrococcus* (Torello y Wehner, 1983). Las enzimas exhiben estructuras similares independientemente de la fuente de cual provengan.

2.2.4 Estructura de la ureasa

Independientemente de las diferencias estructurales y de la ureasa microbiana, se deduce el mismo patrón de catálisis, principalmente a causa de la secuencia similar de aminoácidos y a la presencia de dos iones de Ni^{2+} (Figura 3) en el sitio activo de la enzima (Hanif *et al.*, 2012). La ureasa está unida a dos iones de níquel (Ni) por subunidad, tiene cuatro histidinas un aspartato (Asp) y una molécula de carbamato – lisina (Lys) que sirve como ligando para estos metales, una histidina adicional está involucrada en el mecanismo catalítico. El dominio de la ureasa forma una estructura de barril (α , β) con una estructura similar a otras hidrolasas (Carlsson y Nordlander, 2010). La estructura cristalina del centro activo de la ureasa contiene probablemente dos moléculas de agua (W) y un puente OH.

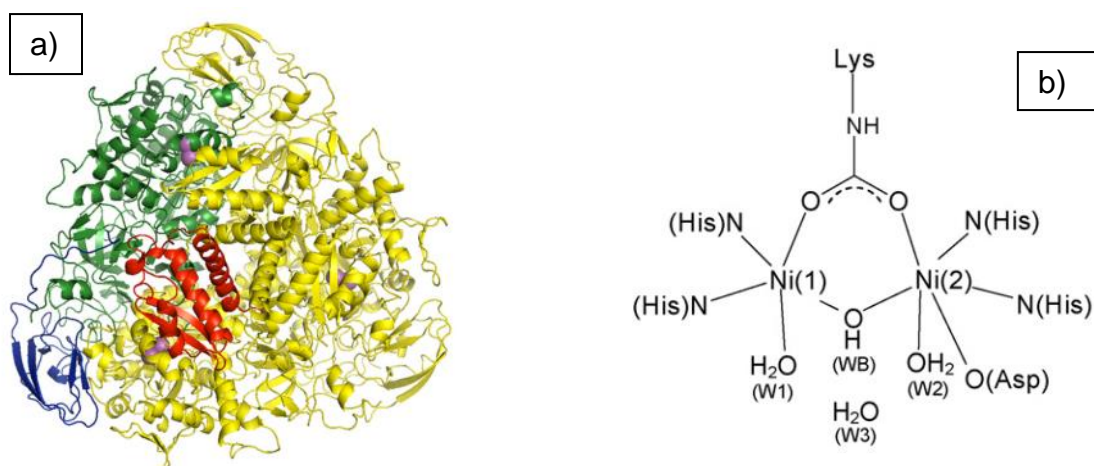


Figura 3. a) Ureasa de origen bacteriano (Farrugia *et al.*, 2013) b) Estructura química de la ureasa del *Bacillus pasteurii* (Benini *et al.*, 1999).

2.3 Inhibición enzimática

La presencia de diferentes sustancias, elevadas concentraciones de sustrato o producto, provocan una disminución en la actividad enzimática e incluso su total desaparición. Este efecto de pérdida de la actividad enzimática se denomina inhibición, y la sustancia que lo provoca, inhibidor (Stryer, 1988).

La inhibición enzimática puede ser reversible o irreversible. Cuando la inhibición es reversible, la actividad inicial de la enzima puede recuperarse eliminando el inhibidor

por métodos físicos (filtración mediante gel, diálisis, etc.). La inhibición irreversible consiste en la pérdida definitiva de la actividad de la enzima, tras un periodo de tiempo en presencia del inhibidor (Stryer, 1988).

En la inhibición reversible se distinguen los siguientes tipos:

a) *Inhibición competitiva*: El inhibidor y el sustrato compiten por el centro activo de la enzima. Generalmente el inhibidor presenta semejanzas estructurales con el sustrato específico de la enzima, pero no se une a ésta, si su centro activo está ocupado por una molécula de sustrato (Stryer, 1988).

b) *Inhibición acompetitiva*: El inhibidor se combina con el complejo enzima-sustrato para formar un complejo inactivo, fortaleciendo la unión de la enzima con el sustrato, lo dificulta su disociación y consiguiente transformación posterior en el producto habitual de la reacción (Stryer, 1988).

c) *Inhibición no competitiva*: El inhibidor no competitivo puede combinarse con la enzima libre a menudo para deformar a la misma, de modo que no pueda formarse el complejo enzima-sustrato a su velocidad habitual, en un sitio diferente del sitio activo, para liberar los productos de la reacción. También actúa en el complejo enzima sustrato, interfiriendo con la acción de ambos (Stryer, 1988).

2.3.1. *Inhibición de la ureasa*

Actualmente la inhibición de la ureasa ha sido ampliamente estudiada, principalmente en el área de medicina humana y la agricultura. El primero porque la bacteria *H. pylori* rápidamente hidroliza la urea como parte de su método de supervivencia a partir de la producción de la enzima ureasa, para poder alcalinizar la bolsa gástrica y colonizarla (Parsonnet *et al.*, 1991), motivo por el cual los inhibidores de ureasa recientemente han atraído la atención como potenciales fármacos anti ulcerosos (Amtul *et al.*, 2002). En la agricultura la hidrólisis de la urea en amoníaco reduce considerablemente la disponibilidad de nitrógeno a los cultivos (Brito *et al.*, 2015).

Los inhibidores de la ureasa pueden dividirse en dos categorías generalmente: i) sustrato estructural análogo (hidroxiurea y ácido hidroxámico) y ii) inhibidores que afectan el mecanismo de reacción (fosfodiamidas) (Upadhyay, 2012).

Otra clasificación de los inhibidores es por su estructura química: i) compuestos tiólicos, el cual los aniones del mismo se unen con los metales (Ni_{2+}) del sitio activo de la enzima, ii) ácido hidroxámico y sus derivados, estos compiten con la urea por enlazarse al sitio activo de la ureasa, iii) fosforodiamidas y sus derivados son los que han presentado mejores resultados en la inhibición y iv) ligadores y quelatos del níquel, entre ellos se encuentra el ion fluoruro y algunos péptidos (Upadhyay, 2012).

2.4 Efectos del amoníaco producido en granjas avícolas

2.4.1 Efecto del amoníaco en aves

Las aves frecuentemente están expuestas a niveles de 50 ppm o superiores de amoníaco en el ambiente que se produce en el interior de una caseta y, de hecho, en las naves poco ventiladas la concentración del mismo puede llegar a alcanzar 200 ppm. Esto constituye un problema para los avicultores sobre todo durante el invierno cuando se reduce la ventilación para evitar una pérdida excesiva de calor y, por lo tanto, la concentración de amoníaco tiende a ser más alta (Carlile, 1984).

Concentraciones elevadas de amoníaco en granjas de aves pueden acarrear problemas como: dañar las vías respiratorias, reducir el consumo de alimento impidiendo el crecimiento de aves, disminuir la producción de huevo y aumentar la susceptibilidad al virus de la enfermedad de Newcastle (Kristensen y Wathes, 2000), además de afectar el bienestar y la salud humana (Costa *et al.*, 2012). En la figura 4, se muestra los principales efectos de concentraciones mayores a 25ppm de amoníaco en un sistema de producción avícola intensivas.

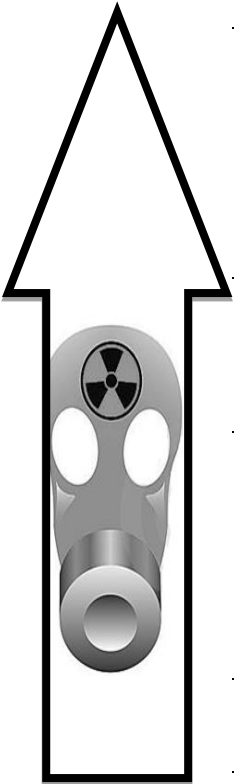
	Nivel de amoniaco (ppm)	Tiempo de exposición (días)	Efectos del amoniaco en las aves
		17-21	Edema pulmonar, congestión, hemorragia pulmonar
		7-15	Anorexia, pérdida de peso
		1-3	Irritación de las conjuntivas, disminución del consumo
	100	28-49	Reducción significativa en ganancia de peso, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad en aves jóvenes
	50	28-49	Lesiones oculares como queratoconjuntivitis, inflamación de los sacos aéreos. Reducción en ganancia de peso, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad en aves jóvenes
	25	28-49	Reducción en la ganancia de peso y conversión alimenticia
	20	21	Incremento en la susceptibilidad a virus respiratorios como bronquitis o Newcastle
	10	7	Irritación de la tráquea

Figura 4. Efectos concentración y tiempo de exposición de amoniaco en aves (Industria avícola, 2005)

2.4.2 Impacto ambiental

Los problemas ambientales en los sistemas de producción animal intensificados están casi totalmente relacionados al manejo de las excretas (Herrero y Gil, 2008). La acumulación de los gases que se emiten en las granjas avícolas contribuye al efecto invernadero, esto se debe al incremento en las entradas de nitrógeno al sistema, puesto que se produce una mayor volatilización de amoniaco a la atmósfera; este gas, aunque no tiene un efecto invernadero, puede adoptar diversas formas, actuando como un precursor del óxido nítrico (NO), el cual puede reaccionar en la estratosfera debilitando la capa de ozono, para caer finalmente al suelo en forma de ácido nítrico (HNO₃) (componente de la lluvia ácida) (Sanhueza, 1982).

Lo anterior sucede en condiciones aerobias y en la presencia de ciertas bacterias nitrificantes (*Nitrosomas* ssp.; *Nitrobacter* ssp.), donde el amoníaco en presencia de O₂ es transformado a nitrato (NO₃) y posteriormente desnitrificado (en este caso en ausencia de oxígeno), hasta la liberación final de N₂ (Monteny, 1996). En condiciones óptimas en el proceso de nitrificación del N amoniacal (NH₃↔NH₄⁺) la producción de N₂O es mínima, incrementado cuando inciden diversos factores limitantes, destacando la presencia de ciertas especies de bacterias heterotróficas, la concentración de oxígeno, amoníaco y materia orgánica fácilmente oxidable (Firestone y Davidson, 1989).

Otro problema de estas emisiones es la generación de olores que producen incomodidad en las poblaciones aledañas a las granjas pecuarias lo que se traduce en quejas y sanciones a empresas productoras. Son una molestia en la comunidad debido al persistente olor repulsivo y potenciales riesgos para la salud (Lu *et al.*, 2008). En la industria porcina los olores de las operaciones se han asociado con menor calidad de vida y pérdida de valores de propiedad en las comunidades circundantes (Wing *et al.*, 2008), a menudo, la gestión de olor es un factor limitante para modificar y ampliar la instalación ya existente o establecer una nueva, así como para la sostenibilidad, productividad y rentabilidad de esta industria (Zhu, 2000). Se ha postulado que el futuro de la industria porcina en gran parte y colectivamente dependerá de tecnologías que son capaces de mitigar el olor con eficacia (Hogberg *et al.*, 2005).

La cantidad de olor emitido por una explotación está en función de la especie animal, el tipo de alojamiento, el almacenamiento del estiércol o las excretas, los métodos de manejo, el tamaño de las fuentes de olor y la implementación de estrategias para el control de olores. Partiendo del proceso de descomposición de las excretas, se producen entre 80 y 200 componentes odoríferos (Mackie *et al.*, 1998), principalmente ácidos grasos volátiles, esteroides, carbonilos, sulfuros, mercaptanos y amoníaco (Rappert y Müller, 2005).

2.4.3 Estrategias de control del amoniaco en granjas

En una revisión realizada por Ndegwa *et al.*, (2008) se exponen varias estrategias de control para emisiones de amoniaco de instalaciones de producción animal donde se incluyen cambio de dieta animal, rediseño o renovación de graneros, limpieza del escape de aire de edificios, tratamiento del estiércol y el uso de aditivos alimenticios. En el cuadro 1 se presenta la efectividad de cada uno en la mitigación del amoniaco en granjas.

Cuadro 1. Estrategias de reducción de amoniaco producida por heces en granjas.

Animal	Estrategia de reducción	Reducción máxima de amoniaco registrado (%)	Referencia
Cerdos	Separación de heces de la orina	47 – 49	Lachance <i>et al.</i> , 2005
Pollos	Saponinas de <i>Yucca schidigera</i>	77	Roldan, 2013
Cerdos	Cambios en las dietas	62	Leek <i>et al.</i> , 2004
Pollos	Manejo de estiércol	60	Monteny, 1996
Cerdos	Rediseños de granjas	83	Hansen <i>et al.</i> , 2003

Las estrategias anteriores contribuyen de manera efectiva a la mitigación de amoniaco; el manejo de excretas tiene un efecto muy importante sobre dicho gas como la utilización de rejillados en proporciones adecuadas con el suelo continuo, o modificaciones del diseño del mismo, pueden suponer una menor superficie de intercambio de la orina con las heces y por tanto, disminuir las emisiones de amoniaco en granjas porcinas (Kim *et al.*, 2008). Hamelin *et al.*, (2010) observaron reducciones en la emisión de amoniaco del 23%, incluso hasta un 42% dependiendo del tipo de rejilla utilizada. El diseño de los comederos para cerdos o su localización pueden hacer que el animal desperdicie gran cantidad de alimento que será depositado en el purín (Brumm *et al.*, 2000), sin embargo una desventaja serían los altos costos en dicha estrategia.

En el caso de cambio de dietas de los animales, para obtener resultados significativos en la mitigación de amoniaco, se debe de reducir los niveles de

proteína en su alimentación, sin embargo, algunos autores han observado que la reducción de los niveles de proteína en las dietas puede tener efectos negativos sobre el crecimiento de los animales. Así, Yue y Qiao, (2008) y Lynch *et al.*, (2009) en lechones recién destetados observaron una disminución de su crecimiento tras reducir la proteína del 23.1 al 17.2%; y del 20 al 16%, respectivamente.

2.4.4 Aditivos alimenticios

Se han utilizado los aditivos en la producción animal por los efectos benéficos que producen en indicadores fisiológicos, productivos y de salud (Hernández y Curbelo, 2015). De esta forma, se logran disminuir los costos e incrementar la eficiencia en los sistemas productivos (Castro, 2005). El término aditivos para la alimentación animal es la emitida en el Reglamento (CE) No. 1831/2003 del Parlamento y el Consejo Europeo, donde se refiere que son sustancias, microorganismos y preparados distintos de las materias primas y de las premezclas, que se añaden intencionadamente al alimento o al agua, a fin de realizar, en particular, una o varias funciones.

Entre los numerosos aditivos se dispone de: vitaminas blindadas, minerales quelatados, pre y probióticos, beta-adrenérgicos, saborizantes, odorantes, surfactantes, sustancias amortiguadoras del pH, arcillas de uso múltiple, aminoácidos cristalinos, enzimas y metabolitos secundarios como las saponinas, entre otros.

2.5 Saponinas

Las saponinas son glicósidos de alto peso molecular, consiste en un azúcar unido a un núcleo lipofílico que puede presentar una estructura esteroide o triterpenoide; La definición clásica de las saponinas está basada en su actividad surfactante; muchas saponinas tienen propiedades detergentes por la cual pueden formar espumas en presencia de agua (Hostettmann y Marston, 2005). Dependiendo al número de cadenas de azúcares que contenga la molécula se aplica el termino de mono-, bi- o tri- demósido, para una, dos o tres cadenas respectivamente (Oleszek,

2002). Las saponinas están ampliamente distribuidas en las plantas, sin embargo no son exclusivas de los vegetales, ya que también se han encontrado en algunas bacterias (Yoshiki *et al.*, 1998) o animales marinos como las estrellas y pepinos de mar.

Diversas investigaciones han reportado actividades biológicas y fisicoquímicas de las saponinas como: antiinflamatorias (Wang *et al.*, 2010), anti citóxicas (Tundis *et al.*, 2009), anti trombóticas (Li *et al.*, 2010), anti fúngicas (Barile *et al.*, 2007), anti helmínticas (Wang *et al.*, 2007) , antioxidantes (Solano *et al.*, 2015), así como otras funciones en la industria alimentaria como sustancia activa que reduce la emisiones de amoniaco que producen las heces en las granjas.

2.5.1 Biosíntesis de las saponinas

La síntesis de las saponinas están muy extendidas en plantas, la mayoría de las especies productoras son dicotiledóneas y acumulan principalmente saponinas de tipo triterpenoide (Figura 5). Por otra parte, las angiospermas monocotiledóneas sintetizan mayormente, pero no exclusivamente, saponinas tipo esteroideal (Moses *et al.*, 2014). La clasificación de los tipos de saponinas, se basa en la naturaleza de la cadena principal del aglicón del cual se deriva dicha molécula. Ambas cadenas principales (triterpenoide y esteroideal), se derivan del precursor lineal de 30 carbonos, el 2,3-óxidoescualeno (Moses *et al.*, 2014).

Durante la síntesis, el aglicón esteroideal pierde tres grupos metilo para dar como resultado una cadena de 27 carbonos, mientras que el aglicón triterpenoide retiene los 30 carbonos en su cadena principal. Los aglicones triterpeonoides y esteroidales son isoprenoides, que se sintetizan de unidades de isopentil pirofosfato, generados en la ruta del mevalonato (Figura 5) (Moses *et al.*, 2014).

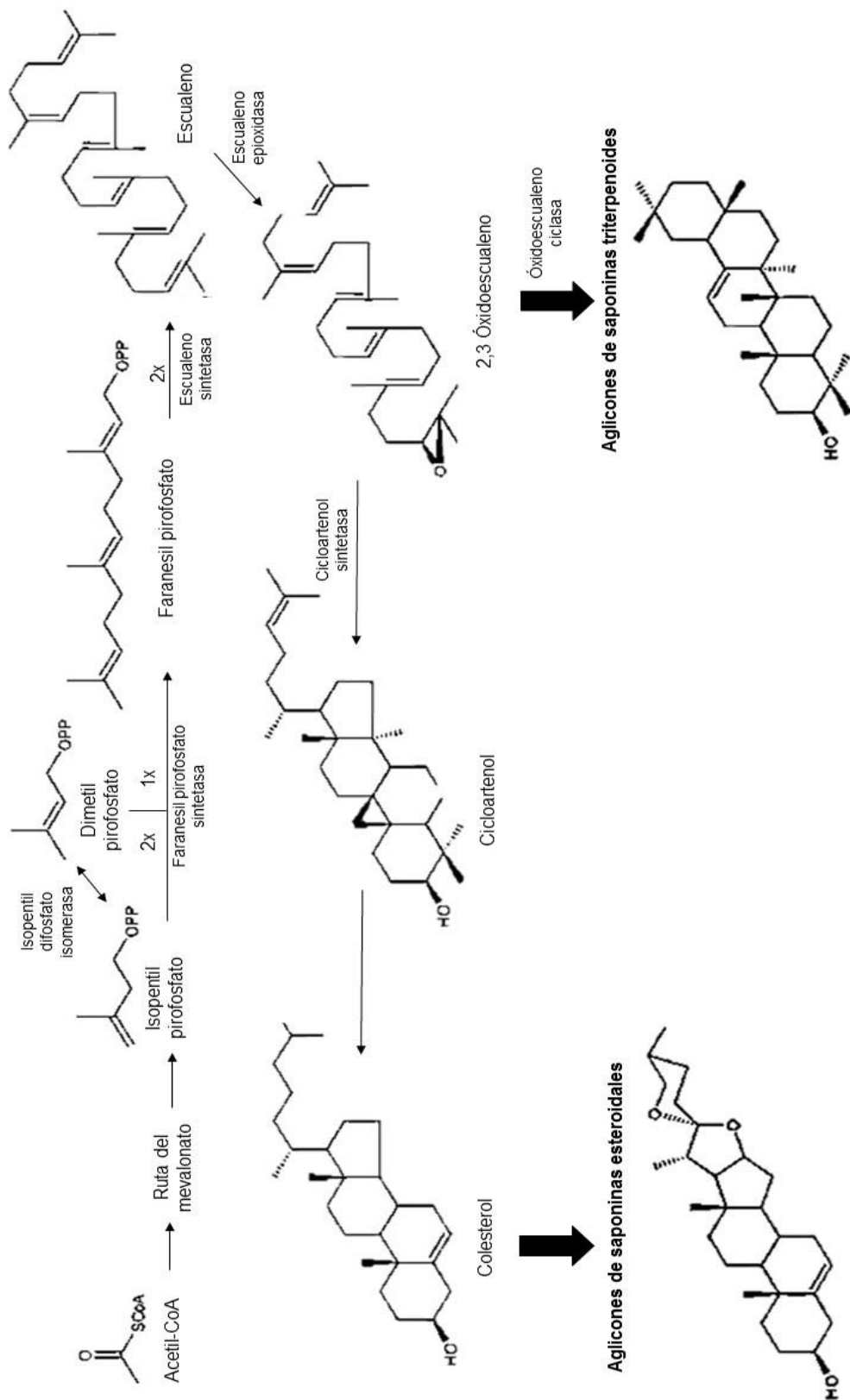


Figura 5. Biosíntesis de los aglicones de las saponinas (Moses *et al.*, 2014).

2.5.2 Fuentes comerciales de saponinas

Actualmente se comercializan saponinas que se extraen de 2 principales fuentes que son la *Yucca schidigera* (figura 5a), que crece en el desierto mexicano y la *Quijalla saponaria* (figura 5b), un árbol que se encuentra en Chile.

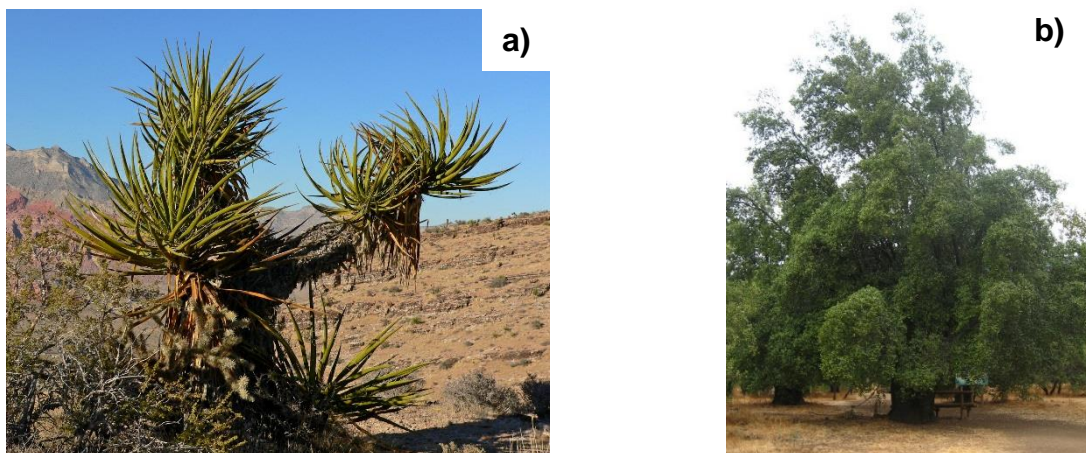


Figura 6. Fuentes comerciales de saponinas: a) *Yucca schidigera* y b) *Quijalla saponaria*

2.5.3 *Yucca schidigera*

La *Yucca schidigera* es un árbol de la familia *Agavaceae* que crece en México y el sudoeste de EE.UU, en el desierto de Mohave; tiene una altura promedio de 4.5 metros y es conocida por los aborígenes de la zona como el árbol de vida, debido sus diversos usos en la medicina tradicional, principalmente como laxante natural y para tratar enfermedades como la artritis. (Cheeke, 2000).

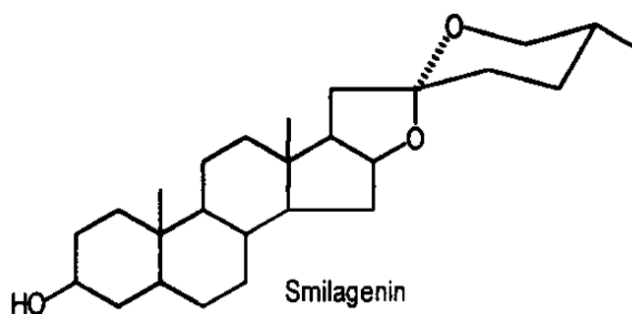


Figura 7. Estructura esteroidal de la *Yucca schidigera* (Cheeke, 2000)

Se caracteriza por poseer en sus troncos un alto contenido de saponinas de naturaleza esteroideal (figura 7), alcanzando una concentración del 10 % (Oleszek *et al.*, 2001), su precio actual en el mercado oscila entre los \$ 3000.⁰⁰ MXN en una presentación de 25 kg.

Existen dos productos obtenidos del tronco de la *Yucca* que están disponibles en el mercado: estos incluyen troncos secados y pulverizados (polvo de *Yucca*) o bien, zumo obtenido por presión mecánica y térmicamente condensado (extracto de *Yucca*) (Piacente *et al.*, 2005).

El extracto de *Yucca schidigera*, es la fuente comercial más usada de saponina esteroideal y se ha utilizado en el ganado e industria para controlar la acumulación de amoníaco y reducir el olor en excreciones animales, por su aplicación directa en instalaciones o bien, por su adición en la dieta (Santacruz-Reyes y Chien, 2010, Lowe y Kershaw, 1997, Kim y Cho, Aregheore, 2005, Li y Powers, 2012).

Al incluir el extracto en dietas de cerdos, se redujo la concentración de amoníaco (Santacruz-Reyes y Chien, 2012). También se ha reportado una disminución en los olores y del gas hasta en un 77%, en las excreciones de las aves de corral de 35 días de edad con la adicción de 50 ml de extracto de *Yucca* en 1000 litros de agua (Wallace *et al.*, 1994, Roldan, 2013). En ratas la adición de *Yucca* a la dieta reduce la actividad de la ureasa y de las enzimas que intervienen en el metabolismo del ciclo de la urea (Duffy *et al.*, 2001); en pollos también produjo una disminución de la actividad de la ureasa intestinal y fecal (Nazir, 2001).

Aun no se ha definido el mecanismo de acción, sin embargo entre las posibles formas de acción de este aditivo se señalan las siguientes: a) Estímulo esteroideal a través de las saponinas esteroidales que contiene el extracto de *Yucca*; b) Inhibición de ureasas en el intestino; c) Unión (ligadura) a amoníaco; y d) Modulación y selección de microorganismos (Duffy y Brooks, 1998).

Los trabajos refieren que las saponinas esteroidales contenidas en la *Yucca* estimulan el crecimiento de los animales, pero no tienen efecto biológico que active la producción o acción de las hormonas esteroidales, por lo que la acción pueda ser atribuida a este compuesto. En el mismo sentido se considera que puede inhibir

directamente las ureasas en la porción posterior del intestino de los animales, y también que puede causar una alteración en la población microbiana del tracto gastrointestinal (Duffy *et al.*, 2001).

El extracto de *Yucca schidigera* es un potente inhibidor *in vitro* de la enzima ureasa; como inhibidor *in vivo* sus propiedades son atribuidas a la inhibición gastrointestinal de ureasas. Duffy *et al.*, (2001) señalan que el método de evaluación de la acción del extracto de *Yucca schidigera* en la ureasa es variable y los diversos reportes científicos no son concluyentes, por lo que se considera que no sólo son las saponinas responsables de los beneficios, sino que también los glicocomponentes contribuyen o tienen un efecto directo. Sin embargo, las saponinas son las que tienen una contribución sustancial en el mecanismo de acción del extracto, por la cantidad en la que se encuentran presentes en la planta, y en consecuencia al realizar el extracto se puede encontrar alrededor del 10% de su peso en seco (Katsunuma *et al.*, 2000, Oleszek *et al.*, 2001).

2.5.4 *Quillaja saponaria*

La quillaja es un árbol endémico de Chile que llega medir hasta 15 m de altura y 1 m de diámetro, su corteza es de color gris y es rico en saponinas. Habita en ambientes secos y suelos pobres, se encuentra en lugares que llegan hasta los 2.000 metros sobre nivel del mar (Donoso, 2005). La *Quillaja saponaria* contiene saponinas, específicamente del tipo triterpenoide (Figura 8). Estas les confieren a los extractos de este árbol propiedades únicas, utilizadas durante décadas en las más diversas industrias, como de alimentos y bebidas, minería, agricultura, alimentación animal, entre otras. La corteza es utilizada desde antaño como detergente, debido a su gran cantidad de saponinas (Donoso, 2005).

Los valores promedio de concentración de saponina en cada componente de árbol de *Quijalla saponaria* son: 11.6% de la Corteza, 10.0% de las Ramas con corteza, 8.8% de la Madera y 6.1% de las Hojas (Toral y Rosende, 1986).

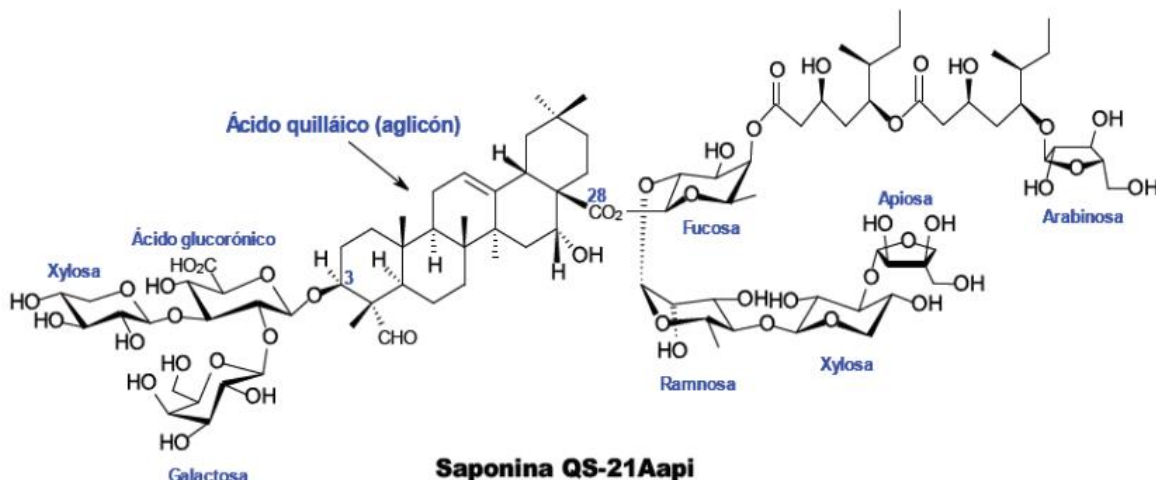


Figura 8. Estructura triterpenoide de la *Quijalla saponaria* (Kim *et al.*, 2006).

2.6 *Vigna unguiculata*

La *Vigna unguiculata* (Figura 9), es una leguminosa de origen africano y es cultivado a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, Sur y Centro América, así como en ciertas partes de Europa y Estados Unidos; En Occidente, especialmente en Latinoamérica, las leguminosas son alimentos altamente consumidos y forman parte de los hábitos alimenticios de la población (Granito *et al.*, 2004). La *Vigna unguiculata* tiene diversos nombres según la región donde se cultiva, algunos nombres conocidos son: “cowpea”, “coupi”, “chícharo de vaca”, “yorimon” o “X-pelon”, este último es su nombre común en Yucatán.



Figura 9. *Vigna unguiculata*.

Al “X-pelon” se le llama "cultivo de temporada de hambre" porque es el primer cultivo a cosechar, sus semillas secas o frescas normalmente se usan como alimento humano y su forraje puede ser usado para el ganado (Gómez, 2011), las características anteriores convierten a la leguminosa en un producto versátil. De la siembra de *Vigna unguiculata* se pueden esperar cosechas iguales o superiores a 1, 348 kg de semilla /ha, bajo condiciones de riego en Tamaulipas (Díaz y Ortegón, 2000) o de 3,540 kg de materia seca de forraje obtenidos en Matamoros, Tamaulipas. (Reta Sánchez *et al.*, 2013). En México se produjeron 1,173.78 toneladas de “X-pelón” y Yucatán es el mayor productor de esta leguminosa que ha aumentado en el periodo de 2006 hasta el 2014, donde la producción paso de 181 a 1,134.53 toneladas respectivamente, con un rendimiento de 3.74 toneladas de grano por hectárea (SIAP, 2014).

Se ha descubierto que *V. unguiculata* posee cantidades considerables de saponinas, misma que lo vuelven una materia prima potencial para extraer dicha sustancia; En el cuadro 2 se describe el contenido de saponinas en el grano de dicha planta (Solano *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Contenido de saponinas en los granos de *V. unguiculata*.

Partes del grano	Concentración de saponinas (mg/g)
Cascarilla	47.3 mg/g
Grano sin cascarilla	17.9 mg/g
Grano integral	18.7 mg/g

(Solano, 2015)

Dada su adaptabilidad agronómica a la zona y su contenido en saponinas, la *V. unguiculata* representa una alternativa viable para obtener extractos de saponinas para ser empleados en la industria de alimentación animal. Por otro lado, la fracción proteínica de esta leguminosa puede ser empleada ventajosamente para obtener alimentos funcionales con actividad biológica específica (Chel *et al.*, 2011) lográndose así su aprovechamiento integral.

Referencias

- AARNINK, A. J. A. & VERSTEGEN, M. W. A. 2007. Nutrition, key factor to reduce environmental load from pig production. *Livestock Science*, 109, 194-203.
- AMTUL, Z., SIDDIQUI, R. A. & CHOUDHARY, M. I. 2002. Chemistry and mechanism of urease inhibition. *Current medicinal chemistry*, 9, 1323-1348.
- AREGHEORE, E. M. 2005. Effect of *Yucca schidigera* saponin on the nutritive value of urea-ammoniated maize stover and its feeding value when supplemented with forage legume (*Calliandra calothyrsus*) for goats. *Small Ruminant Research*, 56, 95-102.
- BARILE, E., BONANOMI, G., ANTIGNANI, V., ZOLFAGHARI, B., SAJJADI, S. E., SCALA, F. & LANZOTTI, V. 2007. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry*, 68, 596-603.
- BELINE, F., MARTINEZ, J., MAROL, C. & GUIRAUD, G. 1998. Nitrogen transformations during anaerobically stored 15 N-labelled pig slurry. *Bioresource technology*, 64, 83-88.
- BENINI, S., RYPNIEWSKI, W. R., WILSON, K. S., MILETTI, S., CIURLI, S. & MANGANI, S. 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, 205-216.
- BRITO, T. O., SOUZA, A. X., MOTA, Y. C. C., MORAIS, V. S. S., DE SOUZA, L. T., DE FÁTIMA, Â., MACEDO, F. & MODOLO, L. V. 2015. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. *RSC Advances*, 5, 44507-44515.
- BRUMM, M. C., DAHLQUIST, J. M. & HEEMSTRA, J. M. 2000. Impact of feeders and drinker devices on pig performance, water use, and manure volume. *Swine Health and Production*, 8, 51-58.
- CARLILE, F. S. 1984. Ammonia in poultry houses: A literature review. *World's Poultry Science Journal*, 40, 99-113.
- CARLSSON, H. & NORDLANDER, E. 2010. Computational modeling of the mechanism of urease. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2010.
- CASTRO, M. 2005. Uso de aditivos en la alimentación de animales monogástricos.
- CHEEKE, P. R. 2000. Actual and potential applications of and saponins in human and animal nutrition. *Journal of Animal science*, 77, 1-10.
- CHEL-GUERRERO, L., MALDONADO-HOIL, M., BURGOS-PÉREZ, A., CASTELLANOS-RUELAS, A. & BETANCUR-ANCONA, D. 2011. Functional and some nutritional

- properties of an isoelectric protein isolate from Mexican cowpea (*vigna unguiculata*) seeds. *Journal of Food and Nutrition Research (Slovak Republic)*.
- COSTA, A., FERRARI, S. & GUARINO, M. 2012. Yearly emission factors of ammonia and particulate matter from three laying-hen housing systems. *Animal production science*, 52, 1089-1098.
- DONOSO, C. 2005. Árboles nativos de Chile. *Guía de reconocimiento. Edición, 4*.
- DUFFY, C. & BROOKS, P. Using *Yucca schidigera* in pig diets: effects on nitrogen metabolism. *In: JACQUES, T. P. L. A. K. A., ed. Proceedings Alltech's 14 Annual Symposium on Biotechnology in the feed industry., 1998 Nottingham University Press, Loughborough, Leics, Uk. 61-71.*
- DUFFY, C. F., KILLEEN, G. F., CONNOLLY, C. D. & POWER, R. F. 2001. Effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* Roezl ex Ortgies and its saponin and non-saponin fractions on rat metabolism. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 3408-3413.
- DÍAZ, A. & ORTEGÓN, A. S. 2000. Producción comparativa de chícharo de vaca (*Vigna unguiculata*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) en riego y en sequía. *Agronomía Mesoamericana*, 11, 25-30.
- FARRUGIA, M. A., MACOMBER, L. & HAUSINGER, R. P. 2013. Biosynthesis of the urease metallocenter. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 13178-13185.
- FIRESTONE, M. K. & DAVIDSON, E. A. 1989. Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*, 47, 7-21.
- GARCÍA IZQUIERDO, C. 2003. *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*, Ediciones Mundi-Prensa.
- GATES, R. S., CASEY, K. D., WHEELER, E. F., XIN, H. & PESCATORE, A. J. 2008. U.S. broiler housing ammonia emissions inventory. *Atmospheric Environment*, 42, 3342-3350.
- GRANITO, M., GUERRA, M., TORRES, A. & GUINAND, J. 2004. Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna Sinensis*. *Interciencia*, 29, 521-526.
- GÓMEZ, C. 2011. Cowpea: post-harvest operations. *FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- HAMELIN, L., GODBOUT, S., THÉRIAULT, R. & LEMAY, S. P. 2010. Evaluating ammonia emission potential from concrete slat designs for pig housing. *biosystems engineering*, 105, 455-465.

- HANIF, M., SALEEM, M., HUSSAIN, M. T., RAMA, N. H., ZAIB, S., ASLAM, M. A. M., JONES, P. G. & IQBAL, J. 2012. Synthesis, urease inhibition, antioxidant and antibacterial studies of some 4-amino-5-aryl-3H-1, 2, 4-triazole-3-thiones and their 3, 6-disubstituted 1, 2, 4-triazolo [3, 4-b] 1, 3, 4-thiadiazole derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 854-860.
- HANSEN, M. J., CHWALIBOG, A. & TAUSON, A.-H. 2007. Influence of different fibre sources in diets for growing pigs on chemical composition of faeces and slurry and ammonia emission from slurry. *Animal feed science and technology*, 134, 326-336.
- HANSEN, M. N., SOMMER, S. G. & MADSEN, N. P. 2003. Reduction of ammonia emission by shallow slurry injection. *Journal of Environmental Quality*, 32, 1099-1104.
- HERNÁNDEZ, Y. G. & CURBELO, Y. G. 2015. Uso de aditivos en la alimentación animal: 50 años de experiencia en el Instituto de Ciencia Animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 49, 173-177.
- HERRERO, M. A. & GIL, S. B. 2008. Consideraciones ambientales de la intensificación en producción animal. *Ecología austral*, 18, 273-289.
- HOGBERG, M. G., FALES, S. L., KIRSCHENMANN, F. L., HONEYMAN, M. S., MIRANOWSKI, J. A. & LASLEY, P. 2005. Interrelationships of animal agriculture, the environment, and rural communities. *J. Anim. Sci*, 83, E13-E17.
- HOSTETTMANN, K. & MARSTON, A. 2005. *Saponins*, Cambridge University Press.
- HRISTOV, A. N. & JOUANY, J. P. 2005. Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle and Environment. AN Hristov and E. Pfeffer, ed. CAB International, Wallingford, UK*, 117-166.
- KATSUNUMA, Y., OTSUKA, M., NAKAMURA, Y., TOYODA, A., TAKADA, R. & MINATO, H. 2000. Effects of the administration of *Yucca shidigera* saponins on pigs intestinal microbial population. *日本畜産学会報*, 71, 594-599.
- KEREM, Z., GERMAN-SHASHOUA, H. & YARDEN, O. 2005. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 406-412.
- KHAN, I., ALI, S., HAMEED, S., RAMA, N. H., HUSSAIN, M. T., WADOOD, A., UDDIN, R., UL-HAQ, Z., KHAN, A. & ALI, S. 2010. Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1, 2, 4-triazole and 1, 3, 4-thiadiazole derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 45, 5200-5207.

- KIM, I. H. & CHO, J. H. *Feed additive useful in feed composition for poultry including chicken, duck and turkey, comprises Yucca schidigera extract or its fractions, and carbohydase.*
- KIM, K. Y., KO, H. J., KIM, H. T., KIM, Y. S., ROH, Y. M., LEE, C. M. & KIM, C. N. 2008. Quantification of ammonia and hydrogen sulfide emitted from pig buildings in Korea. *Journal of environmental management*, 88, 195-202.
- KIM, Y.-J., WANG, P., NAVARRO-VILLALOBOS, M., ROHDE, B. D., DERRYBERRY, J. & GIN, D. Y. 2006. Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaja saponaria*: synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21Aapi. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 11906-11915.
- KRISTENSEN, H. H. & WATHES, C. M. 2000. Ammonia and poultry welfare: a review. *Worlds Poultry Science Journal*, 56, 235-245.
- LACHANCE, I., GODBOUT, S., LEMAY, S. P., LAROUCHE, J. P. & POULIOT, F. Separation of pig manure under slats: to reduce releases in the environment. 2005.
- LEEK, A. B. G., BEATTIE, V. E. & O'DOHERTY, J. V. 2004. effects of dietary oil inclusion and oil source on apparent digestibility, faecal volatile fatty acid concentration and manure ammonia emission. *Animal science: an international journal of fundamental and applied research*.
- LI, H., HUANG, W., WEN, Y., GONG, G., ZHAO, Q. & YU, G. 2010. Anti-thrombotic activity and chemical characterization of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* CH Wright. *Fitoterapia*, 81, 1147-1156.
- LI, W. & POWERS, W. 2012. Effects of saponin extracts on air emissions from steers. *Journal of Animal Science*, 90, 4001-4013.
- LON-WO, E. 2003. La producción avícola y la contaminación ambiental. *curso: La nutrición y la fisiología digestiva en la producción de animales monogástricos y su impacto ambiental. VII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos. Mérida, Yucatán. México.*
- LONGO, R. M. & MELO, W. J. D. 2005. Hidrólise da uréia em latossolos: efeito da concentração de uréia, temperatura, pH, armazenamento e tempo de incubação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29, 651-657.
- LOWE, J. A. & KERSHAW, S. J. 1997. The ameliorating effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal aroma. *Research in Veterinary Science*, 63, 61-66.

- LU, M., LAMICHHANE, P., LIANG, F., IMERMAN, E. & CHAI, M. 2008. Identification of odor causing compounds in a commercial dairy farm. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, 8, 359-367.
- LYNCH, B., CALLAN, J. J. & O'DOHERTY, J. V. 2009. The interaction between dietary crude protein and fermentable carbohydrate source on piglet post weaning performance, diet digestibility and selected faecal microbial populations and volatile fatty acid concentration. *Livestock Science*, 124, 93-100.
- MACKIE, R. I., STROOT, P. G. & VAREL, V. H. 1998. Biochemical identification and biological origin of key odor components in livestock waste. *Journal of Animal Science*, 76, 1331-1342.
- MONTENY, G. J. 1996. Technical possibilities to reduce ammonia emissions from animal husbandry. *Progress in Nitrogen Cycling Studies*. Springer.
- MOSES, T., PAPADOPOULOU, K. K. & OSBOURN, A. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49, 439-462.
- NAZIR, M. S. 2001. Effect of yucca saponin on urease activity and development of ascites in broiler chickens.
- NDEGWA, P. M., HRISTOV, A. N., AROGO, J. & SHEFFIELD, R. E. 2008. A review of ammonia emission mitigation techniques for concentrated animal feeding operations. *Biosystems Engineering*, 100, 453-469.
- OLESZEK, W., SITEK, M., STOCHMAL, A., PIACENTE, S., PIZZA, C. & CHEEKE, P. 2001. Steroidal saponins of *Yucca schidigera* Roezl. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 4392-4396.
- OLESZEK, W. A. 2002. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*, 967, 147-162.
- PARSONNET, J., FRIEDMAN, G. D., VANDERSTEEN, D. P., CHANG, Y., VOGELMAN, J. H., ORENTREICH, N. & SIBLEY, R. K. 1991. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 325, 1127-1131.
- PESCATORE, A. J., CASEY, K. D. & GATES, R. S. 2005. Ammonia emissions from broiler houses. *Journal of Applied Poultry Research*, 14, 635-637.
- PIACENTE, S., PIZZA, C. & OLESZEK, W. 2005. Saponins and Phenolics of *Yucca schidigera* Roezl: Chemistry and Bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, 4, 177-190.
- POLACCO, J. C. & HOLLAND, M. A. 1993. Roles of urease in plant cells. *International review of cytology*, 65-65.

- RAPPERT, S. & MÜLLER, R. 2005. Odor compounds in waste gas emissions from agricultural operations and food industries. *Waste Management*, 25, 887-907.
- RETA SÁNCHEZ, D. G., CASTELLANOS GALVÁN, P. C., OLAGUE RAMÍREZ, J., QUIROGA GARZA, H. M., SERRATO CORONA, J. S. & GAYTÁN MASCORRO, A. 2013. Potencial forrajero de cuatro especies leguminosas en el ciclo de verano en la Comarca Lagunera. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4, 659-671.
- ROLDAN & L.P., R., G.L. 2013. EVALUACIONES DEL USO DE PRODUCTOS CON EXTRACTO DE YUCCA SCHIDIGERA PARA EL CONTROL DEL AMONÍACO. *Plumazos, Asociación colombiana de médicos veterinarios y zootecnistas especialistas en avicultura*, 44, 4-14.
- ROUF, M. A. & LOMPNEY, R. F. 1968. Degradation of uric acid by certain aerobic bacteria. *Journal of bacteriology*, 96, 617-622.
- SANHUEZA, E. 1982. The role of the atmosphere in nitrogen cycling. *Nitrogen Cycling in Ecosystems of Latin America and the Caribbean*. Springer.
- SANTACRUZ-REYES, R. A. & CHIEN, Y.-H. 2010. Ammonia reduction in seawater by *Yucca schidigera* extract: efficacy analysis and empirical modelling. *Aquaculture Research*, 41, 1221-1228.
- SANTACRUZ-REYES, R. A. & CHIEN, Y.-H. 2012. The potential of *Yucca schidigera* extract to reduce the ammonia pollution from shrimp farming. *Bioresource technology*, 113, 311-314.
- SOLANO, L. S., GUERRERO, L. A. C., CAMPOS, M. R. S., ANCONA, D. A. B. & RUELAS, A. F. C. 2015. Tannins and Saponins in Two Tropical Legumes and Measurement of their Biological Activity. *Annual Research & Review in Biology*, 5, 221.
- SOMMER, S. G., ZHANG, G.-Q., BANNINK, A., CHADWICK, D., MISSELBROOK, T., HARRISON, R., HUTCHINGS, N. J., MENZI, H., MONTENY, G. J. & NI, J. Q. 2006. Algorithms determining ammonia emission from buildings housing cattle and pigs and from manure stores. *Advances in Agronomy*, 89, 261-335.
- STEINFELD, H., GERBER, P., WASSENAAR, T. D., CASTEL, V. & DE HAAN, C. 2006. *Livestock's long shadow: environmental issues and options*, Food & Agriculture Org.
- STRYER, L. 1988. *Bioquímica*, Universidad del Rosario.
- TERRÓN, P. U. 1999. Utilización de fertilizantes con liberación controlada de nutrientes. *Vida rural*, 37-40.
- TORAL, M. & ROSENDE, R. 1986. Producción y productividad de quillay. *Renares*, 3, 19-21.

- TORELLO, W. A. & WEHNER, D. J. 1983. Urease activity in a Kentucky bluegrass turf. *Agronomy Journal*, 75, 654-656.
- TUNDIS, R., BONESI, M., DEGUIN, B., LOIZZO, M. R., MENICHINI, F., CONFORTI, F., TILLEQUIN, F. & MENICHINI, F. 2009. Cytotoxic activity and inhibitory effect on nitric oxide production of triterpene saponins from the roots of *Physospermum verticillatum* (Waldst & Kit)(Apiaceae). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17, 4542-4547.
- UNA. 2014. Unión Nacional de Avicultores. En: www.una.org.mx.
- UPADHYAY, L. S. B. 2012. Urease inhibitors: A review. *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 381-388.
- WALLACE, R. J., ARTHAUD, L. & NEWBOLD, C. J. 1994. Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 60, 1762-1767.
- WANG, G. X., HAN, J., ZHAO, L. W., JIANG, D. X., LIU, Y. T. & LIU, X. L. 2010. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. *Phytomedicine*, 17, 1102-1105.
- WANG, Y., ZHANG, Y., ZHU, Z., ZHU, S., LI, Y., LI, M. & YU, B. 2007. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15, 2528-2532.
- WEATHERBURN, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39, 971-974.
- WING, S., HORTON, R. A., MARSHALL, S. W., THU, K., TAJIK, M., SCHINASI, L. & SCHIFFMAN, S. S. 2008. - Air pollution and odor in communities near industrial swine operations. *Environ Health Perspect*, 116, - 1362.
- WITTE, C.-P. & MEDINA-ESCOBAR, N. 2001. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical biochemistry*, 290, 102-107.
- YOSHIKI, Y., KUDOU, S. & OKUBO, K. 1998. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 2291-2299.
- YUE, L. Y. & QIAO, S. Y. 2008. Effects of low-protein diets supplemented with crystalline amino acids on performance and intestinal development in piglets over the first 2 weeks after weaning. *Livestock Science*, 115, 144-152.
- ZHU, J. 2000. A review of microbiology in swine manure odor control. *Agriculture, ecosystems & environment*, 78, 93-106.

CAPITULO III

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El extracto de saponinas a partir de la cascarilla de *Vigna unguiculata* inhibirá la actividad de la enzima ureasa.

Objetivo general

Evaluar la actividad inhibitoria del extracto de saponinas de la cascarilla de *Vigna unguiculata* sobre la actividad de la ureasa.

Objetivos específicos

1. Cuantificar las saponinas presentes en los extractos etanólicos de las cascarillas de *Vigna unguiculata*.
2. Identificar las saponinas presentes en extractos de las cascarillas de *Vigna unguiculata* por cromatografía de líquidos de alta resolución.
3. Evaluar la actividad inhibitoria de la ureasa del extracto de saponinas de las cascarillas de *Vigna unguiculata* mediante ensayos *in vitro*.

CAPITULO IV

4. ARTÍCULO CIENTÍFICO

*Nota: artículo redactado de acuerdo al formato de la revista *Animal Feed Science and Technology*.

***Efecto inhibitor de las saponinas de *Vigna unguiculata* sobre la actividad de la ureasa**

Jonatan J. Narváez¹, Arturo F. Castellanos ¹, Maira R. Segura¹, Leticia Olivera ²,

¹Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, 97203 Mérida, Yucatán, México.

²Laboratorio de nutrición acuícola del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN Mérida. Antigua carretera a Progreso Km 6, Cordemex, Loma Bonita Xcumpich, 97310 Mérida, Yuc.

Corresponding author: maira.segura@correo.uady.mx

RESUMEN

El incremento de la producción avícola, aumenta la emisión de gases tóxicos como amoníaco (NH₃), el cual proviene de la degradación de la urea por acción de la ureasa. Emisiones considerables de amoníaco en granjas, afectan negativamente la salud y el comportamiento productivo de las aves. Una estrategia usada para mitigar el NH₃ en granjas de aves, es el uso de aditivos que contienen saponinas, a las cuales se les atribuye tener un efecto inhibitor de la ureasa. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de las saponinas de cascarilla de *Vigna unguiculata* como extracto crudo (Vu-EC) y semipurificado (Vu-SP), sobre la actividad inhibitoria de la ureasa *in vitro*. Las cascarillas de *V. unguiculata* se consiguieron de semillas maduras, previamente secadas en un horno de flujo de aire caliente a 60°C durante 24 h. Posteriormente, se obtuvieron las saponinas de las cascarillas, mediante una extracción asistida por Microondas usando etanol al 50% (v/v), fueron semipurificadas por extracción por fase sólida. A los extractos obtenidos se les realizaron análisis cualitativos, para comprobar la presencia de saponinas y después se cuantificó por un método colorimétrico, usando diosgenina como

estándar. Las fracciones fueron identificadas por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Se usó una reacción de indofenol e hipoclorito de sodio para medir la actividad inhibitoria de la ureasa, se establecieron diferencias significativas ($P < 0.05$) por medio de Tukey. Se determinó que las cascarillas de *V. unguiculata* contienen $3.24 \% \pm 0.08$ de saponinas en base seca equivalentes a diosgenina; en Vu-EC y Vu-SP se determinó una concentración de saponinas de 57.7 ± 0.07 y $77.0 \pm 0.08 \%$, respectivamente. Por CCF se identificaron dos fracciones pertenecientes a saponinas, y en CLAR se identificaron a una $\lambda = 215$, estas mismas dos fracciones en los tiempos de retención 2.43 y 2.63 min. El porcentaje máximo de inhibición de la ureasa fue de $48.32 \pm 0.08\%$, perteneciente a Vu-SP en una concentración de $4500 \mu\text{g/ml}$, superior a la *Y. schidigera* (YS) $32.87 \pm 0.27 \%$ usada como testigo determinado en la misma concentración. Los resultados demuestran que las saponinas de *V. unguiculata* tienen un efecto inhibitor sobre la ureasa. Sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para identificar la estructura de las mismas.

Palabras clave: Amoniaco, saponinas, *Vigna unguiculata*, *Yucca schiguera*, ureasa

INTRODUCCIÓN

La avicultura es una de las vías de mayor eficiencia y corta duración para obtener proteína de alta calidad para el consumo humano, por lo cual, se prevé aumentará su producción en las próximas décadas. Según cifras de la FAO en 2015, la carne de ave representó el 35.2 % del total producido y es la más comercializada con 41.3% en el mundo.

Sin embargo, el crecimiento de la producción avícola en sistemas intensivos, aumenta la generación de residuos orgánicos como las excretas y por tanto, el incremento de las emisiones de gases tóxicos como amoniaco el cual proviene de la degradación de urea por acción de la ureasa. Concentraciones mayores a 25 ppm de amoniaco en granjas de pollos, producen efectos negativos en las aves tales, como como: el impedir su desarrollo, aumentar su susceptibilidad a enfermedades respiratorias, así como reducir su apetito y producción de huevos. Por lo anterior,

es importante para las granjas mantener el control de las concentraciones de amoníaco para una mejor producción y no arriesgar la salud de las aves (Kristensen y Wathes, 2000).

Por otra parte, el amoníaco acumulado que se emite en las granjas avícolas, es precursor del óxido nítrico (NO), por el cual contribuye al efecto invernadero de manera indirecta (Sanhueza, 1982).

Ante el problema de las emisiones de amoníaco en granjas, se han tomado medidas tecnológicas para su control, alguna de ellas son: la instalación de sistemas de ventilación (Hansen *et al.*, 2003), lo cual resulta costoso al importarse a México equipos del extranjero; cambio en dietas (Leek *et al.*, 2004), que consiste en disminuir la inclusión de los niveles de proteína respetando el requerimiento de aminoácidos esenciales de los animales y el uso de aditivos alimenticios como el extracto de *Yucca schidiguera* y *Quillaja saponaria*, del cual se han obtenido reducciones significativas del amoníaco emitido inhibiendo a la enzima ureasa (Li y Powers, 2012), acción atribuida a su concentración de saponinas 10 y 6%, respectivamente. En el mercado mundial existe una amplia variedad de aditivos alimenticios que provienen de la *Y. Schidigera* y *Q. saponaria*, la mayoría de origen extranjero. Para México lo anterior ha generado una dependencia tecnológica parcial hacia otros países.

En Yucatán, existe una gran variedad de plantas susceptibles de utilizar en la obtención de saponinas, entre ellas destaca la leguminosa *Vigna unguiculata*. Las cáscaras de ésta presentan un contenido de saponinas de 4.73 % (Solano *et al.*, 2015). Dada su adaptabilidad agronómica a la zona y su contenido en saponinas en las cáscaras, la *V. unguiculata* representa una alternativa viable para obtener extractos de saponinas para ser empleados en la industria de alimentación animal. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar la actividad inhibitoria de la ureasa del extracto de saponinas y saponinas purificadas de la cascarilla de *V. unguiculata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se usaron semillas maduras de *V. unguiculata*, obtenidas de las parcelas en Yaxcabá, Yucatán en enero de 2016.

Harina de *Vigna unguiculata*

Se seleccionaron las mejores semillas, se limpiaron manualmente, eliminando todas las impurezas y se seleccionaron las que estuvieron libres de infestaciones de insectos. Se trituraron 10 kg de semillas en un molino de discos, seguidamente se separó la cáscara mediante cribado. Se utilizó el molino Cyclotec 1093 (tecator Sweden) con una malla número 80 y posteriormente otra de 100, para obtener una harina más fina.

Extracción de saponinas

La extracción de saponinas se efectuó siguiendo la metodología propuesta por (Kerem *et al.*, 2005). 5 g de la harina de *V. unguiculata* se mezclaron con 70 mL de etanol al 50% en un cartucho cerrado. Posteriormente, se metió en un horno de microondas (Mars Xpress plus) y se irradió a 2450 Mhz por 20 min a una temperatura constante de 60°C. Se controló la temperatura con un sensor de fibra óptica Probe MTS 300. Después del tiempo transcurrido, el extracto crudo (Vu-EC) se filtró y seguidamente se evaporó a 60 °C. Finalmente, se centrifugó a 10,000 x g por 15 min. El sobrenadante se liofilizó y se resguardó para su análisis.

Extracción por fase sólida

Para semipurificar el extracto crudo, se extrajo en un cartucho de fase solida Oasis HLB Cartridge 20cc (Waters Corporation, MA, USA). Se acondicionó la columna con metanol y agua desionizada, después se añadió 1 g de muestra diluida en 20 ml de agua, las fracciones con contenidos de saponinas se obtuvieron con metanol al 100%, posteriormente se evaporó el metanol, se resuspendió en agua, liofilizó

obteniendo las saponinas semipurificadas (Vu-SP) y se resguardaron hasta su análisis.

Ensayos cualitativos para saponinas

A partir del extracto obtenido se realizaron los siguientes ensayos para identificar la presencia de saponinas.

Prueba de espuma

Se agitó el extracto diluido en agua durante 5 min, la persistencia de la espuma durante más de 2min, indica la presencia de saponinas (Valencia *et al.*, 2005).

Prueba de Salkowski

Se tomó 1mg del extracto y se le añadió 2 ml de cloroformo y 2 ml de ácido sulfúrico. Una coloración anaranjada-marrón indica la presencia de saponinas (Valencia *et al.*, 2005).

Índice hemolítico

Se determinó el índice hemolítico siguiendo una modificación del método de Valencia *et al.*, (2005). Se preparó una suspensión de glóbulos rojos con solución de NaCl al 0.9%, en una concentración de 2 % v/v. Posteriormente, en una placa de microplatos se añadieron 150 µl de solución salina. Después, se añadió al primer pocillo 150 µl de muestra a una concentración de 10 mg/ml y se hicieron diluciones en los pocillos siguientes hasta obtener una concentración final de 1.4µg/ml. Finalmente, se agregó 50µl de solución de glóbulos rojos y se resguardó a temperatura ambiente durante 24 h, se usó solución salina como control negativo y *Q. saponaria* (QS) SIGMA S4521 como testigo.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Para CCF se usó silica gel 60G 20 × 20 cm (Merck) como fase estacionaria y acetoneitrilo: metanol: agua, 1:1:1 como fase móvil. Como revelador se usó el

reactivo Liebermann-Buchard para identificar el tipo y fracciones correspondientes a saponinas. Finalmente, se calentó a 100°C por 10 min.

Cuantificación de saponinas

La cuantificación de las saponinas presentes en los extractos de *V. unguiculata* se efectuó mediante la metodología propuesta por Kerem *et al.*, (2005). Las saponinas se cuantificaron en una reacción de mezcla colorimétrica: La muestra (0.2 mg – 1 mg) se disolvió en ácido acético (1.5 ml), posteriormente se añadió 1 ml de ácido sulfúrico y se incubó por 15 min, posteriormente se leyó a una absorbancia de 530 nm, se usó diosgenina como estándar.

Identificación por CLAR

Se empleó un cromatógrafo de líquidos equipado con bomba cuaternaria, desgasificador, detector UV, una columna para fase reversa C-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) y la temperatura de la columna fue de 25 °C. Como eluyente se usó agua grado acetonitrilo (A), metanol (B) y agua (C) a un flujo de 0.1 mL/min de modo isocrático al 33% de A, 33 % B y 34% C, por 15 min.

La identificación de las saponinas presentes en los extractos se hizo a partir de los tiempos de retención y la intensidad de las señales cromatográficas obtenidas.

Actividad inhibitoria *in vitro* de la ureasa

Para evaluar el efecto inhibitor de la ureasa del extracto crudo y de las saponinas semipurificadas se prepararon mezclas de reacción conteniendo, 50 µL de enzima (2 mg/ml), 850 µL de solución amortiguadora 125 mM de urea (pH 6.8) y 100 µL del extracto y las saponinas semipurificadas en las siguientes concentraciones: 350, 750, 1500, 2500, 3500 y 4500 µg/ml; la mezcla se incubó a 37 °C por 30 min (Golbabaie *et al.*, 2013). La inhibición de la ureasa se determinó midiendo la producción de amoníaco usando el método de indofenol descrito por Weatherburn, (1967). A las mezclas de reacción se le agregó 50 µL de indofenol al 1% (p/v) con 0.005% de nitro prusiato de sodio y 50 µL de hidróxido de sodio 0.5% (p/v) con 0.1% (p/v) de hipoclorito de sodio. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado.

La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 655 nm. Se usó extracto de *Y. schidigera* comercial como testigo a las mismas concentraciones evaluadas en los extractos, el cual contiene un porcentaje de 10% de saponinas de tipo esteroidal. El porcentaje de inhibición de la actividad de la ureasa se calculó con la fórmula propuesta por Khan *et al.*, (2010):

$$(\text{AbsM}/\text{AbsC}) \times 100$$

Dónde: AbsM es la absorbancia de las mezclas de reacción en presencia del extracto o las saponinas purificadas. AbsC es la absorbancia de la mezcla de reacción en ausencia del extracto evaluado.

Análisis estadístico. Los resultados se procesaron mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central y dispersión. Los datos obtenidos de la determinación del contenido total de saponinas, de identificación y cuantificación de saponinas por CLAR, de la actividad inhibitoria *in vitro* de la ureasa fueron evaluados con análisis de varianza usando el procedimiento PROC ANOVA de SAS® 9.2 (SAS Institute, 2006) y comparación de medias (Tukey) para establecer diferencias significativas ($P < 0.05$), el modelo estadístico utilizado fue el $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$.

RESULTADOS

Se evaluaron 2 muestras de la cascarilla de *V. unguiculata* en este estudio, el extracto crudo (Vu-EC) y el extracto semipurificado (Vu-SP), los resultados de los ensayos cualitativos se muestran en la tabla 1.

Tabla. 1 Ensayos cualitativos para saponinas

Ensayo cualitativo	Vu-EC	Vu-SP
Ensayo de espuma	Espuma persiste por más de 2 minutos (+)	Espuma persiste por más de 2 minutos (+)
Prueba de Salkowski	Coloración marrón (+)	Coloración marrón (+)
Actividad hemolítica	Se observó hemolisis (+)	Se observó hemolisis (+)

Las muestras Vu-EC y Vu-FS reportaron la misma actividad hemolítica, 156.2 µg/ml de muestra para generar hemólisis. La QS por otra parte necesitó 9.76 µg/ml para generar hemólisis, es decir, las saponinas de QS, tiene una mayor actividad hemolítica comparado con las saponinas de *V. unguiculata*.

Cuantificación de saponinas en las cascarillas de *V. unguiculata*

La concentración de saponinas detectadas en las cascarillas *V. unguiculata* se determinó mediante la curva de calibración de diosgenina ($Y = 0.515x - 0.0365$) y $R^2 = 0.98$, en la cual se obtuvo $3.24 \% \pm 0.08$ de saponinas por g de cascarilla seca. En cuanto a la concentración de saponinas en Vu-EC y Vu-SP, fue de 57.7 ± 0.07 y 77.0 ± 0.08 %, respectivamente. La muestra semipurificada mostró un aumento de un 19.3% en su concentración con respecto al extracto crudo.

Cromatografía en capa fina

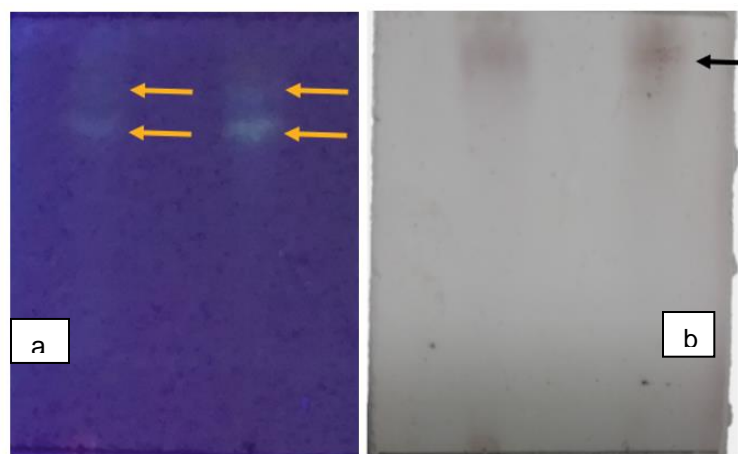


Figura 1. Identificación de saponinas de *Vigna unguiculata* por cromatografía en capa fina, (a) cromatograma visto desde luz ultravioleta y (b) cromatograma que identifica el aglicón triterpénico por medio del revelador Liebermann-Buchard.

El cromatograma (a) de la Figura 1, indicó la presencia de 2 fracciones pertenecientes a saponinas, estas se observan en ambas muestras, sin embargo, en la línea derecha que pertenece a Vu-SP, las bandas son más visibles, lo que indica una mayor concentración de saponinas. En el cromatograma (b) se muestra

una coloración marrón en ambas líneas, esto se debe a la reacción del revelador Liebermann-Buchard con el núcleo de la saponina, lo cual indicó que los aglicones son de tipo tritérico.

CLAR

No se observó la resolución de ningún pico para la Vu-EC y el cromatograma de Vu-SP se muestra en la figura 2, en la cual se visualiza 2 picos en el tiempo 2.43 y 2.63, que corresponden a saponinas.

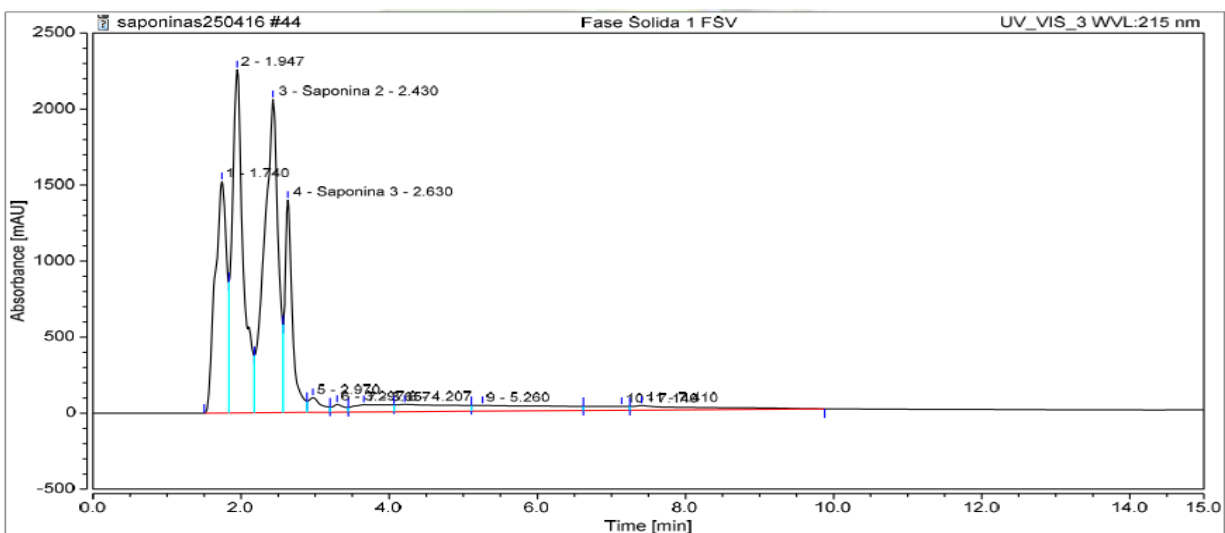


Figura 2. Identificación de las saponinas de *Vigna unguiculata*, cromatograma monitoreado a $\lambda=215$.

Actividad inhibitoria de la ureasa

Los resultados se presentan en la figura 3, donde la mayor actividad inhibitoria registrada fue del $48.32 \pm 0.08\%$, la cual pertenece a Vu-SP en comparación con *Y. schidigera* (YS) que se usó como estándar y Vu-EC, los anteriores mostraron una capacidad inhibitoria del $32.87 \pm 0.27\%$ y $41.34 \pm 0.02\%$ respectivamente, a una concentración de $4500\mu\text{g/ml}$. No hubo diferencia significativa entre los extractos ($P > 0.05$).

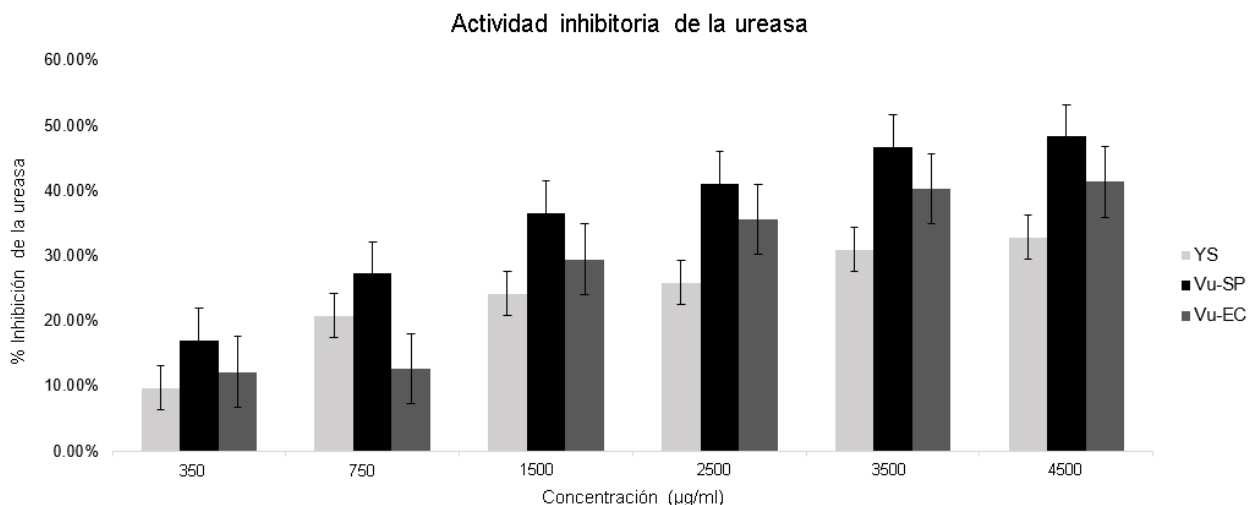


Figura 3. Actividad inhibitoria de la ureasa a diferentes concentraciones de inhibidores

Discusión

Las pruebas cualitativas de espuma y la reacción de Salkowski realizadas indican la presencia de saponinas en los extractos evaluados, la actividad hemolítica de Vu-EC y Vu-FS fue menor que el estándar QS, a pesar de tener una mayor concentración de saponinas, esta baja actividad posiblemente pueda deberse a dos razones: La primera está en función de la estructura química de las saponinas de *V. unguiculata*, según Voutquenme *et al.*, (2002), mencionan que la actividad hemolítica depende principalmente de la cantidad de azúcares unidos en la cadenas y la presencia de enlaces estéricos en los C-3 y C-28. Generalmente tienen mayor actividad aquellas saponinas que presentan menor cantidad de azucars y mayor cantidad de enlaces estéricos. Cui *et al.*, (2013) identificaron la estructura química de dos saponinas de *V. unguiculata*, las cuales presentan una estructura bidesmosida (2 cadenas de azúcar) con 3 azucars cada cadena (rha, glu y gal) en el C-3 y C-28 y no tiene enlaces estéricos, a diferencia de la QS a pesar de ser bidemosida, contiene 2 enlaces estéricos en el C-28 (Kim *et al.*, 2006). Posiblemente, por tal razón presentó una mayor actividad que los extractos de *V. unguiculata*.

La segunda posible razón de la baja actividad hemolítica de Vu-EC y Vu-SP, se deba a la presencia de metabolitos con actividad hemaglutinante (un efecto contrario a la hemólisis), junto a la lectina, la cual diversos autores (Xavier *et al.*, 1989) han reportado que se encuentra en *V. unguiculata*.

La cuantificación de saponinas en la cascarilla de *V. unguiculata* (3.27%) del presente estudio, fue menor que la reportado por Solano *et al.*, (2015) quienes cuantificaron 4.7%. Esta variación podría ser, por el método de extracción utilizado en ambos experimentos, algunas diferencias son: el tiempo y solventes empleados, en este experimento se extrajo por microondas por 20 min y etanol al 50% y Solano *et al.*, (2015), extrajeron por agitación durante 24 h y metanol al 10%. La polaridad del metanol al 10% es mayor que el etanol al 50%, y se sabe que las saponinas son compuestos muy polares y, por tanto, debido a las diferencias de polaridades entre solventes pueda explicarse la eficacia de la extracción. Por otro lado, la materia prima usada en ambos experimentos pueda ser una explicación, esto porque el contenido de saponinas, es parte del metabolismo secundario de las plantas y aumenta su concentración en condiciones de estrés o en semillas inmaduras (Guajardo *et al.*, 2012).

Se identificó por cromatografía en capa fina que el aglicón de las saponinas de Vu-EC y Vu-SM es de tipo tritérpenico. Cui *et al.*, (2013) reportan un núcleo triterpénico para *V. unguiculata*, siendo común para las leguminosas. En ambas técnicas cromatográficas, CCP y CLAR, se detectaron en Vu-SP dos fracciones correspondientes a saponinas y, Kinjo *et al.*, (1997) también reportaron dos saponinas para *V. unguiculata*. Sin embargo, no se obtuvo una separación de compuestos por CLAR para Vu-EC, esto podría ser por las interacciones polares entre las cadenas de azúcares de las saponinas y otros metabolitos, además de que la concentración de saponinas en Vu-EC fue menor en Vu-SP.

Vu-SP mostró una mayor inhibición de la ureasa en comparación de Vu-EC y YS. Sin embargo, el contenido de saponinas de YS es menor que Vu-SP (10% y 77% respectivamente), sugiriendo que en el extracto de YS no sólo las saponinas tienen

un efecto inhibitor en la ureasa, sino que también otros compuestos. Chepete *et al.*, (2012) mencionan que en el extracto de YS, los estibalenos son los responsables de la reducción de amoniaco, actuando como inhibidores de la ureasa y no las saponinas. Sin embargo, en este estudio se demostró, que las saponinas extraídas de *V. unguiculata* si tienen un efecto inhibitor en la ureasa pero no son los únicos responsables en la inhibición, ya que posiblemente existe una sinergia entre los diversos componentes del extracto de YS.

Por otra parte, estudios han demostrado que las saponinas tienen un efecto antimicrobiano (Oyekunle *et al.*, 2006), por tanto, se sugiere que las saponinas podrían actuar disminuyendo la población de bacterias productoras de ureasas, por consiguiente, una menor conversión de la urea disponible en amoniaco.

Conclusión

Las saponinas presentes en Vu-EC y Vu-SM, tienen un mayor efecto inhibitor sobre la actividad de la ureasa que la YS. Sin embargo, aparentemente las saponinas no son los únicos inhibidores de ureasas, sino también otros glicocomponentes presentes en YS que actúan para disminuir la producción de amoniaco, inhibiendo a la ureasa. Futuras investigaciones son necesarias para identificar la estructura de las mismas.

Referencias

Chepete, H. J., Xin, H., Mendes, L. B., Li, H., & Bailey, T. B. (2012). Ammonia emission and performance of laying hens as affected by different dosages of *Yucca schidigera* in the diet. *The Journal of Applied Poultry Research*, 21(3), 522-530.

Cui, E. J., Cho, J. G., Chung, I. S., Kim, J. Y., Hong, S. G., & Baek, N. I. (2013). New Triterpenoid Saponins, Cowpeasaponins I and II, from Cowpea Seeds (*Vigna sinensis* K.). *Notes*, 34(8), 2499.

Guajardo-Flores, D., García-Patiño, M., Serna-Guerrero, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2012). Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food chemistry*, 134(3), 1312-1319.

Hansen, M. N., Sommer, S. G., & Madsen, N. P. (2003). Reduction of ammonia emission by shallow slurry injection. *Journal of Environmental Quality*, 32(3), 1099-1104.

Golbabaie, S., Bazl, R., Golestanian, S., Nabati, F., Omrany, Z. B., Yousefi, B., ... & Amanlou, M. (2013). Urease inhibitory activities of β -boswellic acid derivatives. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 2.

Kerem, Z., German-Shashoua, H., & Yarden, O. (2005). Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), 406-412.

Khan, S. S., Khan, A., Khan, A., Wadood, A., Farooq, U., Ahmed, A., ... & Erdemoglu, N. (2014). Urease inhibitory activity of ursane type sulfated saponins from the aerial parts of *Zygophyllum fabago* Linn. *Phytomedicine*, 21(3), 379-382.

Kim, Y. J., Wang, P., Navarro-Villalobos, M., Rohde, B. D., Derryberry, J., & Gin, D. Y. (2006). Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaja saponaria*: synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21Aapi. *Journal of the American Chemical Society*, 128(36), 11906-11915.

Kinjo, J., Yamashita, M., & Nohara, T. (1997). Triterpene Saponins from *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, *Canavalia gladiata*, and *Lupinus polyphyllus* x *arboreus*: Their Structures, Antihepatotoxic Activities, and Antioxidative Inactivity. In *Food Factors for Cancer Prevention* (pp. 323-327). Springer Japan.

Kristensen, H. H., & Wathes, C. M. (2000). Ammonia and poultry welfare: a review. *Worlds Poultry Science Journal*, 56(3), 235-245.

Leek, A. B. G., Beattie, V. E., & O'Doherty, J. V. (2004). effects of dietary oil inclusion and oil source on apparent digestibility, faecal volatile fatty acid concentration and manure ammonia emission. *Animal science: an international journal of fundamental and applied research*.

Li, W., & Powers, W. (2012). Effects of saponin extracts on air emissions from steers. *Journal of Animal Science*, 90, 4001-4013. doi:10.2527/jas.2011-4888.

Oyekunle, M. A., Aiyelaagbe, O. O., & Fafunso, M. A. (2006). Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. *African journal of Biotechnology*, 5(23).

Sanhueza, E. (1982). The role of the atmosphere in nitrogen cycling. In *Nitrogen Cycling in Ecosystems of Latin America and the Caribbean* (pp. 61-71): Springer.

SAS Institute., 2006. SAS/STAT Software, Version 9.00. SAS, Cary, NC

Solano, L. S., Guerrero, L. A. C., Campos, M. R. S., Ancona, D. A. B., & Ruelas, A. F. C. (2015). Tannins and Saponins in Two Tropical Legumes and Measurement of their Biological Activity. *Annual Research & Review in Biology*, 5(3), 221

Valencia, E. F., Mac Donald, D., Cuyos, M., Dueñas, R. 2005. Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. *Biotempo*. 5 .31-36

Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., & Men-Olivier, L. L. (2002). Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharmaceutical biology*, 40(4), 253-262.

Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, 39(8), 971-974.

Xavier-Filho, J., Campos, F. A. P., Ary, M. B., Silva, C. P., Carvalho, M. M., Macedo, M. L. R.,... & Grant, G. (1989). Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(4), 1139-1143.