

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO



**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL**

**DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀) DE EXTRACTO DE
LECHUGUILLA (*Agave Lechuguilla*) EN AVES (*Gallus domesticus*) DE 21 DÍAS DE
EDAD**

POR:

IRAN LUNA VIVALDO

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Febrero, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL

DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀) DE EXTRACTO DE
LECHUGUILLA (*Agave Lechuguilla*) EN AVES (*Gallus domesticus*) DE 21
DÍAS DE EDAD

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Presentada por:

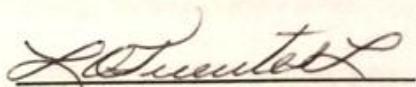
IRAN LUNA VIVALDO

El presente trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente comité:



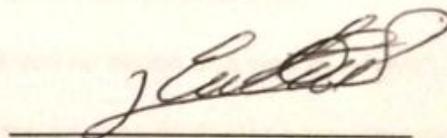
M.C. Sarahí del Carmen Rangel Ortega

Director



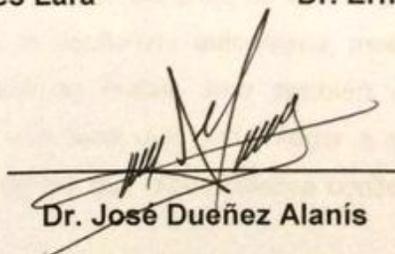
Lic. Laura Olivia Fuentes Lara

Asesor



Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor



Dr. José Dueñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Febrero, 2015

DEDICATORIA

A mi familia, mi madre Lic. Enfría. Benita Vivaldo Barco, mi padre Dr. Alejandro Luna García, mi hermana Lic. Paloma Edlín Luna Vivaldo y mi hermano Alejandro Luna Vivaldo y amistades como José M. Rembao y Gabriela Abigail, a quienes agradezco incondicionalmente sobre el apoyo, confianza, cariño, ayuda y valores que siempre han brindado para mi crecimiento personal y profesional.

Ya que me han hecho reflexionar y preguntar a quienes me encontré hasta el día de hoy, ¿acaso uno no tiene derecho a disfrutar de la gracia de contar con conocimientos y ambicionar sobre adquirir varios más? :

nooo!!! dicen los letrados, es para los filisteos;

nooooo!!! dicen los conformistas, será para quienes tienen complejo de dios;

nooooooooo!!! dicen los ignorantes, seguro es para los que no tienen una vida que “vivir”.

Gracias a todos ustedes y por los conocimientos además de tiempos que me han otorgado, he optado por una respuesta diferente, he optado por que la sapiencia es el resultado no solo del respeto, la confianza, autoestima, madurez, de todas aquellas experiencias adquiridas y palabras leídas, sino también de todos los valores y recompensas de la vida, que uno tiene que poder llegar a aprender incluso hacerse merecer, para poder disfrutar de los que dicha palabra conlleva y el soñar con poder anhelar más.

AGRADECIMINETOS

Les agradezco a:

T.A. Carlos Alberto Arévalo Sanmiguel

QFB. Silvia Patricia Acuña Álvarez

M.C. Laura Maricela Lara López

Dr. Efraín Castro Narro

M.C. Lorenzo Suárez Garcia

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara

Dr. Ernesto Cerna Chávez

LCQ. Magdalena Olvera Esquivel

MC. Sarahí del Carmen Rangel Ortega

1. RESUMEN

El objetivo del trabajo consistió en la extracción y establecimiento de dosis de saponinas extraídas de *Agave lechuguilla*, para establecer una dosis letal media (DL₅₀), en el cual se evaluó la mortalidad en las aves *Gallus domesticus* línea Ross de 21 días de edad. Para esto, se evaluaron tres diferentes dosis de 125 mg/l (baja), 470 mg/l (media) y 639 mg/l (alta). Obteniendo una DL₅₀ base logaritmo de 2.652 equivalente a 448.859 mg/kg de peso corporal de los animales en estudio. Los órganos en los que se presentó daño en necropsia fueron hígado, corazón y riñones. Afectándose también piel y músculo, siendo la principal causa aparente la extravasación de sangre.

Palabras clave: Saponinas, *Agave lechuguilla*, DL₅₀, aves.

Correo Electrónico; Iran Luna Vivaldo i.lv@live.com.mx

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	5
INDICE DE TABLAS	8
2. INTRODUCCIÓN.....	10
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS.....	12
5. OBJETIVOS.....	12
5.1 General.....	12
5.2 Específicos.....	12
6. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
6.1 Saponinas	13
6.1.1 Estructura química	13
6.1.2 Usos.....	14
6.2 Efectos biológicos de las saponinas	15
6.2.1 Membranas celulares	15
6.2.2 En plantas	16
6.2.3 El sistema inmune.....	16
6.2.4 En protozoarios	17
6.3 Extractos vegetales con saponinas.....	17
6.4 Fuentes naturales de saponinas.....	18
6.5 Agave lechuguilla.....	19
6.5.1 Descripción.....	20
6. 8 Índices de toxicidad	22
6.9 Bioensayo.....	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1 Etapa 1. Extracción de saponinas	25
7.1.1 Manejo de material vegetal.....	25
7.1.2 Extracción de saponinas.....	25
7.2 Etapa 2. Cuantificación de saponinas	26
7.3 Etapa 3. Establecimiento de dosis para determinación de DL ₅₀	27
7.4 Análisis estadístico.....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
8.1 Etapas 1 y 2. Extracción y cuantificación de saponinas.....	30
8.2 Etapa 3. Determinación de DL ₅₀	31
Tabla 4. Mortalidad a las 48 h de observación.....	32

9. CONCLUSIONES	34
10. RECOMENDACIONES	35
11. LITERATURA CITADA.....	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de grupos animales respecto a su dosis	28
Tabla 2. Establecimiento de tiempos para toma de lectura, en cada uno de los 6 grupos de animales, más testigo dependiendo del tratamiento respecto a concentración de la dosis.	29
Tabla 3. Peso en gramos de las aves en estudio	31
Tabla 4. Mortalidad a las 48 h de observación.....	32
Tabla 5. Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente del extracto aplicados en la línea Ross de hembras y machos de 21 días de <i>Gallus domesticus</i>	33
Tabla 6. Establecimiento de grupos de aves: grupo 1 grupo testigo con alimento comercial, grupo 2 alimento comercial más 8% de polvo de <i>Agave lechuguilla</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Agave lechuguilla	20
Figura 2. Establecimiento de tres niveles de dosis A) 125 mg/l (baja), B) 470 mg/l (media) y C) 639 mg/l (alta).....	26
Figura 4. Asociación entre la concentración de las dosis en los tratamientos y el porcentaje de mortalidad del bioensayo.	33
Figura 6. <i>Heterakis</i> sp.	47
Figura 5. <i>Ascardia</i> sp.....	47
Figura 7. Daño producido en vasos sanguíneos de la piel de <i>Gallus domesticus</i>	50
Figura. 8 Daño producido en corazón de <i>Gallus domesticus</i>	51
Figura. 9 Daño producido en hígado de <i>Gallus domesticus</i>	52
Figura. 10 Daño producido en riñón de <i>Gallus domesticus</i>	53
Figura. 11 Daño producido en musculo de <i>Gallus domesticus</i>	54

2. INTRODUCCIÓN

Las saponinas son glucósidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas de forma natural como parte del su metabolismo que están formadas por una aglicona de origen terpénico, esteroidal o esteroidal alcaloide. Se pueden utilizar como agentes activos en compuestos insecticidas. Las saponinas derivadas de las plantas de Yuca se utilizan para suprimir el colesterol de los productos alimenticios y como tratamiento biocida y agente antiaglutinante/emulsionante para desechos de refino y otros sistemas de biomasa. ¹

Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en monocotiledóneas, mientras que las saponinas terpénicas se encuentran especialmente en dicotiledóneas. La gran diversidad estructural de las saponinas se refleja en sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas, y en el uso que se hace de ellas en jabones, antimicrobianos, anticancerígenos. ¹ Estos compuestos se han utilizado en experimentos en dietas de cerdos y rumiantes, con los objetivos de controlar parásitos y la observación del crecimiento de los animales, sin embargo no se les ha dado un criterio establecido sobre sus posibles usos en el enfoque zootécnico. ¹

La falta de investigación o utilización sobre el área zootécnica es debida principalmente a que muchos de estos experimentos se realizan a base de proponer diferentes tratamientos con sus respectivas concentraciones de estas sustancias, pero sin contemplar la toxicidad ni posibles efectos sobre el organismo, por falta de conocimiento o de estudios realizados. El método más factible para establecer el uso de nuevas sustancias, es mediante el establecimiento de índices toxicológicos, antes de experimentar en organismos, para así poder asegurar el uso correcto y enfoque adecuado. ¹

3. JUSTIFICACIÓN

El *Agave lechuguilla* es una planta silvestre originaria de zonas áridas y semiáridas, abundante en gran parte de América del Norte, a la cual su utilización se restringe principalmente para áreas industriales, basada en la obtención de la fibra denominada "ixtle"; sin embargo, tanto la planta en si, como los residuos sobrantes de la obtención de su fibra son fuente de gran cantidad de compuestos bioquímicos, destacando las saponinas. Estos tipos de glucósidos tienen diferentes efectos biológicos, siendo el más destacado el que ejercen sobre los lípidos, lo cual predispone que estas sustancias pueden tener múltiples efectos y usos, dando un enfoque para su posible utilización en diversos propósitos tales como antiparasitario, alimentación, nutrición, entre otros. Considerando el establecimiento de índices toxicológicos como primer punto de partida para asegurar una premisa para su futura y correcta utilización.

4. HIPÓTESIS

Las saponinas extraídas de *Agave lechuguilla* no presentan efecto toxico en aves para causar mortalidad.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Establecer la cantidad y el efecto toxico de saponinas extraídas de *Agave lechuguilla* en *Gallus domesticus* de 21 días de edad.

5.2 Específicos

- Extracción y cuantificación de saponinas en extracto de *Agave lechuguilla*.

6. REVISIÓN DE LITERATURA

6.1 Saponinas

Las saponinas son detergentes naturales encontrados en una variedad de plantas, tienen propiedades tensoactivas y detergentes ya que contienen compuestos liposolubles como acuosolubles. Las dos fuentes principales de saponinas son plantas semidesérticas: *Yucca schidigera* de México y sur oeste de USA y *Quillaja saponiaria* de Chile.²

Se llaman saponinas a un grupo de sustancias glucosidas que se disuelven en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución. Por hidrólisis (ácida, microbiológica o enzimática) de una saponina se obtienen carbohidratos y una aglicona: "sapogenina", la cual estructuralmente puede ser de tipo esteroidal (C₂₇) o triterpenoidal (C₃₀). Estos compuestos se aíslan de diferentes fuentes vegetales. En Liliáceas, Diocoreáceas y Solanáceas son comunes las saponinas esferoidales, mientras que en las Umbelíferas, Leguminosas, Caryofiláceas, Rhamnáceas, etc., lo son las triterpenoidales.³

6.1.1 Estructura química

Se sabe poco relativamente con respecto a los azúcares componentes de las saponinas ya que en el mejor de los casos solamente se conoce la composición de las mezclas de azúcares producidas por la hidrólisis de los glicósidos.

Los aglicones, que reciben el nombre general de sapogeninas pueden subdividirse en dos grandes grupos: el primer grupo, al que pertenecen, por ejemplo, la tigogenina, la gitogenina y la ditogenina son verdaderos esteroides con una cadena en un sistema acetal bícilcico que es siempre del mismo tipo. Las sapogenias del segundo tipo, como por ejemplo el ácido oleanólico y la hederagenina son verdaderos triterpenoides pentacíclicos que no pertenecen ya a la serie de los esteroides, cuyo

sistema de anillos que es próximo por su estructura al del piceno, permite reconocer claramente su formación a partir de seis restos de isopreno. ⁴Las saponinas esteroidales son glicósidos esteroides con un núcleo espirostando que tiene la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y forman espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas. ⁵

La porción esteroide de las saponinas esteroides (también denominada sapogenina o algicono esteroide) se origina por la ruta de la acetil Coenzima vía ácido mevalónico y escualeno. Una vez formado un precursor esteroide con 27 átomos de carbono, este es deshidrogenado para originar 3-colestanona. La colestano es hidrolizada en los carbonos 16, 22, 27. Este intermedio altamente hidroxilado en la cadena lateral puede sufrir una deshidratación entre los hidroxilos 16 y 22, lo que origina 3-furostanona; lo que da lugar al anillo espirostando propiamente dicho. La 3-espirostanona puede ser reducida a 3-espirostando, el cual puede sufrir procesos enzimáticos de glicosilación para originar las saponinas esteroidales. ⁵

6.1.2 Usos

Una amplia investigación se ha llevado a cabo en la membrana de permeabilis- ing, inmunoestimulante, hipocolesterolemiante y anticancerígenas de las saponinas y también se han encontrado para afectar de manera significativa el crecimiento, consumo de alimento y la reproducción en animales. ⁶

Estos compuestos estructuralmente diversos se han observado también para matar los protozoos y moluscos, para ser antioxidantes, para poner en peligro la digestión de proteínas y la absorción de vitaminas y minerales en el intestino, para causar hipoglucemia, y para actuar como agentes antifúngicos y antivirales. Estos compuestos pueden afectar de este modo los animales en una serie de diferentes maneras tanto positivos como negativos. ⁶

Las saponinas pueden ser considerados como una parte de las plantas "sistemas de defensa" y como tal, se han incluido en un grupo grande de moléculas protectoras encuentra en las plantas denominadas " phytoanticipins " o " fitoprotectores

.¹

El primer término describe estas saponinas, tales como avenacosides A y B en la avena, que son activados por enzimas de la planta en respuesta a daño tisular o ataque de patógeno. La segunda describe las saponinas que tienen una actividad antimicrobiana o insecticida en general.⁶

Las saponinas tienen diferentes roles en las plantas como los mencionado y diferentes efectos tanto positivos como negativos en los organismos animales debido a sus diversos efectos principalmente a nivel de membranas celulares independientemente de ser terpenoidales o esteroidales pueden llegar a tener influencia sobre crecimiento, consumo de alimento, digestión de proteínas, metabolismo del colesterol, reproducción animal, entre otros.⁶

6.2 Efectos biológicos de las saponinas

Las saponinas son glucósidos esteroides o triterpenoides, común en un gran número de plantas y productos vegetales que son importantes en la nutrición humana y animal. Varios efectos biológicos se han atribuido a saponinas.⁶

6.2.1 Membranas celulares

Una amplia investigación se ha llevado a cabo en la permeabilización de membranas, inmunoestimulante, hipocolesterolemico y anticancerígenas de las saponinas y también se han encontrado que afectar de manera significativa el

crecimiento, consumo de alimento y la reproducción en animales. ⁷Un gran número de los efectos biológicos de las saponinas se han atribuido a su acción sobre las membranas. De hecho, su capacidad específica para formar poros en las membranas ha contribuido a su uso común en la investigación fisiológica. ^{8,9}

En comparación con las perforaciones reversibles causadas por sustancias tales como la vitamina A, los poros de la membrana o defectos producida por saponinas fueron de larga duración y tales membranas fueron entonces permanentemente permeable a moléculas grandes como la ferritina. También se ha encontrado para mejorar el crecimiento, eficiencia de la alimentación y la salud en aves de corral y cerdos por mecanismos que no son todavía entendidas. ^{10,11}

6.2.2 En plantas

Las saponinas pueden ser considerados como una parte de las plantas, sistemas de defensa y como tal, se han incluido en un grupo grande de moléculas protectoras encuentra en las plantas denominadas phytoanticipins o fotoprotectores. El primer término describe estas, tales como avenacosides A y B, que son activados por enzimas de la planta en respuesta a daño tisular o ataque de patógenos. ^{12,13}

6.2.3 El sistema inmune

Una saponina triterpenoide glucosilada de guisantes (*Pisum sativum*) se purificó y se caracterizó como un inhibidor específico de diguanilato ciclase, una enzima reguladora clave en la síntesis de celulosa. Las saponinas provenientes de *Quillaja*, al igual que otras saponinas, dadas como compuestos purificados o no han reportado incrementar la proliferación de células inmunes a nivel *in vitro*. Se ha reportado el poder inducir una respuesta de anticuerpos y/o una protección inmune en conejillos de indias, pavos, gatos, conejos, perros, focas, ovejas, cerdos, vacas, caballos y monos. ^{14,15}

6.2.4 En protozoarios

Las saponinas provenientes de diferentes fuentes se ha encontrado que disminuyen la cantidad de protozoarios y como posible controlador en el rumen. Saponinas terpenoidales y esteroidales han demostrado disminuir infecciones protozoarias severas en especies como *Plasmodium falciparum*, *Giardia trophozoites* y *Leishmania*.^{16,17}

La toxicidad de las saponinas en protozoarios parece ser amplio y no especifico, siendo obvio el resultado sobre el efecto detergente que tiene sobre las membranas celulares. Por lo cual las saponinas extraídas de fuentes naturales vegetales tienen una posible y amplia utilización para el control de diversos parásitos en animales a dosis correctas, pudiendo sustituir medicamentos o parasiticidas, de forma natural.¹⁸

6.2.5 Crecimiento animal y consumo

En rumiantes, bajo el uso de extracto de *Yucca schidigera*, se ha encontrado que promueve el crecimiento, eficiencia alimenticia y la salud. Las saponinas provenientes de *Quillaja* incrementan la eficiencia en la síntesis de proteínas, de microorganismos ruminales en *in Vitro*. También se ha encontrado que el extracto de *Y. Schidigera* promueve el crecimiento, eficiencia alimenticia y salud en aves de corral, cerdos por medio de mecanismos que aún no son entendidos del todo(jhonson).^{19, 20, 21, 22}

6.3 Extractos vegetales con saponinas

Se ha comprobado que algunos extractos vegetales tienen la capacidad de tener la función purgante y controlar algunas infecciones parasitarias intestinales debido a los

compuestos químicos que contiene algunas plantas producidos normalmente como producto de metabolismo secundario o por la acción del estrés de la planta por factores ambientales, los cuales actúan de forma intoxicante, interfiriendo en ciclos reproductivos o en paredes celulares de los parásitos, en todos los casos es necesaria la determinación de bioensayos para poder conocer y establecer parámetros del estímulo de cualquier sustancia sobre determinado organismo, antes de establecer un uso específico de cualquier sustancia.²³

Debido a su propiedad tensoactiva, las saponinas tienen actividad anti-protozoaria. Las saponinas tienen propiedades membranolíticas al acomplejarse con el colesterol de las membranas celulares de los protozoarios, causando lisis celular.⁶Las saponinas utilizadas hoy en día, para diversos fines provienen de origen natural, extraídas de diversas y numerosas especies del reino vegetal, en las cuales dependiendo de la rama evolutiva pueden encontrarse plantas con un tipo específico de saponinas o incluso con un conjunto de estas.²³

6.4 Fuentes naturales de saponinas

Los heterósidos saponínicos, por su importancia biológica e industrial, son sustancias bastante estudiadas. Se encuentran en las plantas más diversas y constantemente aparecen nuevos descubrimientos.⁷Al estudiar las plantas que contienen saponinas esteróidicas, vemos que se han encontrado hasta el día de hoy solamente en las angiospermas, y exactamente en las familias siguientes: alismáceas, amarillidáceas, apocináceas, aráceas, bignoniáceas, bromeliáceas, convulvuláceas, dioscoráceas, gramináceas, iridáceas, liliáceas, malpigíáceas, menispermáceas, momosáceas, myrtáceas, oleáceas, palmáceas, papilionáceas, fitolacáceas, escrofulariáceas, solanaceas y zigofiláceas.²³

Las saponinas esteroidales se encuentran por lo general en familias de la clase monocotiledónea, como son: *Liliaceae (Agavaceae)*, *Dioscoreaceae* y *Amaryllidaceae*. En las dicotiledóneas, se les ha encontrado en las familias *Solanaceae* y *Scrofulariaceae*. En el género *Agave* se han identificado varias saponinas como: hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina.²⁴

Dentro del género *Agave* destacan plantas del norte del país como *Agave salmiana*, *Agave striata* Zucc., y el *Agave lechuguilla* Torr.

6.5 *Agave lechuguilla*

Es una planta que pertenece a la familia de las *Agavaceae*, crece en forma silvestre en zonas áridas y semiáridas desde el sur de Texas y Nuevo México en los Estados Unidos de Norteamérica, hasta los centrales estados de Querétaro, Hidalgo y Guanajuato en México. Es un recurso fundamental en la economía de numerosas familias de las poblaciones áridas del altiplano mexicano, ya que por lo menos durante un tercio del año se explota para la obtención de la fibra denominada *ixtle*.²⁴

La cual debido a sus características abrasivas y su alto índice de retención de agua (65 %) se utiliza en las industrias de la fabricación de cepillos y de construcción, además en jarcería y cestería. La fibra se consigue por el tallado de la hoja, constituida por un 15 por ciento de fibra y un 85 por ciento de pulpa. La pulpa contiene compuestos bioactivos de interés, entre los que destacan las saponinas que presentan diversas propiedades de aplicación farmacológica.²⁵



Figura 1. *Agave lechuguilla*

La cual debido a sus características abrasivas y su alto índice de retención de agua (65 %) se utiliza en las industrias de la fabricación de cepillos y de construcción, además en jarcería y cestería. La fibra se consigue por el tallado de la hoja, constituida por un 15 por ciento de fibra y un 85 por ciento de pulpa. La pulpa contiene compuestos bioactivos de interés, entre los que destacan las saponinas que presentan diversas propiedades de aplicación farmacológica.²⁵

6.5.1 Descripción

Forma una roseta de hojas suculentas de hasta 45 cm de altura y 60 cm de ancho. La planta florece una vez en la vida antes de morir. Las flores son de color amarillo con tinte rojizo y se encuentran en una inflorescencia que alcanza los 4 m de altura. El néctar de las flores es un gran nutriente en la dieta de insectos, murciélagos y algunas aves.²⁵

- Nombre : *Agave lechuguilla*
- Sinonimia : *Agave X. glomeruliflora (Engelm.) A. Berger (pro sp.)*, *Agave heteracantha var. glomeruliflora Engelm*, *Agave lecheguilla* forma *glomeruliflora (A. Berger)*.
- Nombre(s) común(es): Lechuguilla en los estados fronterizos del norte de México, tzuta (lengua otomí) – Hidalgo, ixtle.
- Estatus: Ninguno
- Origen: Zonas áridas de América del Norte.
- Forma biológica: Hierba arrositada de 50 a 70 cm de altura.
- Fenología: Hojas: Perennifolia, hojas crasas con espinas. Flores: Cada roseta florece sólo una vez ; entre los 6 y los 15 años.
- Frutos: Cápsulas.
- Distribución en México.
- Asociación vegetal: Matorral xerófilo, Matorral desértico micrófilo y matorral desértico rosetófilo.
- Coordenadas geográficas: Entidades; En general en los estados fronterizos del norte de México, principalmente en Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, Durango, y también reportado para el sur de Hidalgo.
- Requerimientos Ambientales :Altitud (msnm); Mínima: 2,250, Máxima: 2,700
- Suelo: Clasificación (FAO),Feozem, Leptosol, Xerosol, Yermosol (** Verificado con carta suelo); Rendzina, Leptosol, Foezem, Vertisol, Castañozem.
- Características físicas: SIRE-Paquetes Tecnológicos, Agave lechuguilla,Profundidad: Someros,Textura: Franco-arenosa,Franca-arcillosaPedregosidad: Pedregoso.
- Drenaje: Humedad aparente:
- Color: oscuro en Rendzina, pardo-oscuro en Castañozem.
- Características químicas: 2.3.2.3.1 pH: 7.5 a 9.4.Materia orgánica: 2.46%.
- Sales: Carbonatos: alto contenido de carbonato de calcio.
- Fertilidad: alta fertilidad en Rendzina.
- Otros: Temperatura (°C);Media: 20°, Mínima: -5°,Máxima: 35°.
- Precipitación (mm): De 105 a 600.
- Otros: Crece en suelos de origen calizo y ocasionalmente arcillosos.

- Usos: Extracción de ixtle para la fabricación de lazos, lomerías, gamarras, costales, cubiertas para pacas de algodón, tapetes. De la raíz y del tallo se obtienen productos que se emplean en la fabricación de jabones. El jugo de las hojas se pueden utilizar como detergente debido a las saponinas y sapogeninas que contiene la planta en su composición química, siendo estos compuestos unos de los cuales su estudio no ha sido del todo los efectos tanto en las plantas como en animales, ni sus posibles usos potenciales.²⁵

Las saponinas son compuestos encontrados en el *Agave lechuguilla*, que debido a sus diversos efectos biológicos pueden ser utilizadas para darles un enfoque en la zootecnia, sin embargo al no haber diversidad de previos estudios sobre estos compuestos para su correcta utilización, la primera etapa a desarrollar es mediante el establecimiento de índices toxicológicos para poder conocer su utilización y evitar errores o efectos secundarios desconocidos en los animales. Como por ejemplo en el caso de sustancias como los piretroides y las lactonas macrocíclicas.²⁵

6. 8 Índices de toxicidad

El principal recurso para establecer de modo experimental la toxicidad de los compuestos químicos lo constituyen las pruebas de toxicidad con animales. Menos utilizadas son las pruebas de experimentación humana y las pruebas de actividad “in Vitro”.²⁶

Los principales índices toxicológicos son:

- Concentración letal media (CL₅₀)
- Dosis tóxica media (DT₅₀)
- Dosis letal media (DL₅₀)

Una prueba importante consiste en la concentración letal media CL_{50} , que es la concentración del tóxico que produce el fallecimiento del 50% de los animales. Cuando lo que se estudia no es la muerte sino otro efecto tóxico con una magnitud determinada, hablamos de dosis tóxica DT_{50} .²⁶

El principal recurso para establecer la toxicidad de los compuestos químicos es la experimentación en animales. Una de las pruebas más utilizadas consiste en determinar la dosis letal media (DL_{50}), cuando se refiere a la dosis expresada en mg/kg de peso del animal, que administrada de una vez por vía oral a un grupo determinado de animales produce la muerte del 50 % de los mismos. En base a los valores de las DL_{50} y las CL_{50} se puede clasificar los tóxicos en muy tóxicos, tóxicos y nocivos o inocuos.²⁷

Los estudios de toxicología se han llevado a cabo diferentes organismos para determinar los tipos de estímulos en los cuales van desde estudios en insectos para conocer el efecto de insecticidas, o roedores para determinados medicamentos y aves. La selección de la especie animal es muy importante ya que normalmente serán aquellas especies a las cuales servirán los resultados del estudio para su posterior utilización, al cual se le denomina realizar un bioensayo.²⁷

6.9 Bioensayo

La definición de bioensayo está influenciada por el campo de conocimiento al que se dedica, se refiere a él como ensayo biológico y lo define como la medición de la potencia de cualquier estímulo físico, químico, biológico, fisiológico o psicológico, por medio de las reacciones que éste produce sobre la materia viva, por razones estadísticas, el problema se reduce a la determinación del estímulo necesario para obtener una respuesta del 50% de los organismos de prueba.^{28,29}

Estos ensayos, básicamente, consisten en la exposición de grupos de organismos, a determinadas concentraciones del tóxico por un tiempo determinado. Los organismos deben estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y se mantienen en condiciones constantes. Además se dispone de grupos de control (que no se expongan al tóxico).Luego se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos. ^{30,31,32}

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el estudio en tres etapas para facilitar la metodología de la investigación.

7.1 Etapa 1. Extracción de saponinas

7.1.1 Manejo de material vegetal

La planta Lechuguilla (*Agave lechuguilla*) se recolectó en el mes de enero de 2014 en los terrenos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y a orillas de la ciudad de Saltillo, Coahuila, las cuales fueron llevadas al Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, se cortaron en forma horizontal y se pusieron a secar en horno de secado digital NOVATECH Modelo HS90-AIA, a una temperatura de 70° C para su posterior trituración en un molino eléctrico Thomas Willie model 4 con criba de 0.1 mm.

7.1.2 Extracción de saponinas

Para la extracción de saponinas se tomó una cantidad de 5 g de material biológico, se le adicionó una mezcla de etanol/agua al 95:5, a una temperatura de 50°C. La mezcla lechuguilla y solventes se mantuvo en agitación constante durante 5 h en el Incubator Shaker Series Innova 44. Posteriormente se adicionaron 25 ml de éter de petróleo y se continuó con agitación durante 1 h más, al concluir este tiempo la mezcla se filtró y se decantó en un embudo de separación de 1000 ml; donde la fracción no polar se desechó y la fracción polar se reservó para la cuantificación de saponinas.

7.2 Etapa 2. Cuantificación de saponinas

Una vez obtenidos los extractos se tomaron 5 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 30 ml de agua destilada. Los matraces se pusieron a baño maría a una temperatura 60-70 °C, enseguida se agregaron 3 ml de ácido clorhídrico concentrado y se mantuvieron las condiciones durante 15 min. Inmediatamente se detuvo la reacción en baño de hielo y se ajustó el pH con NaOH a pH 7.0, al final se aforó el volumen a 50 ml y se efectuó la determinación de azúcares por el método de DNS (Determinación de azúcares reductores totales) para lo que se utilizó un espectrofotómetro Thermo Spectronic Hexios 3.

Para la cuantificación de azúcares generados por la hidrólisis de saponinas se elaboró una curva de calibración con la saponina Triterpenica *Quillaja saponaria*, (número de catálogo 8047-15-2) de Sigma CO; para relacionar la cantidad de azúcares generados por la hidrólisis de la saponina con la concentración inicial de saponinas empleando como estándar la saponina Triterpenica *Quillaja saponaria*, (número de catálogo 8047-15-2) de Sigma CO; obteniendo como resultado un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.997$, que permite considerar al método de cuantificación indirecta de saponinas por determinación de azúcares, confiable.

Para obtener la cantidad de azúcares generados por el rompimiento de las moléculas de saponinas en sapogeninas y azúcares se utilizaron soluciones de 5mg/ml, las cuales se sometieron a un proceso de hidrólisis con ácido clorhídrico y en igualdad de condiciones se procesó otra serie de soluciones sin la adición de ácido, solo ajustando el pH, en ambos casos se determinó el contenido de azúcares y con base en la diferencia entre la cantidad de estos se obtuvo anteponiendo la relación de las muestras hidrolizadas menos el contenido en las muestras sin hidrolizar.

Una vez obtenidos los extractos se tomaron 5 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 30 ml de H₂O destilada. Los matraces se pusieron a baño María hasta alcanzar 60-70 °C, enseguida se agregaron 3 ml de HCl concentrado y se

mantuvieron las condiciones durante 15 minutos. Inmediatamente se detuvo la reacción en baño de hielo y se ajustó el pH con NaOH a 6.5 – 7.2, al final se aforó el volumen a 50 ml y se efectuó la determinación de azúcares por el método de DNS (Determinación de azúcares reductores totales), para lo que se usó un espectrofotómetro Jenway 6300 a una longitud de onda de 540 nm.

7.3 Etapa 3. Establecimiento de dosis para determinación de DL_{50}

Para la determinación de la dosis letal media se recibieron pollos de 15 días de edad de línea Ross de una veterinaria, se mantuvieron con calefacción, luz, agua y alimento iniciador. Las aves se trataron a los 21 días de edad, previo ayuno de 12 h. Se pesaron individualmente en una balanza, el extracto con saponinas fue administrado directamente en la ingluvia mediante una jeringa dosificadora provista de un catéter, las aves fueron observadas durante 48 h, registrándose la mortalidad producida por cada dosis.

Se establecieron 3 niveles de dosis, 125 mg/l (bajo), 470 mg/l (medio) y 639 mg/l (alto) con relación al contenido de saponinas cuantificadas (Figura 2), más un grupo testigo aplicándose a grupos de 10 aves cada uno con su respectiva repetición (Tabla 1). Contemplando los datos de mortalidad en relación a su peso corporal.

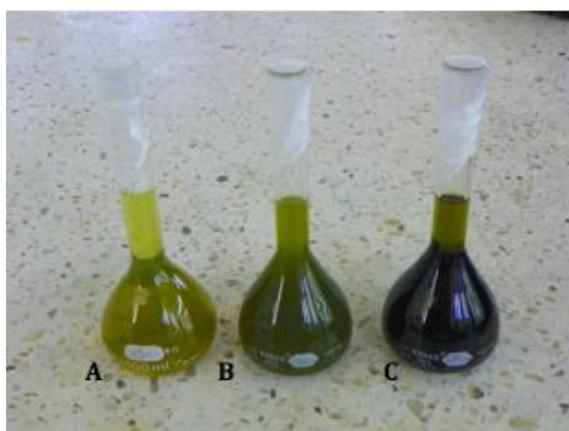


Figura 2. Establecimiento de tres niveles de dosis A) 125 mg/l (baja), B) 470 mg/l (media) y C) 639 mg/l (alta).

Tabla 1. Distribución de grupos animales respecto a su dosis

UNIDAD DE MUESTRA DL ₅₀				
DOSIS	Testigo	Dosis baja (125 mg/l)	Dosis media (470 mg/l)	Dosis alta (639 mg/l)
GRUPO	10	10	10	10
DOSIS	Testigo	Dosis baja (125 mg/l)	Dosis media (470 mg/l)	Dosis alta (639 mg/l)
SUBGRUPO ANIMAL/ REPETICIÓN	10	10	10	10

Las tomas de lectura de mortalidad en la DL₅₀ son en base a observación directa a cada grupo de animales con ayuda de cámara fotográfica digital, asegurando que el animal no presentara signos vitales en caso de bajas en cada tratamiento.

Las lecturas de efectos secundarios u otro tipo de observaciones en la DL₅₀ son en base a observación directa a cada grupo de animales y subgrupos de animales. Se estableció un itinerario para tomar lecturas cada determinado tiempo en el cual se registró la mortalidad respecto al tiempo de lectura en los organismos (Tabla 2).

Tabla 2. Establecimiento de tiempos para toma de lectura, en cada uno de los 6 grupos de animales, más testigo dependiendo del tratamiento respecto a concentración de la dosis.

Lecturas DL ₅₀								
No. de lectura	1	2	3	4	5	6	7	8
Tiempo entre lecturas	0 min	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h	24 h	48 h
Observaciones	Antes de aplicación	Después de aplicación						

7.4 Análisis estadístico

El cálculo de la DL₅₀ se realizó con el paquete estadístico SAS versión 9.1, al ingresar dosis y respuesta (mortalidad), mediante el método de probit.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Etapas 1 y 2. Extracción y cuantificación de saponinas

En la Figura 3 se presenta la dispersión entre el porcentaje de absorbancia y la concentración para la cuantificación de saponinas en el extracto obtenido a partir del material vegetal, obteniendo una $R^2 = 0.997$ que aseguro la confiabilidad de los resultados, con lo cual se estableció una concentración de 639 mg/l de saponinas en el extracto y sirvió como base para el establecimiento de la dosis alta del experimento con el máximo contenido de saponinas alcanzable de las plantas recolectadas, a partir de la cual se realizaron dos disoluciones para proponer la dosis media (470 mg/l) y la dosis baja (125mg/l).

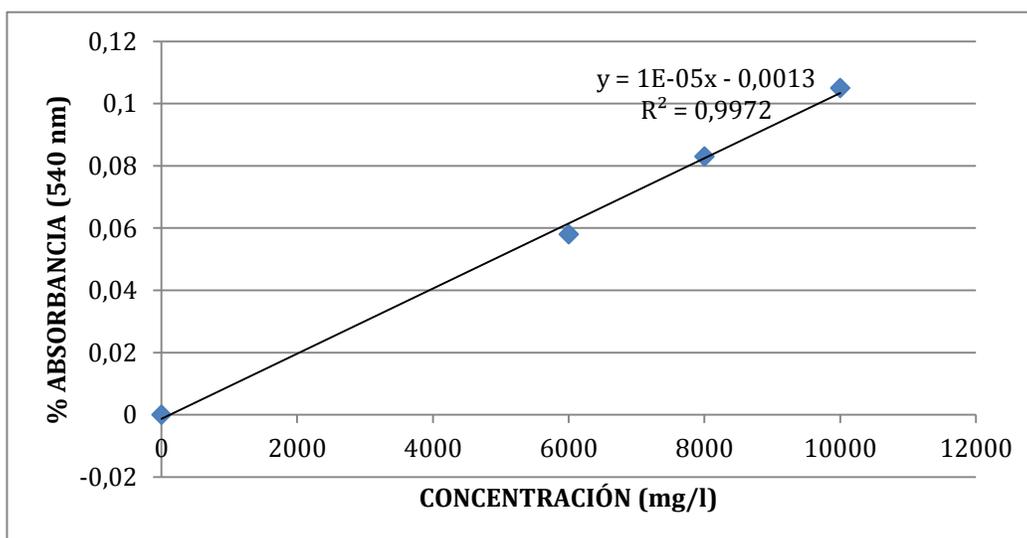


Figura 3. Dispersión del porcentaje de absorbancia en relación con la concentración de saponinas.

8.2 Etapa 3. Determinación de DL₅₀

Los resultados de peso y de mortalidad en cada uno de los tratamientos respecto a las diferentes concentraciones de saponinas administradas en los diferentes grupos se muestran en las Tablas 3 y 4. Donde se observó que la mortalidad es directamente proporcional al aumento de la dosis, mientras que el testigo no presentó mortalidad en ninguno de los dos grupos.

Tabla 3. Peso en gramos de las aves en estudio

PESO (g) INDIVIDUAL DE AVES POR GRUPO				
No. ave	Testigo	125mg/l	470mg/l	639mg/l
1	120	170	140	150
2	150	150	160	130
3	160	180	140	130
4	140	160	150	150
5	160	160	160	140
6	170	150	140	130
7	150	150	140	140
8	140	150	140	140
9	140	180	150	130
10	180	150	160	150
11	130	130	120	160
12	160	140	140	170
13	170	170	160	120
14	150	130	120	140
15	130	160	140	130
16	130	130	150	160
17	140	120	150	140
18	160	110	120	110
19	140	160	110	120
20	160	130	110	110

Las aves fueron marcadas en diferentes partes del cuerpo para identificar los tratamientos; cabeza (125 ppm), lomo (470 ppm), cuello (639 ppm) y se utilizó la base de administración a razón de 1 ml, por cada 100g de peso animal y se completó la dosis individual dependiendo del peso a partir de la base 0.10ml/10g.

Tabla 4. Mortalidad a las 48 h de observación

No. grupo	No. de aves muertas			
	Testigo	125 mg/l	470 mg/l	639 mg/l
Grupo 1	0	1	4	7
Grupo 2	0	1	5	7

En la Figura 4 se muestra la relación entre las dosis administradas durante el bioensayo y el porcentaje de mortalidad en los animales. El porcentaje de mortalidad establecido en unidades PROBIT mostró un nivel bajo a las concentraciones iniciales, pero posteriormente tendió a incrementarse gradualmente hasta la dosis más alta aplicada a los organismos.

Estos resultados concuerdan con la razón de que a mayor concentración del extracto de saponinas aplicadas a los organismos, el coeficiente de correlación fue 0.93 esto nos explica que la respuesta es decir la mortalidad de las aves es dependiente en un 93.2 % de la dosis aplicada, el efecto toxico será peyorativo respecto al daño ejercido por estos compuestos, debido principalmente a un daño gradual de las células sanguíneas por el efecto hemolítico de las saponinas bajo estas y también sobre la habilidad de formar poros sobre las membranas celulares sobre las cuales tengan contacto.

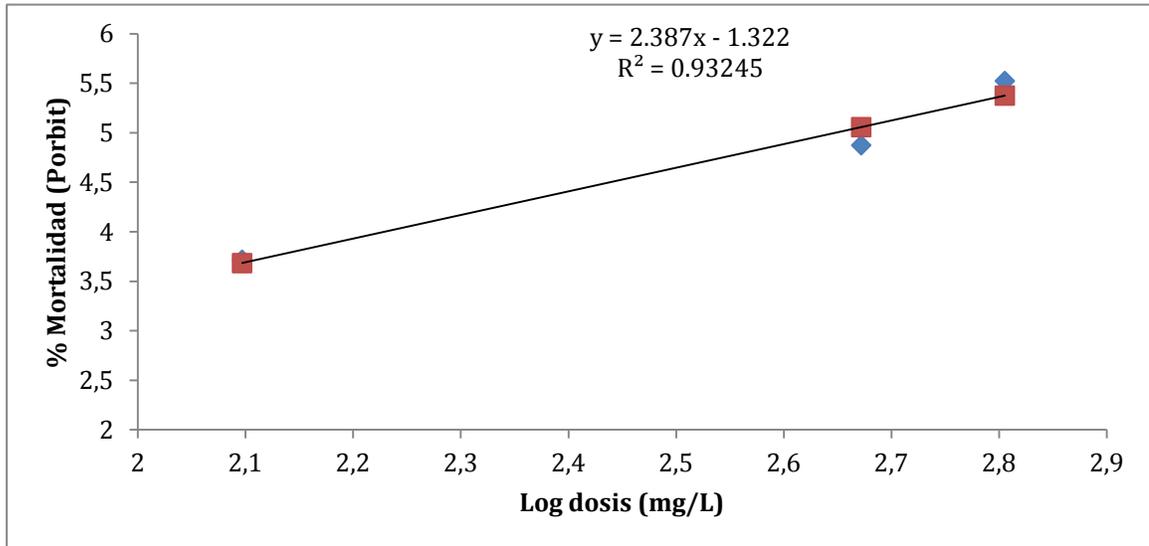


Figura 4. Asociación entre la concentración de las dosis en los tratamientos y el porcentaje de mortalidad del bioensayo.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la respuesta de la línea Ross de *Gallus domesticus*, en relación al extracto de saponinas, como se puede observar el valor de la DL_{50} en logaritmo fue de 2.652 que equivale a 448.859 mg/l para el extracto de *Agave lechuguilla*, establecida por el análisis estadístico de los datos de mortalidad con relación a las concentraciones bajo procedimiento PROBIT (Anexo 1 y 2).

Tabla 5. Concentración letal, límites fiduciales y valor de la pendiente del extracto aplicados en la línea Ross de hembras y machos de 21 días de *Gallus domesticus*.

Extracto	n	Peso Promedio (g)	mg/L		DL ₉₅	pendiente	r ²
			DL ₅₀	Límites fiduciales 95%			
<i>Agave lechuguilla</i> (saponinas)	60	143	2.652	(2.496-2.849)	3.331	-11983.155+23214.900	0.932

n: Número de hembras y machos de 21 días de *Gallus domesticus*, con peso promedio de las aves, r²: Coeficiente de determinación. Límites fiduciales = cinturones de confianza.

9. CONCLUSIONES

A lo largo del presente trabajo de investigación se extrajeron y cuantificaron las concentraciones de saponinas de la planta de *Agave lechuguilla* mediante un método indirecto, estableciéndose una concentración base del extracto en 639 mg/l, lo cual sirvió para establecer diferentes dosis con los compuestos bioquímicos extraídos del *Agave lechuguilla*. Por otro lado estos compuestos presentan toxicidad en las aves de 21 días de edad de línea Ross contradiciendo la hipótesis, el efecto ejercido en los animales va más allá de la alteración de las funciones vitales de las aves, presentando mortalidad en ciertas concentraciones. Se observó que el incremento en concentración de saponinas cuantificadas del extracto incrementa la mortalidad de las aves al igual que la claridad del daño producido en las necropsias. Estableciéndose una DL_{50} de saponinas en 448.85 mg/l, con los datos recaudados del bioensayo.

10. RECOMENDACIONES

El extracto de *Agave lechuguilla*, se plantea como un posible controlador de parásitos en aves debido a la acción que ejerce sobre las paredes celulares de estos. El extracto se puso a prueba bajo un estudio preliminar sobre el efecto controlador de parásitos en aves (*Gallus domesticus*) y además se documentó el daño a nivel tejidos provocado por el extracto de saponinas empleado en este estudio para determinar la DL₅₀ (estudio disponible en la sección de anexos).

11. LITERATURA CITADA

1. Nason, A. 2009. *Biología*. Editorial Limusa. México, DF. pp 200.
2. Cheeke, M. 2006. Usos de la Yucca Quillaja saponaria. SIn Edit. C.C. LABORATORIOS. pp. 3-10
3. Huhman, David. 2005. [et al]. “Quantification of saponins in Aerial and Subterranean Tissues of Medicago truncatula”. *Journal of AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*. pp. 2-4.
4. Morrissey J. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis, A.E. pp. 708–724.
5. Marcano, D. 2002, Fitoquímica orgánica, Consejo de desarrollo Científico y Humanístico, Venezuela, pp. 361-368.
6. Emerson, R. 2000. “Utilización de saponina para el control de patógenos”. España: OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. Pp. 30-40.
7. Glauert AM, (1962) Action of saponin on biological membranes. *Nature*, pp. 953–955.
8. Pillion, DJ. [et al]. 1996. Structure- Function relationship among Quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 518–524.
9. Seeman P. 1974. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis. *Federation Proceedings* , pp. 2116–2124.
10. Seeman P. 1974. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis. *Federation Proceedings* , pp.2116–2124.
11. Seeman P. [et al]. 1973. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *Journal of Cell Biology* , pp. 519–527.
12. Morrissey JP & Osbourn AE (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiological and Molecular Biological Reviews*, pp. 708–724.
13. Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T & Yoshikawa M (2000) Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biological Chemistry*, pp. 67–74.

14. Chavali SR, Francis T & Campbell JB (1987) An in vitro study of immunodilatory effects of some saponins. *International Journal of Immunopharmacology* , pp. 675–683.
15. Mowat AM, Smith RE, Donachie AM, Furrie E, Grdic D & Lycke N (1999) Oral vaccination with immune stimulating complexes. *Immunology Letters* , pp. 133–140.
16. Wallace RJ, Arthaud L & Newbold CJ (1994) Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Applied Environmental Microbiology* , pp. 1762 – 1767.
17. Traore F, Faure R, Ollivier E, Gasquet M, Azas N, Debrauwer L, Keita A, Timon-David P & Balansard G (2000) Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*. *Planta Medica* , pp. 368–371
18. McAllister TA, Annett CB, Cockwill CL, Olson ME, Wang Y & Cheeke PR (2001) Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. *Veterinary Parasitology* ,pp. 85–99.
19. Mader TL & Brumm MC. 1987. Effect of feeding sarsasaponin in cattle and swine diets. *Journal of Animal Science* ,pp. 9–15.
20. Makkar HPS & Becker K. 1996. Effect of Quillaja saponins on in vitro rumen fermentation. In *Saponins Used in Food and Agriculture*, pp. 377–386
21. Johnston, NL. 1981. Evaluation of *Yucca* saponin on broiler performance and ammonia suppression. *Poultry Science*, pp, 2289–2292.
22. Huff, WE. 1994 Effects of a urease inhibitor and ceiling fans on ascites in broilers. 1. Environmental variability and incidence of ascites. *Poultry Science* , pp. 801–809.
23. Klages, F. 1968. “Tratado de química orgánica”. Reverté s.a., Valencia. Pág. 231
24. Hernández, S. 2005. ”Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey”.04 de noviembre de 2005.<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000311> [Consulta: 15-02-2014].
25. CONAFOR.1999.“*Agave lechuguilla Torr*”. Consultado en <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/881Agave%20lechuguilla.pdf> [Acceso 12/05/2014].

26. Bartual José. 1984. "NTP 108: Criterios toxicológicos generales para los contaminantes químicos". Centro de investigación y asistencia técnica, Barcelona, España. Consultado en http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentación/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101ª200/ntp_108.pdf [Acceso : 14/01/2015].
27. Servicio de prevención de valencia. 2003. "toxicidad de productos químicos". Consultado en <http://www.iata.csic.es/IATA/seg/Riesgos/TOXICIDAD20%DEAGENTES%20QUIMICOS.pdf> [Acceso: 14/01/2015].
28. Lagunes, A. 1994. El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas. México: Colegio de postgraduados. pp. 30-40.
29. Cubillos, A. [et al] . "Determinación de la dosis media (D_{L50}) de alcaloides del lupino en pillas de reposición blancas y máron" .*Archivos de medicina veterinaria*, 1999, nº.2, pp. 1-6. Consultado en: http://www.scielo.cl/scielo.php?scrip=sci_arttext&pid=S0301-732X1999000200014 [Acceso: 10-08-2014].
30. Domínguez, A. 1973. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN FITOQUIMICA. Limusa. México, DF. Págs. 128.
31. Francis, G. [et al]. 2002 "The biological action of saponins in animal Systems: a review" .*British Journal of Nutrition*, pp. 2-11.
32. Martínez, A. 2001. SAPONINAS ESTERIOIDES. Medellín: Universidad de Antioquia, pp. 2-10.
33. Fontain, L. 1947. "Las saponinas y la botánica". Instituto Español de Fisiología y Bioquímica. CUC Madrid. Consultado en [http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/...//Anales_15\(1\)_501_521.pdf](http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/...//Anales_15(1)_501_521.pdf) [Acceso: 14/01/2015].

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de análisis estadístico método PROBIT

Probit Procedure				
Iteration History for Parametr Estimates				
Iter	Ridge	Loglikelihood	Intercept	Log10(dose)
0	0	-41.588831	0	0
1	0	-33.159315	-5.117436011	1.9441064088
2	0	-32.826391	-6.30055317	2.3771431346
3	0	-32.823726	-6.417926343	2.4199442372
4	0	-32.823726	-6.41909569	2.4203705916
5	0	-32.823726	-6.41909569	2.4203705916

Model Information	
Data Set	WORK. PROBIT
Events Variable	Response
Trials Variable	N
Number of Observations	3
Number of Events	25
Number of Trials	60
Name of Distribution	Normal
Log Likelihood	-32.8237259
Number of Observations	3
Read	
Number of Observations	3
Used	
Number of Events	25
Number of Trials	60

Parameter Information	
Parameter	Effect
Intercept	Intercept
dose	dose

Last Evaluation of the Negative of the Gradient	
Intercept	Log10(dose)
1.8429083E-7	3.8587336E-7

Last Evaluation of the Negative of the Hessian		
	Intercept	Log10(dose)
Intercept	31.218293697	81.249221199
Log10(dose)	81.24922199	213.68511307

Algorithm converged.

Goodness-of-Fit Tests			
Statistic	Value	DF	Pr > ChiSq
Pearson Chi-square	0.6780	1	0.4103
L.R. Chi-Square	0.6840	1	0.4082

Response-Covariate Profile	
Response Levels	2
Number of Covariate Values	3
Since the chi-square is small ($p > 0.1000$), fiducial limits will be calculated using a t value of 1.96.	

Type III Analysis of Effects			
Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Log10(dose)	1	13.0322	0.0003

Analysis of Parameter Estimates							
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	95% Confidence Limits		Chi- Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-6.4191	1.7541	-9.8571	-2.9811	13.39	0.0003
Log10(dose)	1	2.4204	0.6705	1.1063	3.7344	13.03	0.0003

Estimated Covariance Matrix		
	Intercept	Log10(dose)
Intercept	3.076884	-1.169920
Log10(dose)	-1.169920	0.449517

Output from probit procedure

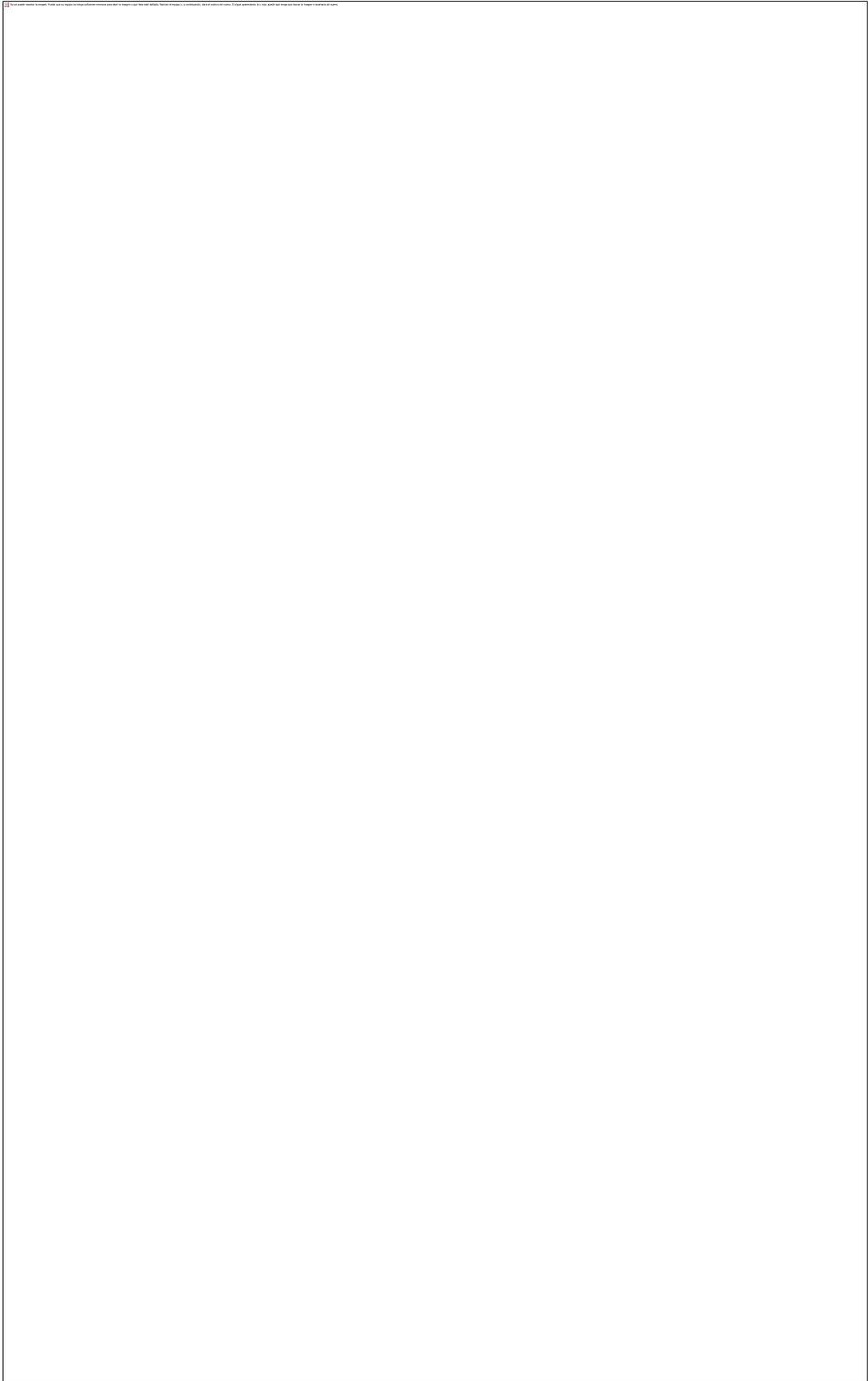
13:25 Thursday, January 16, 2015

Probit Procedure				
Probit Analysis on Log10(dose)				
Probability	Log(dose)	95% Fiducial Limits		
0.01	1.69096	0.58717	2.03266	
0.02	1.80359	0.83073	2.10850	
0.03	1.87504	0.98483	2.15705	
0.04	1.92880	1.10047	2.19386	
0.05	1.97253	1.19430	2.22403	
0.06	2.00974	1.27398	2.24990	
0.07	2.04238	1.34366	2.27276	
0.08	2.07159	1.40590	2.29339	
0.09	2.09817	1.46235	2.31229	
0.10	2.12263	1.51417	2.32984	
0.15	2.22390	1.72680	2.40441	
0.20	2.30439	1.89252	2.46696	
0.25	2.37344	2.03085	2.52446	
0.30	2.43545	2.15030	2.58086	
0.35	2.49291	2.25492	2.63920	
0.40	2.54744	2.34665	2.70211	
0.45	2.60019	2.42659	2.77177	
0.50	2.65211	2.49606	2.84954	
0.55	2.70403	2.55700	2.93584	
0.60	2.75679	2.61177	3.03068	
0.65	2.81131	2.66275	3.13433	
0.70	2.86877	2.71212	3.24792	
0.75	2.93078	2.76199	3.37391	
0.80	2.99984	2.81472	3.51700	
0.85	3.08033	2.87375	3.68624	
0.90	3.18160	2.94562	3.90157	
0.91	3.20606	2.96270	3.95386	

0.92	3.23263	2.98115	4.01077
0.93	3.26185	3.00134	4.14356
0.94	3.29448	3.02377	4.22366
0.95	3.33170	3.04922	4.31791
0.96	3.37543	3.07896	4.43398
0.97	3.42918	3.11534	4.58855
0.98	3.50064	3.16343	4.83265
0.99	3.61327	3.23873	4.83265

Anexo 2. Regresión líneal para la obtención de R² en el programa EXCEL

	X		y
Concentración mg/l	Logaritmo Dosis	Mortalidad (%)	Probit
125	2.096910013	10	3.71827
470	2.6720978579	45	4.87462
639	2.8055008582	70	5.524



Anexo 3. Pre-estudio de polvo de *Agave lechuguilla* como coccidiostato

Conteo e identificación de huevos de parásitos en aves

El pre-estudio fue para confirmar el efecto de las saponinas sobre los parásitos gastrointestinales en aves, el cual se hizo utilizando dos grupos de pollos línea Ross cada uno con animales previamente parasitados, de los cuales al grupo uno se dejó como testigo recibiendo solo alimento comercial y al grupo dos aparte del alimento comercial se incluyó 8% de polvo de lechuguilla, los resultados obtenidos de la evaluación de heces fecales antes de iniciar el tratamiento fueron de 600 HPG (huevos por gramo), en cada organismo y al final del tratamiento en el grupo uno el resultado fue de 566 HPG y en el grupo dos fueron de 218HPG.

La cuantificación se realizó utilizando el método Mc. Master y en la identificación de huevo se hizo mediante un método directo de flotación, este método permite que debido a la solución utilizada (solución azucarada) con una densidad mayor a la de los huevos hace que estos floten lo cual permite que la muestra se tome de la superficie en donde se encuentran.

En la Tabla 6 se muestran los resultados del conteo de huevos, se observó una baja del contenido de huevos por gramos de parásitos en la heces examinadas de los animales del grupo 2 de la etapa 2, aunque considerando que en este caso, se aplicó el polvo de la planta en el pienso de los animales del grupo dos se puede apreciar que se presentó una reducción de más del cincuenta por ciento de huevos por gramo en comparación del grupo uno que no recibió el polvo de la planta, lo cual posiblemente este refleja la acción de las saponinas sobre la carga parasitaria en los organismos de aves, siendo una premisa para estudios posteriores, contemplando que el contenido de estos compuestos varían dependiendo de las condiciones principalmente climáticas que presente las zonas de crecimiento de estas plantas, dado que son productos de su metabolismo secundario.

Tabla 6. Establecimiento de grupos de aves: grupo 1 grupo testigo con alimento comercial, grupo 2 alimento comercial más 8% de polvo de *Agave lechuguilla*

ETAPA	GRUPO 1 HPG (huevos por gramos)	GRUPO 2 HPG (huevos por gramo)
1	566	566
2	566	218

Se identificaron huevos referentes a las heces de los animales resultando de las especies *Ascaridia* sp. y *Heterakis* sp. respectivamente como se muestra en las Figuras 5 y 6.



Figura 5.
Ascaridia sp.



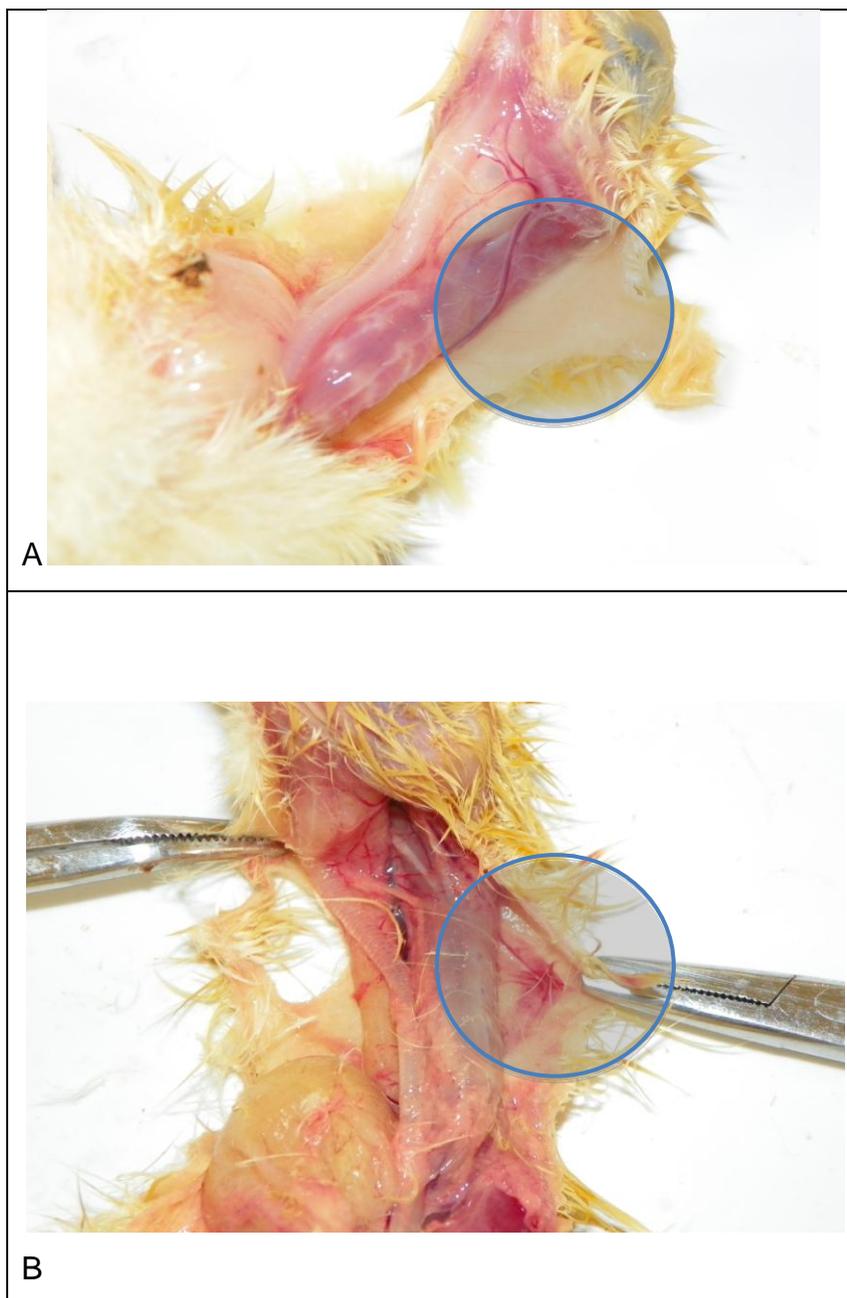
Figura 6.
Heterakis sp.

Se contabilizo e identifico los huevecillos de parásitos, repercutiendo en una reducción del 38.51 % en huevecillos por gramo en heces y se identificaron parásitos como *Ascaridia* sp. y *Heterakis* sp.; lo que establece un uso posible o potencial para control de parásitos en aves.

Resultados de evaluación del efecto toxico en organismo de aves

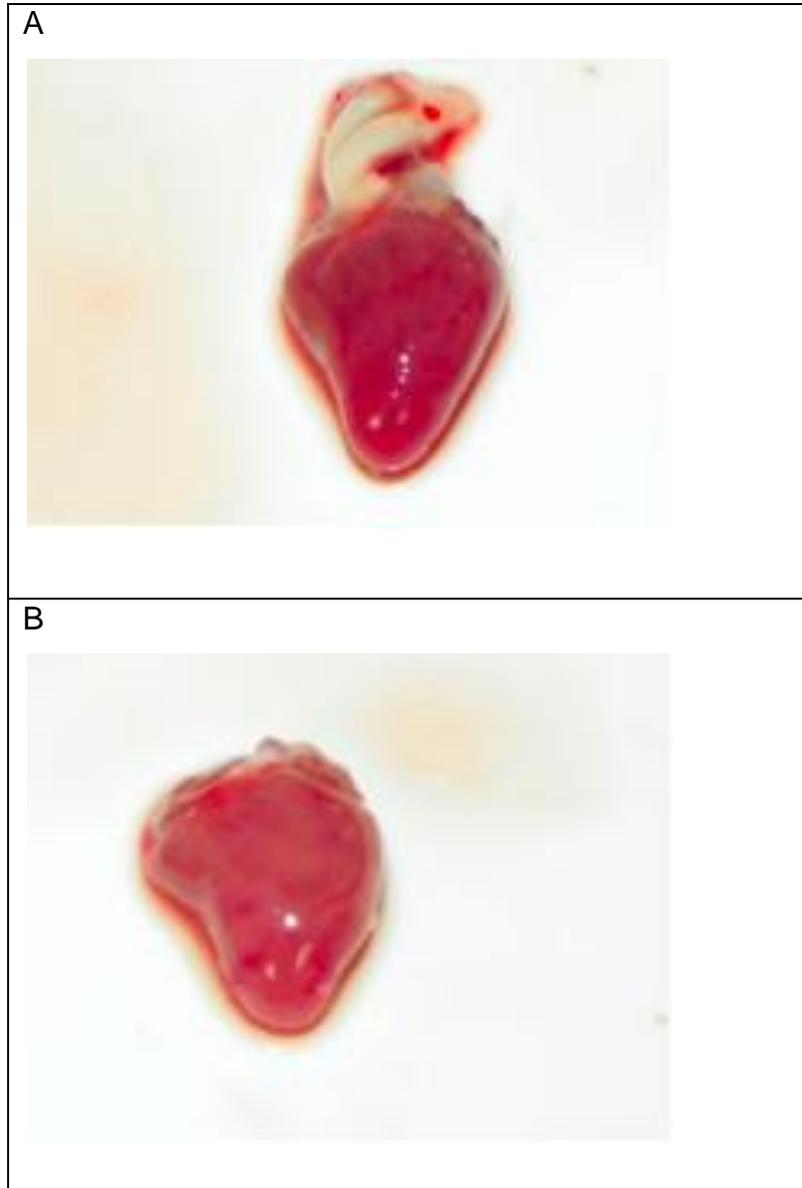
Para la evaluación del daño en el organismo se realizaron necropsias a los animales de cada tratamiento inmediatamente al presentarse las bajas, confirmando que estos presentaran ausencia de signos vitales (respiración y pulso), las cuales se documentaron mediante el uso de una cámara digital Kodak EasyShare Z981, que se compararon con las necropsias realizadas con las aves testigo que fueron sacrificadas después de pasar 48 h que fue el plazo establecido para documentar la mortalidad en el experimento.

Figura 7. Daño producido en vasos sanguíneos de la piel de *Gallus domesticus*.



- A) Ave testigo de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*).
- B) Ave de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*), bajo tratamiento con dosis alta (639 mg/l).

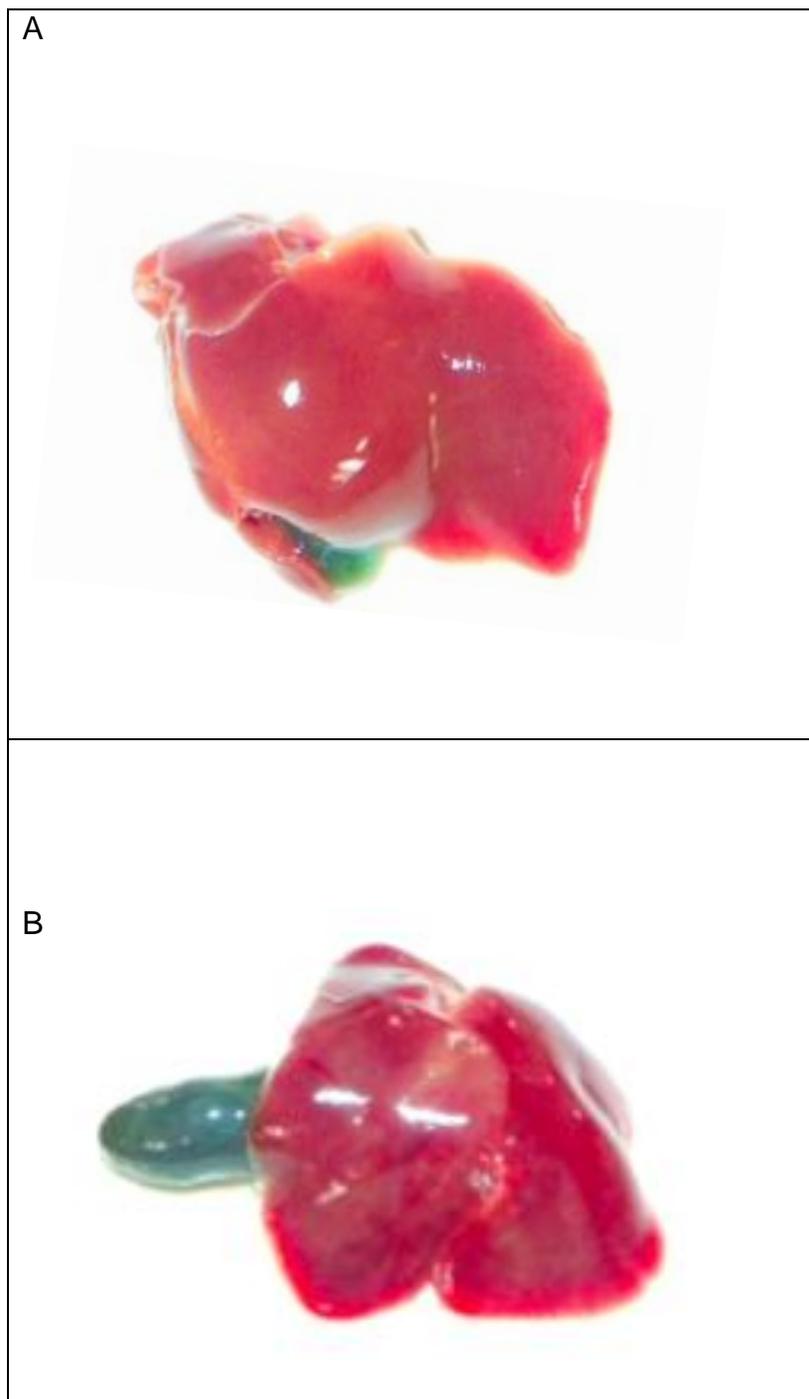
Figura. 8 Daño producido en corazón de *Gallus domesticus*.



A) Corazón de ave testigo de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*).

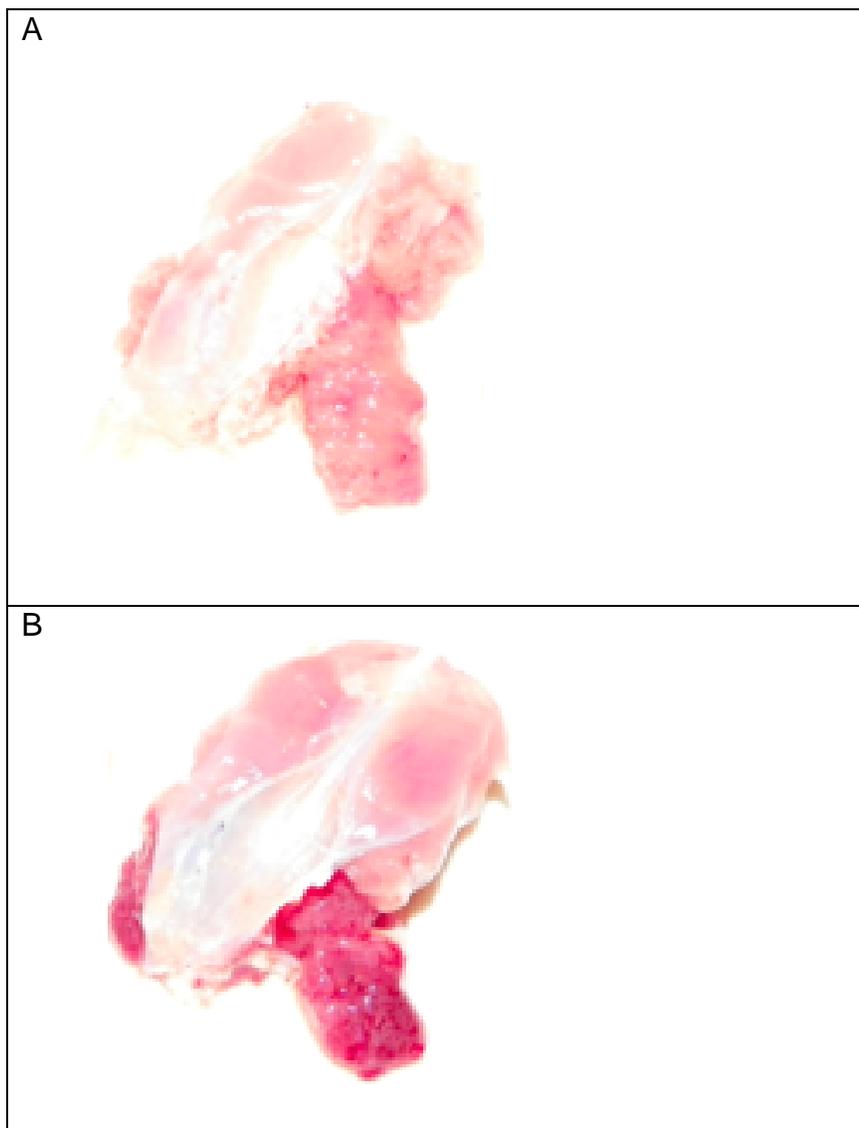
B) Corazón de ave de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*), bajo tratamiento con dosis alta (639 mg/l).

Figura. 9 Daño producido en hígado de *Gallus domesticus*.



- A) Hígado de ave testigo de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*).
- B) Hígado de ave de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*), bajo tratamiento con dosis alta (639 mg/l).

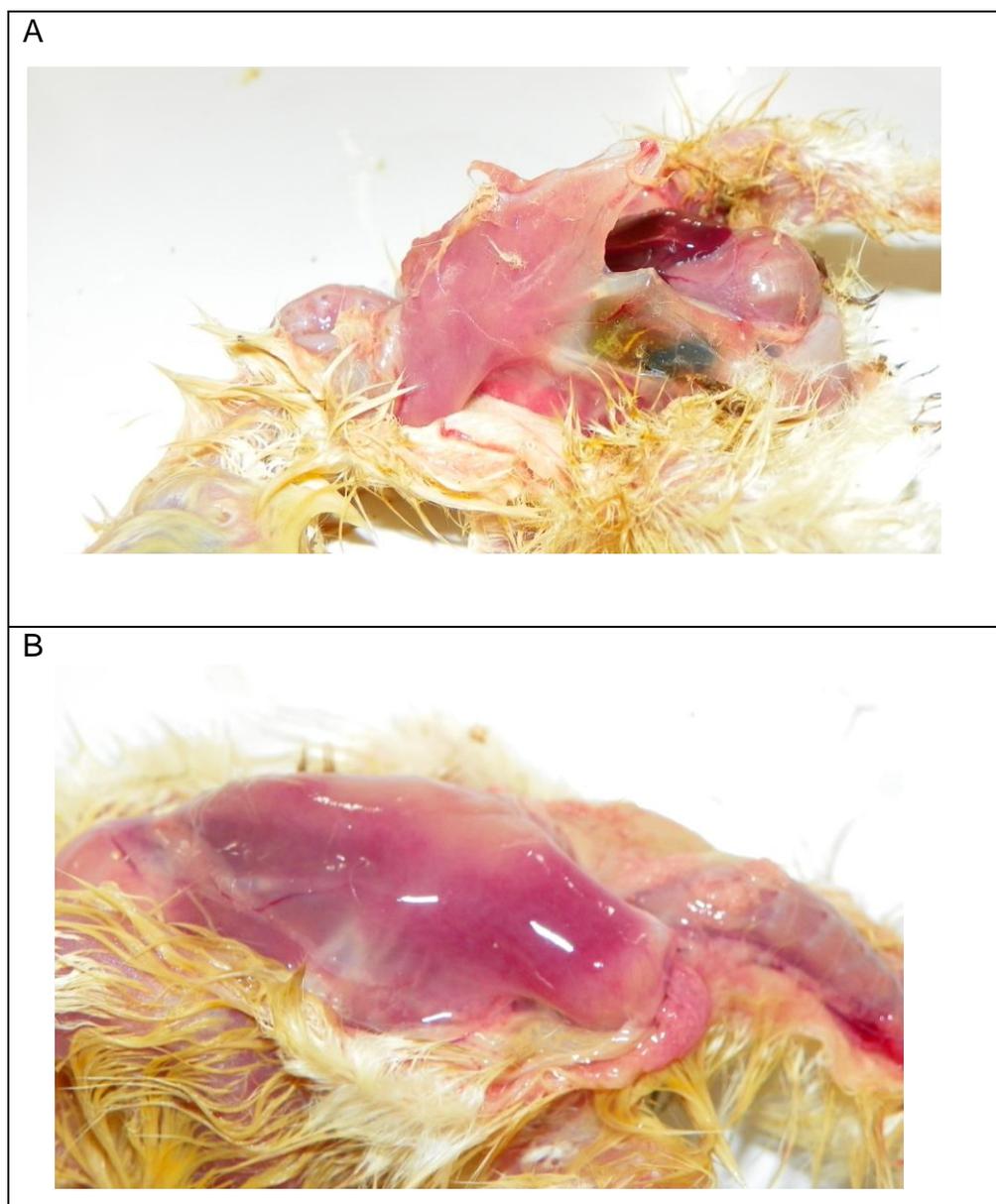
Figura. 10 Daño producido en riñón de *Gallus domesticus*.



A) Riñón de ave testigo de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*).

B) Riñón de ave de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*), bajo tratamiento con dosis alta (639 mg/l).

Figura. 11 Daño producido en musculo de *Gallus domesticus*.



- A) Músculo de ave testigo de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*).
- B) Músculo de ave de 21 días de edad, con un peso de 140g, línea Ross (*Gallus domesticus*), bajo tratamiento con dosis alta (639 mg/l).

El efecto toxico de las saponinas en el organismo de las aves se comprobó, reafirmando el efecto lítico de las células sanguínea y también sobre la formación de poros en paredes celulares, ya que en la fotografías realizadas en las necropsias de los órganos el principal signo de daño es la extravasación de sangre, siendo la causa por la cual algunos órganos (riñón, hígado) y tejidos (piel, músculo) presentan peculiar exceso en coloración y otros de forma inversa la falta de esta (corazón).