

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD UREASICA RUMINAL IN VITRO POR EL ACIDO ACETOHIDROXAMICO^{a,b}

RUBEN CRUZ SOTO^c
JUAN LOPEZ^c
JOSE A. CUARON I.^d

RESUMEN.

Este experimento se realizó con la finalidad de medir el efecto inhibitor del ácido acetohidroxámico (AAH) ante diferentes concentraciones de urea y tiempos de reacción sobre la ureasa ruminal *in vitro*.

Como donadores de líquido ruminal se usaron borregos alimentados con una dieta rastrojo de maíz-sorgo con 1.53% de urea. Con ayuda de cámaras de Conway, se prepararon soluciones con cuatro concentraciones de AAH (90, 75, 150 y 225 mg/ml), dos concentraciones de urea (7.5 y 15 mg/ml), que se aplicaron en forma factorial a tres tiempos de incubación (60, 120 y 180 min.) en líquido ruminal mantenido a 40°C. En cada una de las 24 celdas producto del arreglo factorial se contó con seis observaciones.

La inclusión de AAH resultó en una inhibición no-competitiva de la actividad ureásica (P 0.01) equivalente al 79% de lo observado sin AAH y similar para los niveles del ácido de 75 a 225 mg/ml. En la interacción urea x tiempo de incubación (P 0.01), los tres tiempos dentro de cada nivel de urea se comportaron diferente, pero entre niveles de urea sólo se encontraron diferencias (p 0.01) a los 120 min: 42.4 vs. 33.3 mg N-NH₃ para los 15 y 7.5 mg de urea/ml en forma respectiva. La cantidad de N-NH₃ liberado después de 60 min. sin AAH (32 mg) fué similar a lo obtenido a los 120 min. cuando el AAH se incluyó a razón de 150 y 225 mg/ml (40 y 37 mg).

INTRODUCCION.

La ureasa es una enzima producida por gran número de bacterias anaerobias¹⁹ y anaerobias facultativas⁶ que habitan por lo común en el rumen. Esta enzima es muy activa, de tal manera que, al ofrecer dietas con altas concentraciones de urea, ésta va a ser hidrolizada hasta amoníaco (MH₃), lo cual da por resultado que el mayor factor limitante para el uso de la urea como suplemento protéico en dietas para ruminantes sea su gran velocidad de hidrólisis^{3, 8, 9, 16, 17}, sobre todo si es len-

a Recibido para su publicación el 15 de febrero de 1988.

b Financiado en parte por el PAIEPEME, A.C. Este trabajo corresponde a parte de la tesis del primer autor para la obtención del grado de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia, FMVZ-UNAM.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrición, CENID-Microbiología, INIFAP, Palo Alto, D.F., los autores agradecen la relevante participación de la M.Sc. Irma Tejada de Hernández; su invaluable asesoría en el montaje de las técnicas y el haberle facilitado el uso del laboratorio.

c CIFAP-HUI, INIFAP, Apdo. Postal 17, Huimanguillo, Tab. 86400.

d CENID-Fisiología, INIFAP, Apdo. Postal 29-A, Querétaro, Oro. 76020.

ta la hidrólisis de los hidratos de carbono incluídos en la dieta.

Blomfiels y Col.² indicaron que la velocidad de hidrólisis de urea ocurre cuatro veces más rápido que la incorporación de NH₃ a la proteína microbiana. De esto resulta en una considerable pérdida de nitrógeno para la síntesis. el exceso de NH₃ es absorbido y después eliminado sobre todo en forma de urea por vía renal¹⁰.

Bajo condiciones extremas, el NH₃ puede pasar a la sangre en cantidades tan altas que rebasan la capacidad del hígado para convertirlo en urea, lo cual provoca una intoxicación^{8,13}.

La inhibición de la actividad ureásica disminuye la tasa de liberación de NH₃ en el rumen. Esto origina, en forma hipotética, una más eficiente proteosíntesis bacteriana y, aunado a esto, una disminución en el riesgo de intoxicación^{7,10}.

Los hidroxomatos han probado ser potentes y específicos inhibidores de la ureasa, ya sea de origen vegetal o bacteriano^{11,12}, y se ha establecido que el grupo CONHOH es el responsable de la actividad inhibitoria¹¹.

El ácido acetohidroxámico (AAH) fue probado por Brent y Col³, sus estudios *in vitro* demostraron que al ser adicionado directo al líquido ruminal, en una concentración de 10 mg/ml, la producción de NH₃ decreció en un 50% y se inhibió por completo ante 200 mg/ml. Jones¹⁰ en pruebas *in vi-*

tro con el AAH, demostró que al añadir el compuesto la actividad ureásica se inhibió en un 84.2% a una concentración de 0.01 M. cabe aclarar que las concentraciones del substrato (urea) utilizadas en estos trabajos fueron muy bajas para lograr una saturación del sistema, cosa que puede suceder al ofrecer a los animales dietas con altas concentraciones de urea, por lo tanto, se deben probar concentraciones mayores a las utilizadas en dichos experimentos antes de proceder a su uso en la alimentación animal. Con el fin de obtener mayor información acerca del efecto del AAH sobre la ureasa en el líquido ruminal, se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Medir el efecto inhibitor del AAH sintetizado en laboratorio, sobre la ureasa ruminal *in vitro*.
- b) Observar el efecto inhibitor del AAH ante diferentes concentraciones del substrato (urea) y diferentes tiempos de reacción sobre la ureasa ruminal *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se realizó en el laboratorio central de nutrición animal del INIFAP, ubicado en Palo Alto, D.F.

Se utilizaron como donadores de líquido ruminal (LR) dos ovinos de raza Pelibuey, con un peso promedio de 32 ± 1.5 kg, antes desparasitados y vitaminados, con fistula permanente a nivel de rumen.

Se les ofreció agua y alimento a libertad, se adaptaron durante 21 días a una dieta con el 40% del nitrógeno total a partir de urea, para facilitar ajustes en la microbiota, de tal forma que aumentara la concentración de ureasa en LR. El alimento contenía rastrojo de maíz (61.1%), sorgo (35.3%), urea (1.5%) y minerales (2%), formulado a un 11% de PC y para satisfacer las demandas de nutrimentos esenciales según lo recomendado por NRC¹⁵.

Concluido el período de adaptación, se extrajeron 250 ml de LR directo de la fístula de cada borrego, se pasaron por cuatro capas de gasa, para de inmediato ser vaciados en un solo termo con el fin de mezclarlo y conservarlo a su temperatura original hasta el momento de llevarlo al laboratorio¹⁸.

Para la realización de las pruebas in vitro, se utilizaron dos soluciones con diferente concentración de AAH, (0, 150, 300 y 450 mg/m), como solvente se utilizó agua deionizada. El AAH utilizado fue sintetizado en este laboratorio según lo descrito por López y Cuarón¹⁴.

Ya en el laboratorio, el LR se depositó en cámaras de Conway. En el compartimiento externo de las cámaras se colocaron 2 ml de LR (enzima) + 1 ml de solución de AAH (inhibidor) + 1 ml de solución de urea (substrato), de tal forma que las concentraciones por cada ml de LR fueron de 0, 75, 150 y 225 mg de AAH, y de 7.5 y 15 mg de urea; en el compartimiento

interno, se añadieron 2 ml de ácido bórico de Conway⁵, para adaptar el nitrógeno amoniacal (N-NH₃) volátil producto de la hidrólisis de urea por la ureasa ruminal.

Después de colocar las soluciones respectivas en los compartimientos externo e interno, las cámaras se sellaron con vaselina, para evitar la fuga de N-NH₃ volátil, luego se sometieron a tres tiempos de incubación (60, 120 y 180 min.) en baño María a 40°C; en cada tiempo de incubación se incluyeron las dos diferentes concentraciones de urea y a cada concentración de urea, las cuatro concentraciones de AAH.

Al finalizar el tiempo de incubación asignado, se destaparon las cámaras correspondientes y se tituló el ácido bórico con HCl 0,001 N para calcular la cantidad de N-NH₃ volátil producto de la hidrólisis de urea.

Las unidades experimentales fueron las cámaras, se distribuyeron bajo un diseño experimental por completo al azar, en un arreglo factorial 4X3X2 (concentración de AAH x tiempos de incubación x concentración de urea), con seis observaciones por celda, la variable de respuesta fue el N-NH₃ volátil.

El análisis de varianza se realizó conforme al siguiente modelo.

$$Y_{ijkl} = M + A_l + T_j + AT_{ij} + U_k + AU_{ik} + ATU_{ijk} + E_{(ijk)l}$$

En donde:

Y_{ijkl} = la i-ésima observación del k-ésimo nivel de urea, del j-ésimo tiempo de incubación del i-ésimo nivel de AAH; M = la media población constante; A_i = i-ésimo nivel de AAH; T = el j-ésimo tiempo de incubación; AT_{ij} = el j-ésimo tiempo de incubación, del i-ésimo nivel de AAH; U_k = el k-ésimo nivel de urea; AU_{jk} = el i-ésimo nivel de AAH del k-ésimo nivel de urea; TU_{jk} = el k-ésimo nivel de urea, del j-ésimo tiempo de incubación; ATU_{ijk} = el k-ésimo nivel de urea del, j-ésimo tiempo de incubación del, i-ésimo nivel de AAH; $E_{(ijk)\bar{n}}$ = el error distribuido normal y en forma independiente con media cero y varianza uno.

La comparación entre medias se realizó conforme al método de SNK¹.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados del análisis de varianza mostraron efectos ($P < 0.01$) del tiempo de incubación del nivel de AAH y de las interacciones tiempo de incubación, x urea y tiempo de incubación x AAH.

El efecto del tiempo de incubación (Cuadro 1), se manifestó ($P < 0.01$) cuando se pronunció la liberación de $N-NH_3$ al aumentar el tiempo de incubación, lo cual coincide con la actividad típica de una enzima a una cantidad de sustrato en exceso, en donde la cantidad del producto (NH_3 en este

CUADRO 1

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION Y DE LOS NIVELES DE AAH SOBRE LA LIBERACION DE $N-NH_3$ VOLATIL IN VITRO^A

	TIEMPO DE INCUBACION (MINUTOS)				EEM
	60	120	180		
$N-NH_3$ (mg/100 ml)	12.3 ^C	37.8 ^C	75.4 ^D		1.074

	ACIDO ACETOHIDROXAMICO (mg/ml)				EEM
	0	75	150	225	
$N-NH_3$ (mg/100 ml)	102.4 ^B	24.1 ^C	21.4 ^C	19.4 ^C	1.24

A) MEDIAS DE MINIMOS CUADRADOS PARA LOS EFECTOS MAYORES DE TIEMPO $P < 0.01$ Y AAH ($P < 0.01$)-

B,C,D,) VALORES CON DISTINTA LITERAL SON DIFERENTES ENTRE SI ($P < 0.01$)

CUADRO 2.

INTERACCION ENTRE EL TIEMPO DE INCUBACION Y LA
CONCENTRACION DE LA LIBERACION DE N-NH₃ VOLATIL
IN VITRO^A

	TIEMPO DE INCUBACION (MINUTOS)			
	60	120	180	EEM
UREA 7,5	10.4 ^E	33.3 ^C	78.0 ^B	
UREA 15	14.3 ^D	42.4 ^C	78.2 ^B	1,518

A) MEDIAS DE MINIMOS CUADRADOS PARA LA INTERACCION UREA X TIEMPO (P<0.01),

B,C,D,E,) VALORES CON DISTINTA LITERAL SON DIFERENTES ENTRE SI - (P<0,01), EXPRESADOS EN MG/100 ML,

caso) liberado, irá en proporción directa con el tiempo de reacción⁴.

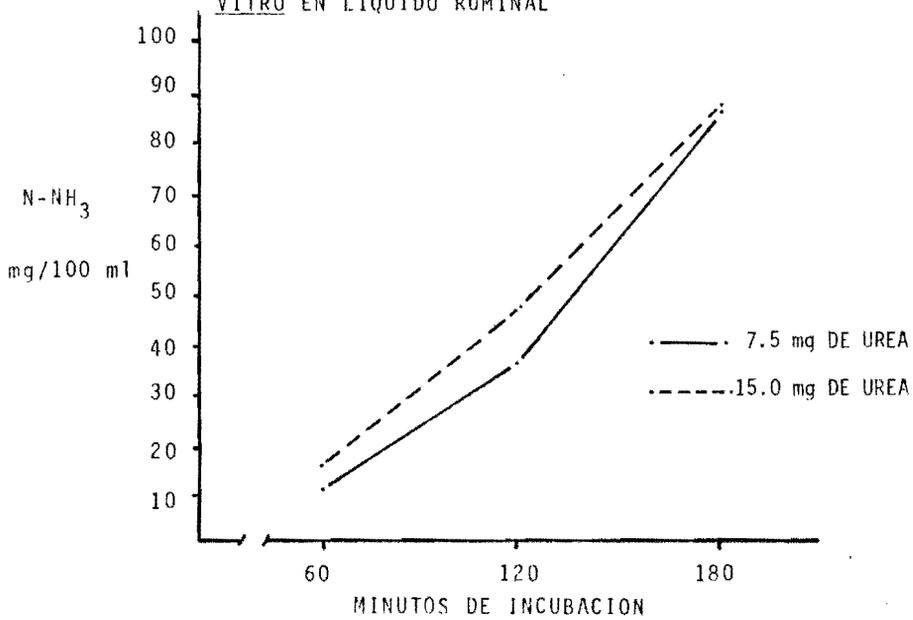
Ante la inclusión del AAH (Cuadro 1) se encontró que a 75, 150 y 225 mg de AAH/ml de LR, la liberación de N-NH₃ disminuyó (P < 0.01), en comparación con el tratamiento con 0 mg de AAH/ml, los que al análisis estadístico fueron similares (P > 0.01). Los tres niveles de adición del AAH, resultaron en una inhibición promedio del 79%, de tal manera que, de 75 a 225 mg/ml de AAH no se observó aumento significativo en la inhibición de la ureasa ruminal *in vitro* bajo las condiciones del estudio. En contraste con esto, Brent y Col³ encontraron que con una concentración de entre 5 y 10 mg de AAH/ml hubo una reducción de la velocidad inicial en un 50%, por otra parte, Jones¹⁰ observó una inhibición del 84.2% a 0.01 M de AAH, con la consideración de que en estos dos trabajos se utilizaron concentraciones muy bajas del sustrato.

En el Cuadro 2 se resume la interacción entre el tiempo de incubación y la concentración de urea. Se observa que el valor de N-NH₃ en los tres tiempos de incubación fue distinto (P < 0.01) dentro de los dos niveles de urea (7.5 y 15 mg/ml). En cambio, se encontró que entre dichos niveles, sólo hay diferencia (P < 0.01) a los 120 min. de incubación, y fue mayor con 15 mg de urea por ml, quizá debido a que el nivel de saturación por el sustrato está entre 7.5 y 15 mg de urea/ml de LR, lo cual se ilustra en la Figura 1.

Con la interacción tiempo de incubación y AAH los resultados se resumen en el Cuadro 3, en donde se observa que la adición de las diferentes concentraciones de AAH (0.75, 150 y 225 mg/ml), tienen el mismo efecto sobre la liberación de N-NH₃ volátil pero al aumentar el tiempo de incubación (de 60 a 180 min, la demanda de AAH para inhibir es mayor). Esto sig-

FIGURA 1

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION Y NIVELES DE UREA SOBRE LA LIBERACION DE N-NH₃ VOLATIL IN VITRO EN LIQUIDO RUMINAL



CUADRO 3

INTERACCION ENTRE EL TIEMPO DE INCUBACION Y LA CONCENTRACION DEL AAH SOBRE LA LIBERACION DEL N-NH₃ IN VITRO^A

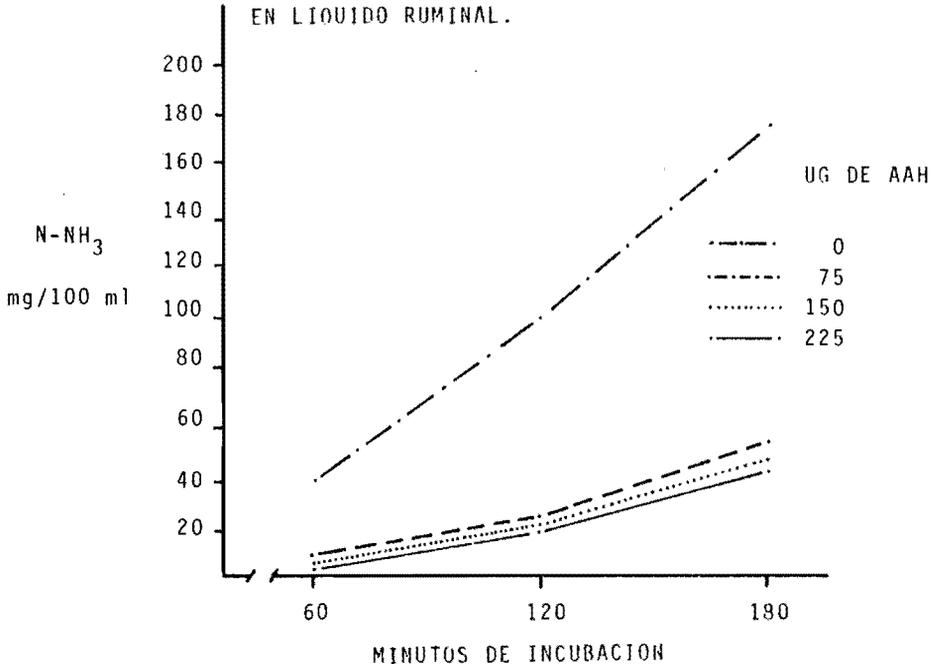
TIEMPO (MINUTOS)	ACIDO ACETOHIPOXAMICO (mg/ml)				EEM
	0	75	150	225	
60	32.1 ^E	6.6 ^G	5.5 ^G	5.1 ^G	
120	97.6 ^C	19.4 ^F	18.4 ^F	15.9 ^F	
180	177.6 ^B	46.3 ^D	40.4 ^{DE}	37.3 ^{DE}	2.147

A) . MEDIAS DE MINIMOS CUADRADOS PARA LA INTERACCION TIEMPO X AAH (P<0.01)

B,C,D,E,F,G) . VALORES CON DISTINTA LITERAL SON DIFERENTES (P< 0.01) EXPRESADOS EN MG/100 ML.

FIGURA 2

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION Y NIVELES DE AAH EN LA LIBERACION DE N-NH₃ IN VITRO EN LIQUIDO RUMINAL.



nifica que con la inclusión o no, del inhibidor, la cantidad de sustrato transformado es directamente proporcional al tiempo de reacción, pero menor con la adición del AAH (Figura 2), de tal manera que, la cantidad de N-NH₃ volátil a los 60 min. sin inhibidor, es similar a los 180 min. de reacción al utilizar AAH a una concentración de 150 y 225 mg/ml.

López y Cuarón¹⁴, con pruebas recientes en este laboratorio, demostraron que el AAH ejerce una inhibición de tipo no-competitiva sobre la ureasa de canavalia, exacto como se comprobó en el presente trabajo con LR ya que en un sistema saturado por el

sustrato (urea), la Vmax fue diferente al incluir el inhibidor, porque como se sabe, si la concentración del sustrato es elevada, la adición de un inhibidor competitivo no produce inhibición y su consecuencia la Vmax no se modifica⁴.

El que el AAH actúe como un inhibidor no competitivo a nivel de rumen es de importancia, ya que si su actividad inhibitoria no es alterada por la concentración del sustrato, se podrán utilizar raciones con niveles altos de urea sin el peligro de anular la característica inhibitoria del compuesto y de esta forma, retardar la liberación de NH₃ para obtener un máximo

aprovechamiento del producto por la microflora ruminal, se subraya que el que la V_{max} se modifique dependerá de la concentración del AAH y no de la concentración del sustrato. En suma, la inclusión del AAH en concentraciones de 75, 150 y 225 mg/ml, tiene un efecto inhibitorio de la ureasa similar y es de un 79% en promedio. El tiempo de incubación tiene una relación directa con la liberación de $N-NH_3$, cuando existe un sistema saturado por el sustrato, sin importar si se añade o no el AAH.

El AAH sintetizado actúa como un inhibidor de tipo no competitivo ya que la V_{max} fue diferente al incluir el inhibidor, se toma en cuenta que se proveyó un sistema saturado por el sustrato, así la liberación de $N-NH_3$ durante 180 min. de incubación a una concentración de AAH, de 150 y 225 mg/ml es similar cuando se incubó 60 min. sin incluir el inhibidor. Ante los resultados de este trabajo se confirma la inhibición de la actividad ureásica y quizá que con el producto sintetizado (AAH), como aditivo alimenticio, se podrían obtener mejoras en la utilización del nitrógeno alimentario provisto por la urea y, por la modificación en el metabolismo ruminal, inducirse alteraciones en los patrones de fermentación.

SUMMARY.

This experiment was designed to measure the urease-inhibiting activity of acetohydroxamic acid (AAH) upon different urea concentrations and in ruminal liquid incubation times.

Ruminal liquid was obtained from sheep previously fed with corn stover and sorghum grain, including 1.53% urea, in Corway chambers. Low AAH solutions (0.75, 150 and 225 mg/ml), two urea concentrations (7.5 and 15 mg/ml) and three incubation times (60, 120 and 180 min. in ruminal liquid at 40°C) were used after a factorial arrangement of a completely randomized design with six observations per cell.

The addition of AAH resulted in a non-competitive inhibition of urease activity ($P < 0.01$) equivalent to 79% of that observed without the addition of AAH, being similar for any of the AAH levels. The interaction urea x incubation time ($P < 0.01$) showed differences within urea levels, but between this, differences were found only at 120 min: 42.4 vs. 33.3 mg $N-NH_3$ respectively for the 15 and 7.5 mg of urea/ml. The amount of $N-NH_3$ freed after 60 min without AAH (932 mg) was similar ($P < 0.01$) to that obtained at 120 min. when AAH was included at 150 and 225 mg/ml (40 and 37 mg respectively).

LITERATURA CITADA.

- 1 ANDERSON, V.L. and MC LEAN, R.A., 1974. Designs of experiments. Realistics approach. **Marcel Dekker, Inc., N.Y.**
- 2 BLOOMFIELDS, R.A., GARNER, G.B. and MUHRER, M.E., 1960. Kinetics of urea metabolism in sheep. **J. Anim. Sci.**, 19: 1248.
- 3 BRENT, B.E., ADEPOJU, A. and PORTELA, F., 1971. *In vitro* inhibition of rumen urease with acetohydroxamic acid, **J. Anim. Sci.**, 32:794.
- 4 CON, E.E. y STUMPF, P.K., 1982. Bioquímica fundamental. 3ra. ed. **Limusa, México.**
- 5 CONWAY, E.J., 1957. Microdifusión análisis and volumetric error. 4 th ed. **Crosby Lockwava and Son LTD, London.**
- 6 COOK, A.R., 1976. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, 92:32.
- 7 CHALUPA, W., 1968. Problems in feeding urea to ruminants. **J. Anim. Sci.**, 27:207.
- 8 DAVIS, G.K. and ROBERT, H.F., 1959. Urea toxicity in cattle. **Florida Agr. Exp. Sta. Bull.** 611:1.

- 9 HERMER, L.G. and BARTLEY, E.E., 1971. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants. A Review. *J. Dary Sci.*, 54:25.
- 10 JONES, G.A., 1968. Influence of acetohydroxamic acid on some activities in vitro of the rumen microbiota. *Can J. Microbiol.*, 14:409.
- 11 KOBASHI, K. KUMARI, K. and HASE, J. 1971. Effect of acyl residues of hydroxamic acids in urease inhibition. *Biochim and Biophys Acta* 227:429.
- 12 KOBASHI, K. TAKEBE, S., TERESHIMA, N. and HASE, J. 1975 Inhibition of urease activity by hidroxamic acid derivates of aminoacids. *J. Biochem.*, 77:837.
- 13 LEWIS, D., 1980. Ammonia toxicity in the ruminant. *J. Agr. Sci.*, 55:111.
- 14 LOPEZ, J. and CUARON, J.A. , 1986. Síntesis del ácido acetohidroxámico (AAA) y su efecto inhibidor "in vitro" sobre la ureasa de canavilia. SARH-UNAM' p. 124.
- 15 N.R.C., 1976. Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirements of sheep. 5 th ed. **National Academy of Sciences**, Washington, D.C.
- 16 PEARSON, R.M. and SMITH, J.A., 1975. The utilization of urea in the bovine rumen, 2. The conversion of urea to ammonia. *Biochem, J.*, 37:148.
- 17 STREETER, C.L., OLTJEN, R.R., SLYTER, L. L. and FISHBEIN, W.N., 1969. Urea utilization in wethers receiving the ureasa inhibidor acetohidroxamic acid. *J. Anim. Sci.*, 29:88.
- 18 TEJADA DE HERNANDEZ, I., 1983. Manual de laboratorio para análisis de ingredientes en la alimentación animal. México.
- 19 WONZY, MA., BRYANT, M.P., HOLDEMAN, L.V. and MOORE, W.E., 1977. Urease assay and urease-producing species of anaerobes in the bovine rumen and human feaces. *Appl. Envirom. Microbiol.*, 33:1097.