

11662



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**VARIACIONES CIRCADIANAS EN LA UTILIZACION DEL
CALCIO DIETARIO PARA LA FORMACION DEL
CASCARON EN PONEDORAS DURANTE
EL PICO DE POSTURA**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN EL AREA
DE NUTRICION ANIMAL**

P R E S E N T A:

ZTC. HECTOR JAIRO CORREA CARDONA

ASESOR: JOSE ANTONIO CUARON IBARGÜENGOYTIA

274171

ENERO

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**VARIACIONES CIRCADIANAS EN LA UTILIZACION DEL CALCIO DIETARIO
PARA LA FORMACION DEL CASCARÓN EN PONEDORAS
DURANTE EL PICO DE POSTURA**

Héctor Jairo Correa Cardona

Asesor: José Antonio Cuarón Ibarquengoytia

RESUMEN

Se realizó un experimento con aves en el pico de postura, para establecer si el suministro de Ca en las horas de la noche es más eficiente que en otros momentos del día y permite reducir la cantidad de Ca consumido y la necesidad de recurrir al Ca óseo para la formación del cascarón, sin afectar su calidad. Para ello se utilizaron 112 aves tipo Leghorn de 24 semanas de edad alojadas en jaulas individuales que se distribuyeron al azar en uno de 13 tratamientos experimentales conformados por 12 tratamientos incluidos en un arreglo factorial 3 x 4, resultado de la combinación de tres niveles de concentración de Ca en la dieta (3.4, 4.3 y 5.2 %) y cuatro momentos del día para el suministro de estas dietas (06.00, 12.00, 18.00 y 24.00 h) más un tratamiento control negativo (2.4 % de Ca para los cuatro periodos del día) En cada periodo se suministró 25 g de la dieta experimental a cada ave en comederos individuales. Para los 12 tratamientos del arreglo factorial, se asignó seis aves por tratamiento en tanto que para el testigo negativo se asignó un total de 40 aves. Estas se sometieron a una fase de adaptación a un programa modificado de iluminación intermitente (16 h de luz y 8 h de oscuridad) durante cuatro semanas, en la última de las cuales se realizó la adaptación al programa de suministro del alimento (100 g/ave/día

repartidos en cuatro periodos). Durante la fase de adaptación, a las aves se les suministró un alimento comercial con 3.8% de Ca. Al finalizar esta fase, estas se sometieron a los tratamientos experimentales durante 19 días en el pico de postura. Se evaluaron variables de producción y calidad del cascarón en los huevos recolectados durante las tres semanas experimentales así como la concentración de P plasmático en muestras de sangre tomadas a las 12 hPOV el último día experimental. Estas variables de respuesta se analizaron de acuerdo a un diseño de bloques completamente al azar en un arreglo factorial. El último día del experimento, a las 6, 12 y 18 hPOV, se sacrificaron por dislocación cervical seis aves del tratamiento de 2.4 % de Ca a las que se les extrajo el huevo en formación y en los que se estimó la tasa de deposición de Ca en el cascarón. En las seis aves pertenecientes al último periodo los huevos se obtuvieron por ovoposición en los que se midió, además, las otras variables medidas durante las tres semanas experimentales. Estas se analizaron de acuerdo a un diseño de bloques completamente al azar. Se calcularon ecuaciones de regresión para la deposición de Ca en el cascarón y el incremento en el peso del cascarón para el tratamiento control negativo y, a partir de estos datos, se estimó la tasa de deposición de Ca en el cascarón en los tratamientos incluidos en el arreglo factorial. Se aceptó las diferencias entre tratamientos cuando $P < 0.05$. Más del 80% de los huevos se ovopositaron antes de las 12:00 h y se estimó que entre las 20:00 y las 06:00 h del día siguiente toda la población de aves que se encontraba en postura estaba en proceso de formación de cascarón siendo este el periodo del día en el que mayor demanda por Ca se presentó para la población de aves en este experimento. No se encontraron diferencias significativas entre los

tratamientos incluidos en el arreglo factorial para los parámetros de producción y de calidad del cascarón. La eficiencia en la utilización del Ca de la dieta para la formación del cascarón fue menor a media que la cantidad de Ca consumido se incrementó. Se presentó un efecto del periodo de suministro y cantidad de Ca suministrado sobre la concentración de P plasmático, interacción que indicó que el tratamiento de 3.4% de Ca suministrado a las 24:00 h fue el mejor en términos de la menor cantidad de Ca óseo movilizado y la conservación de la calidad de cascarón. Se pudo establecer que la tasa de deposición de Ca en el cascarón fue similar entre los tratamientos incluidos en el arreglo factorial (107.4 mg/h, EEM = .0088). Todo lo anterior permite indicar que es posible reducir tanto la cantidad de Ca consumido como la cantidad que es movilizado desde la médula ósea, sin afectar la calidad del cascarón ni los parámetros productivos de las aves, cuando este mineral es suministrado en un momento del día y en una cantidad consistente con las demandas del ave por este mineral para la formación del cascarón.

AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM,

a la Empresa AGRIBRANDS PURINA DE COLOMBIA S.A., Dr. Enrique Galiano.

a la Empresa SOLLA S. A., Dr. Pablo Aguirre,

al Laboratorio de Bromatología de la Universidad Nacional De Colombia, Sede Medellín. Profesor Daniel Mora Soriano,

por el apoyo logístico y financiero para la realización del presente trabajo.

Al Doctor Carlos Vásquez y a la Doctora Susana Mendoza de la Universidad Nacional Autónoma de México por el inmenso e inagotable apoyo que me brindaron en todo momento. Sin su colaboración no habría sido posible mi permanencia en el Posgrado. A ellos, mil gracias....

Al Doctor José A. Cuarón por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de la Unidad de Posgrado por que su compañía y amabilidad fueron fundamentales, en especial a Alejandro. Son inolvidables...

A Lety por su invaluable colaboración.

DEDICATORIA

A mi nanita ...

... Compañera,
bien sé que puedo
contar contigo,
no hasta dos
o hasta cinco,
si no,
simplemente,
contar contigo.

CONTENIDO

RESUMEN	ii
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE GRAFICAS	x
I INTRODUCCIÓN	1
II REVISION DE LITERATURA	3
Cronobiología y nutrición animal	3
Variaciones circadianas en el metabolismo del calcio en aves de postura	4
Consumo de calcio	4
Absorción del calcio	6
Acreencia y resorción ósea	10
Formación del cascarón	12
Excreción	15
III HIPÓTESIS	17
IV OBJETIVOS	18
V MATERIALES Y METODOS	19
Localización	19
Unidades experimentales	19
Diseño experimental y tratamientos	22
Mediciones	24
Análisis químicos	26

Análisis estadístico	26
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
VII CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS	51
ANEXO 1. Ingreso y salida de datos al programa SAS para los tratamientos incluidos en el arreglo factorial	56
ANEXO 2. Ingreso y salida de datos al programa SAS para los datos de P Plasmático	62
ANEXO 3. Ingreso y salida de datos al programa SAS para los datos del tratamiento control negativo	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de los tratamientos y cantidad total de Ca consumido por cada gallina al día	21
Cuadro 2. Composición de dietas experimentales	23
Cuadro 3. Efecto del nivel de Ca en la dieta y momento de suministro sobre algunos parámetros productivos	30
Cuadro 4. Efecto del nivel de Ca en la dieta y momento de suministro sobre algunos parámetros de calidad del cascarón	34
Cuadro 5. Efecto del nivel de calcio en la dieta y momento de suministro sobre la utilización del calcio en la formación del cascarón	37
Cuadro 6. Eficiencia en el uso del calcio dietario para la formación del cascarón de acuerdo al nivel de calcio en la dieta	38
Cuadro 7. Ecuaciones de regresión para las características del cascarón en formación en las aves del tratamiento control negativo	44
Cuadro 8. Tasa de deposición de Ca en el cascaron en los tratamientos incluidos en el arreglo factorial	48

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Distribución de la postura a lo largo del día	31
Gráfica 2. Porcentaje de ovoposición, de ovulaciones y de aves en formación de cascarón (porcentaje acumulado) en función de la hora del día	33
Gráfica 3. Ecuación de regresión para la eficiencia en la utilización del Ca dietario en la formación del cascarón en función de la cantidad de Ca consumido	39
Gráfica 4. Interacción entre el nivel y el periodo de suministro de Ca sobre la concentración de fósforo plasmático	41
Gráfica 5. Ecuación de regresión para el peso del cascarón en función de las horas posovoposición	45
Gráfica 6. Ecuación de regresión para el Ca depositado en el cascarón en función del periodo de formación	46

I INTRODUCCIÓN.

Hay muchas razones que justifican el permanente interés científico en el metabolismo del calcio (Ca) en aves de postura. Una primer razón involucra la enorme importancia económica de esta especie que provee buena parte de nuestro suministro diario de alimentos. En segundo lugar, ha habido una considerable motivación para usar aves como modelos de estudios de disfunciones del metabolismo del Ca que conducen a diferentes enfermedades que se presentan tanto en humanos como en animales (Soares, 1987; Norman, 1987; Turner et al., 1994). De otra parte, no obstante los avances en la investigación del metabolismo del Ca con relación a la formación del cascarón, en los controles de calidad y en la tecnología aplicada, continúan presentándose pérdidas de huevos debido a problemas del cascarón y al mal manejo que podrían ascender hasta un 14.14% de la producción total (Carnarius et al., 1991).

Resulta dudoso que exista cualquier otro animal que pueda consumir, absorber, transportar y metabolizar más Ca por unidad de peso que las aves. Las ponedoras comerciales producen en un periodo de 52 semanas 295 huevos, cada uno con un peso promedio de 60 g (Lohmann, 1996) lo que representa un total de cerca de 18 kg de masa. Esto constituye, en sí misma, una considerable transferencia de material corporal de alrededor de 12 veces el peso del ave. Considerando que el cascarón representa un promedio de 9.3% del peso total del huevo (Al-Batshan et al., 1994) y que, a su vez, el Ca es el 36% del peso total del cascarón (Clunies y Leeson, 1995), es posible calcular que una gallina comercial secreta durante un periodo productivo de un año, cerca de 600 g de Ca en el

cascarón lo que corresponde a unas 30 veces la cantidad de Ca que contiene su cuerpo (Elaroussi et al., 1994). Si, además, se asume que del Ca consumido se retiene un 50% para el huevo y la formación del cascarón (Etches, 1987; Hurwitz, 1987), una gallina consumiría cerca de 1.2 kg de Ca al año.

El manipular esta enorme cantidad de Ca desde el alimento hasta el cascarón necesariamente debe involucrar un mecanismo homeostático muy eficiente y particular de las ponedoras (Etches, 1987). El conocimiento de este mecanismo es la base para entender y corregir los diferentes problemas que enfrenta la industria avícola con relación a la calidad del cascarón. Actualmente es conocido que el metabolismo del Ca en aves de postura presenta fluctuaciones rítmicas de periodos circadianos (Frost et al., 1991).

II REVISION DE LITERATURA

CRONOBIOLOGIA Y NUTRICION ANIMAL.

Desde hace muchos años se conoce que la mayoría de las variables fisiológicas fluctúan regularmente en torno a algún valor intermedio gracias al efecto homeostático del sistema nervioso y endocrino. Actualmente es conocido que existen varias actividades bioquímicas, fisiológicas y comportamentales que se presentan con una regularidad reproducible tal, que los picos y depresiones de dicha actividad se encuentran a intervalos predecibles. En 1969, Halberg utilizó el término **cronobiología** para agrupar dichos aspectos temporales de los fenómenos biológicos (Wilson, 1989).

Con base en la duración del ciclo, Ruckebusch et al., (1991) los han clasificado en ritmos de alta frecuencia (**ultradianos**) que tienen poca duración; ritmos de baja frecuencia (**infradianos**) que son de larga duración, y ritmos de frecuencia media entre los que se encuentran los **ritmos circadianos**, con un periodo aproximado de 24 horas con límites normales de 20 a 28 horas.

En los animales domésticos, no obstante que han sido detectados y descritos ritmos en diferentes procesos y actividades relacionados con la nutrición y el metabolismo general de los nutrimentos, la aplicabilidad que se le ha dado a éste fenómeno ha sido muy restringida (Halberg, 1989; Mercer et al., 1993). Los requerimientos nutricionales, por ejemplo, se han establecido sobre la base de asignaciones diarias en las que no se han tenido en cuenta las variaciones que dentro del día se presentan para dichos requerimientos. Así mismo, los programas de alimentación se han establecido sobre la base de suministrar estos nutrientes

asignados por día, ya sea en una comida, en varias o a libre voluntad durante el día, determinando el momento en que se suministra, más por razones prácticas que por fundamentos científicos.

VARIACIONES CIRCADIANAS EN EL METABOLISMO DEL CALCIO EN AVES DE POSTURA

CONSUMO DE CALCIO

El consumo voluntario es un fenómeno fisiológico (expresado en términos comportamentales), que comprende la integración de muchas señales, y refleja la flexibilidad del sistema biológico involucrado para hacer frente a la variabilidad en el suministro de alimento, la composición y el estado animal (Illus y Jessop, 1996). Para Church y Pond (1977), resulta indudable que todos los animales disponen de mecanismos fisiológicos para regular el consumo de alimentos, tanto en situaciones a corto como a largo plazo. El consumo de alimento, sin embargo, más que estar regulado, es la expresión de la situación metabólica y psicológica del animal; los animales consumen como consecuencia del estado metabólico con el fin de cubrir las necesidades de nutrientes que en esos momentos demanda. El consumo no es más que una respuesta a una demanda por parte del metabolismo del animal. Si no hay demanda, no hay consumo. Es un principio de economía. En este sentido, Jhonson, (1992), afirma que la ritmicidad en el consumo de alimentos es una señal de ritmos circadianos. El asegura que el comportamiento alimenticio es un patrón inherente, genéticamente controlado que puede ser variado por condicionamientos o entrenamientos.

En el caso del Ca, ha sido postulado que el consumo de este mineral por las aves de postura estaría regulado por tres fuerzas (Etches, 1987): Primero, por la existencia de un ritmo circadiano tanto en el consumo de alimento como de Ca el cual es modificado, a su vez, por el estado de la formación del huevo. En segundo lugar, el consumo diario de Ca depende del estado de la secuencia ovulatoria. Sin embargo, quizá la fuerza que altera en mayor medida el consumo de Ca, es el método de presentación de éste para su consumo. Invariablemente estas tres fuerzas son la expresión de las variaciones cíclicas en los requerimientos de Ca para la formación del cascarón.

Sí el Ca está incorporado en el alimento de modo que la gallina es incapaz de seleccionar este nutriente, ella consume el Ca a una tasa dependiente del consumo de alimento a través del fotoperiodo (Clunies y Leeson, 1995; Chan y Moran, 1985; Clunies y Leeson, 1994). De otra parte, si el Ca es suministrado separadamente del resto de ingredientes, este es consumido preferentemente al final del fotoperiodo y muy poco Ca es consumido durante las primeras 10 a 12 horas (Chan y Moran, 1985). Alrededor del 60% del consumo del Ca del día se presenta en las cuatro últimas horas del fotoperiodo. Este comportamiento en el consumo estaría respondiendo a un incremento en las necesidades de Ca para formar el cascarón el cual, si se asume que la ovoposición se presenta a las 0800 h, presentaría su tasa máxima entre las 10 y 14 horas postovoposición (hPOV) (18:00 a 20:00 h) de acuerdo a los datos de Clunies y Leeson (1995). Este tiempo concuerda con el momento del día en el cual se presenta un incremento marcado en el consumo de Ca alcanzando su cenit entre las 18:00 y 22:00 h indicando que el incremento marcado en el consumo de Ca se presenta

como una respuesta al incremento en la demanda del organismo por este mineral para la formación del cascarón.

El consumo tanto de alimento como de Ca se ven reducidos durante los días en que las aves se encuentran en pausa ovárica. Esta reducción en el consumo de nutrientes, se ha postulado como una respuesta a la reducción en las necesidades tanto de energía como de nutrientes, incluido el Ca (Nesheim y Austic, 1985; De Blas, 1988). La reducción en el consumo de Ca, sin embargo, no es proporcional a la reducción en las necesidades de Ca para formar el cascarón lo que se ha explicado como una compensación al balance negativo que se presenta durante los días de formación de cascarón (Chan y Moran, 1985; Clunies et al., 1992).

ABSORCIÓN DEL CALCIO

Actualmente es aceptado que el Ca puede ser transferido desde el lumen intestinal hasta el sistema circulatorio por vías para e intracelulares (Norman, 1987; Wasserman y Fuller, 1995; Bronner, 1987; Fernández, 1995a; Dunn et al., 1995; Norman y Hurwitz, 1993). El primero es un proceso no saturable que se presenta a todo lo largo del intestino delgado, el cual es independiente de regulaciones fisiológicas y nutricionales, siendo dependiente únicamente de la concentración del Ca a nivel luminal. La segunda vía se da por procesos saturables, predominantemente a bajas concentraciones de Ca, por lo que requieren energía para mover el Ca en contra de un gradiente electro-químico, localizándose especialmente en el intestino proximal, es decir, el duodeno y yeyuno superior. Estas rutas están reguladas por la hormona 1,25-dihidroxicolecalciferol mediante dos efectos (Wasserman y Fuller, 1995): Uno

dependiente de la expresión genómica y síntesis de proteína (respuesta genómica), y la otra, una respuesta más rápida que no es dependiente de la activación genómica (respuesta no-genómica). El primero está ejemplificado por la síntesis de la "Proteína Transportadora de Ca" (CaBP) (Bronner, 1987) denominada también Calbindin-D_{28k} (Fernández, 1995a) y un oligómero recientemente descubierto de 400-kDa (Dunn et al., 1995). En el caso de los mamíferos, esta proteína transportadora presenta un tamaño de 9-kDa y es denominada Calbindin-D_{9k} (Wasserman y Fuller, 1995). Se trata de un proceso complejo que involucra el movimiento luminal del Ca a través de la membrana de las microvellosidades al interior del enterocito, la traslocación del Ca desde el punto de entrada hasta la membrana basolateral, y la extrucción activa desde la célula al sistema circulatorio (Wasserman y Fuller, 1995). El segundo, está ejemplificado por el incremento rápido en la concentración intracelular de Ca por la apertura de canales de Ca (Wasserman y Fuller, 1995; Norman y Hurwitz, 1993).

En principio puede plantearse que la importancia cuantitativa de las dos vías en la absorción del Ca en un momento determinado, dependerá de dos factores: la cantidad de Ca presente en el lumen intestinal y la concentración de 1,25-dihidroxicolecalciferol en plasma. En el primer caso, Bronner (1987) señala que variando la cantidad de Ca consumido se tendrán efectos diferentes y opuestos sobre las dos rutas de absorción del Ca: Un incremento en el consumo de Ca reducirá la regulación de los procesos transcelulares saturables, mientras que la cantidad de Ca movido por la ruta no saturable paracelular se incrementará en proporción directa al incremento en el consumo. Por el contrario, disminuyendo el consumo de Ca conducirá al resultado opuesto, un incremento en la regulación

por los procesos transcelulares, mientras que la cantidad de Ca absorbido por la ruta paracelular disminuirá, de nuevo en proporción directa a la disminución del consumo. Así mismo, Soares (1984) señala que aunque existen diferencias en opinión, se piensa que los mecanismos pasivos (¿procesos paracelulares?) para la absorción del Ca predominan cuando el Ca en la dieta es adecuado. En condiciones de bajo Ca o de deficiencia, los mecanismos activos (¿procesos transcelulares?) se asume que son mucho más importantes.

La concentración de Ca a nivel intestinal estará determinada por la tasa de consumo la cual, como se vio en el apartado anterior, va a ser diferente dependiendo principalmente del estado de formación del huevo y la presentación de Ca en el alimento. Cuando el Ca es suministrado mezclado con el resto de componentes del alimento, éste será consumido en la misma medida en que el alimento como un todo sea consumido. Cuando el Ca es suministrado separado del resto de componentes dieta, este será consumido en una proporción mucho mayor al final del fotoperíodo.

Por otra parte, las concentraciones de la 1,25-dihidroxicolecalciferol en el plasma de aves de postura, presenta un ritmo circadiano que, según Frost et al., (1991) es dependiente de la ovoposición alcanzando el cenit entre las 10 y 14 horas postovoposición. Estas variaciones rítmicas en la concentración de esta hormona estarían controladas inicialmente por los requerimientos de Ca por el organismo. Las concentraciones plasmáticas de Ca iónico (Ca^{**}) disminuyen a medida que el Ca es bombeado desde la sangre hacia la glándula coquiliaria para formar el cascarón de modo que la concentración más baja se alcanza alrededor de las 14 hPOV. Esa reducción, que en realidad es un estado de hipocalcemia, estimula la

actividad de la enzima 25-hidroxicolecalciferol 1- α hidroxilasa a nivel renal quien, a su vez, induce la transformación de la 25-hidroxicolecalciferol en 1,25-dihidroxicolecalciferol (Soares, 1984; Frost et al., 1991). Así mismo, una baja concentración de Ca^{++} en plasma estimula la secreción de la hormona paratiroidea la cual actúa concertadamente con la 1,25-dihidroxicolecalciferol para causar un incremento en la resorción ósea, la absorción intestinal del Ca y una reducción en la excreción renal de éste mineral, todo con la finalidad de contrarrestar la disminución en su concentración plasmática (Eiaroussi et al., 1994; Soares, 1984).

Bajo estas consideraciones es posible argumentar que sobre la base de las variaciones circadianas en la concentración de la 1,25-dihidroxicolecalciferol, se podría esperar una absorción del Ca por procesos paracelulares principalmente al principio y la final del periodo comprendido entre dos ovoposiciones y, por procesos intracelulares durante el periodo de máxima deposición de Ca en cascarón. Esto no implica que al mismo tiempo se presente el proceso complementario de absorción de Ca. Sin embargo, si se considera el patrón de consumo de Ca bajo condiciones de suministro separado, donde se da un incremento repentino al final del fotoperíodo, es probable que el Ca sea absorbido principalmente por procesos paracelulares contrariamente al modo en que se absorbe cuando se suministra con un alimento completo. Ahora, la retención de Ca no ha sido establecida sobre una base de intervalos cortos de tiempo a través del periodo de formación del cascarón (Etches, 1987) por lo que la eficiencia con la cual estas vías independientemente absorben el Ca intestinal tampoco se ha

establecido, pero es posible especular que la vía intracelular sea más eficiente que la paracelular dado que es conocido que a medida que se incrementa el consumo de Ca se reduce la retención de este tanto en días de formación de cascarón como en días en que no hubo formación de cascarón (Clunies et al., 1992) aunque en términos cuantitativos haya un incremento neto en la cantidad retenida.

Durante los días en que las gallinas no están formando cascarón, ha sido demostrado que no solo se reduce el consumo de Ca y demás nutrientes (Chan y Moran, 1985; Nesheim y Austic, 1985; De Blas, 1988; Clunies et al., 1992a; Clunies et al., 1992b) si no que además, se reduce la eficiencia en la absorción de éste.

También ha sido demostrado que a medida que avanza la edad de las aves, la tasa de absorción de Ca se ve reducida (Al-Batshan et al., 1994), lo cual estaría asociado a una disminución en la actividad de la enzima 25-hidroxicolecalciferol 1- α hidroxilasa a nivel renal y la consecuente disminución en la concentración plasmática de la 1,25-dihidroxicolecalciferol como se puede deducir de los niveles máximos presentados por Frost et al. (1992) con aves de 48 semanas de edad (646 pmol/L) y por Frost et al. (1991) con aves de 75 semanas de edad (300 pmol/L).

ACREENCIÓN Y RESORCIÓN ÓSEA.

El tejido óseo es un tejido fisiológicamente activo que participa de una manera importante en la homeóstasis de las concentraciones sanguíneas del Ca. Fernández (1995b) realizando un estudio de cinética con Ca y fósforo (P)

radioactivos en cerdos en crecimiento demostraron que la acreencia ósea fue constante e independiente del nivel de consumo pero, al contrario, la resorcion ósea disminuyó con el incremento en el consumo, de modo que las cantidades incrementadas de Ca y P que ingresaron al sistema al incrementarse la cantidad absorbida fueron contraatacadas por una reduccion de la cantidad de minerales liberados del hueso. Así mismo, las investigaciones de Bloom et al., (1958) (citados por Etches, 1987) en aves de postura indican que tanto la actividad osteoclastica (resorcion ósea) como la actividad osteoblastica (acreencia ósea) están presente simultáneamente en todos los momentos del ciclo ovulatorio y formación del cascarón señalando que la actividad osteoblastica predomina cuando la glándula coquiliaria es inactiva, en tanto que la actividad osteoclastica predomina cuando la tasa de acreencia de Ca^{++} sobre el cascarón es muy alta. Etches (1987) por su parte, indica que presumiblemente la corteza ósea es la encargada de suministrar el Ca^{++} durante periodos de privacion crónica pero que la demanda aguda de Ca^{++} cuando la calcificacion del cascarón ocurre en ausencia de consumo de alimento, es sostenida por la movilizacion de Ca desde la médula ósea.

Con lo anterior en mente, es posible argumentar que cuando el Ca es consumido durante las primeras horas postovoposición y las últimas horas antes de la siguiente ovoposición, cuando la calcificacion del cascarón es baja, este es principalmente destinado hacia la acreencia ósea en tanto que durante las horas intermedias en las que la formación del cascarón se da activamente con una alta demanda de Ca, es principalmente la actividad osteoclastica la encargada de suministrar el Ca al sistema dado que durante esas horas el consumo de Ca

normalmente es muy bajo. Esto estaría reforzado por los datos publicados por Ciunies y Leeson (1994) los cuales muestran que el Ca consumido durante las horas de máxima deposición del cascarón fue más bajo que durante los otros periodos y que, además, este fue empleado con una eficiencia calculada de más del 100% lo que indica que se está depositando más Ca al cascarón que el que es aportado desde el tracto digestivo y esto es debido a que los bajos consumos que se presentan durante esos periodos no logran compensar la cantidad de Ca que es bombeado hacia el cascarón por lo que sería el Ca proveniente de los huesos el encargado de suministrar este mineral. Esto concuerda con las variaciones en la concentración de P plasmático informadas por Frost et al., (1991) que presentan su máximo durante las horas de máxima deposición de cascarón, y las cuales son un indicador de la actividad osteoclástica. Dado que durante la resorción ósea se liberan Ca y P simultáneamente y, debido a que éste último no es empleado en la formación del cascarón, el exceso es expresado como un incremento en las concentraciones plasmáticas.

FORMACIÓN DEL CASCARÓN

El proceso más importante que altera las concentraciones de Ca^{++} a nivel plasmático en aves en postura es fundamentalmente la alta demanda de este mineral para la formación del cascarón. Es precisamente este proceso el que pone en funcionamiento todos los mecanismos homeostáticos que poseen las aves para compensar la secreción de Ca por esta vía.

El cascarón está compuesto de aproximadamente un 95% de carbonato de Ca, principalmente en la forma de cristales de calcita, y 5% de material orgánico, en la forma de membranas y una matrix orgánica (Parsons, 1982).

La formación del cascarón no se da a una tasa constante. Esta es lenta al principio, presentando una tasa máxima al intermedio para luego disminuir nuevamente al final (Clunies y Leeson, 1995; Etches, 1987; Clunies y Leeson, 1994; Frost et al., 1991). Clunies y Leeson (1994) demostraron estas variaciones, al determinar la cantidad de Ca depositado en el cascarón cada seis hPOV empleando cinco niveles de concentración de Ca en la dieta. De los datos publicados por estos autores se desprende que, en general, la tasa de deposición de Ca en el cascarón es baja durante las primeras seis hPOV. Estas son consistentes con el tiempo en que tarda el huevo en formación en llegar a la glándula coquiliaria e iniciar la calcificación. La ovulación se presenta entre 40 minutos (North, 1991) a una hora (Etches, 1987) POV. Posteriormente, el huevo en formación tarda alrededor de 4.5 horas en alcanzar la glándula coquiliaria al pasar por el infundibulum (0.25 h), el magnum (3.0 h) y el itmus (1.25 h). Incluso, aún cuando el huevo en formación alcanza la glándula coquiliaria, la deposición del cascarón es muy lenta durante las primeras 4 horas ya que durante este periodo el principal proceso que se presenta es la absorción de agua, algunas sales y glucosa desde el fluido de la glándula hacia el interior del huevo incrementándose el volumen del huevo (Tullet, 1987). Este proceso, conocido como "hinchamiento", comienza a estrechar las membranas del cascarón y resulta en la distensión de la glándula coquiliaria lo cual es considerado como un estímulo para que se inicie la fase rápida de calcificación. La tasa máxima de deposición

de Ca en el cascarón se presenta en el periodo comprendido entre las 12 y 18 hPOV, declinando posteriormente.

Durante la fase de máxima deposición de cascarón, la transferencia de Ca^{++} desde la sangre hacia éste se da a una tasa que oscila entre 100 y 200 mg/h (Clunies y Leeson, 1995; Etches, 1987; Clunies y Leeson, 1994). Según cálculos de Etches (1987), esta excreción de Ca^{++} desde la sangre podría reducir los niveles plasmáticos de Ca^{++} a cero si no hubiese otra fuente disponible. En vista de que la formación de cascarón se presenta en las horas de oscuridad cuando los niveles de consumo de alimento son muy bajos o inexistentes, la única fuente que puede suministrar el Ca^{++} durante éste periodo es la médula ósea

En términos simples, el cascarón deriva de la combinación de iones de Ca con iones bicarbonato (Tullet, 1987; Taylor y Stringer, 1967):



Dado que el Ca^{++} no es almacenado en las células del oviducto, este es transportado desde la sangre por mecanismos pasivos y, mucho más importante, por mecanismos activos (Tullet, 1987). Esto estaría indicando que durante la formación del cascarón también se presentaría una demanda de energía para el transporte de este ion hacia el cascarón.

EXCRECIÓN.

Al igual que en los demás procesos del metabolismo del Ca en aves de postura, la excreción de este mineral presenta una variación diurna. Fussell (1960) citado por Wideman (1987) observó fluctuaciones en las tasas de excreción urinaria de Ca y P durante el ciclo de formación del huevo. La excreción de Ca disminuyó y la de P se incrementó durante los seis periodos de recolección de orina que precedieron la ovoposición (cada 2 h). Luego de la ovoposición, la excreción de Ca se incrementó y la de P disminuyó. Estos patrones de excreción de Ca y P parecen estar correlacionados con el estado de calcificación del cascarón y no necesariamente con el momento del día o con el momento de alimentación (Taylor, 1967) lo que estaría indicando que se trata de un ritmo circadiano endógeno que no es modificado por factores externos (Brady, 1979, Takahashi y Zatz, 1982). Estos datos concuerdan con los de Farmer et al., (1986b) quienes estudiaron el efecto del momento del día en que se suministra el Ca a aves en postura sobre su utilización en la formación del cascarón. Sus resultados indican que cuando el Ca es suministrado en las horas AM (0800 h), este se absorbe en menor proporción y se excreta en mayores cantidades que cuando es suministrado en las horas PM (1600 h).

Durante la calcificación del cascarón, la glándula coquiliaria remueve Ca desde la sangre. Cuando la absorción de Ca por el tracto no puede sostener el ritmo de utilización de Ca por la glándula coquiliaria o cuando la calcificación ocurre durante la noche cuando el tracto está vacío, los niveles sanguíneos de Ca disminuyen (Etches, 1987; Frost et al., 1991; Wideman, 1987). La disminución en

los niveles plasmáticos de Ca estimula la glándula paratiroides para secretar paratohormona (PTH). lo que resulta en un incremento en la movilización de minerales del hueso (Wideman, 1987). Debido a que durante la resorción ósea se libera el Ca y el P con una relación de 2.5 a 1 y la relación de Ca a P en el cascarón es de 20 a 1 (Wideman, 1987), el P liberado en exceso se acumula en la sangre (Frost et al., 1991; Wideman, 1987). Esta acumulación de P en la sangre es atenuada por una estimulación en la excreción de P urinario por la PTH (Wideman, 1987). Simultáneamente, como resultado de la reducción en la tasa de filtración y/o como resultado de la acción sostenida de la PTH sobre los riñones, la excreción urinaria de Ca disminuye (Wideman, 1987).

Con base en la anterior revisión bibliográfica, se puede concluir que existe suficiente evidencia experimental que demuestra la existencia de ritmos circadianos en diferentes procesos relacionados con el metabolismo y la alimentación del Ca en aves de postura. El conocimiento de estos procesos podría dar nuevas luces en la comprensión de los diferentes problemas relacionados con la disfunción del metabolismo de este mineral y que conduce a la presentación de cascarones débiles con las consecuentes pérdidas de huevos debido a la mala calidad del cascarón. Todo lo anterior conlleva a señalar que **el momento del día en que se suministre el Ca a las aves en postura va a determinar su absorción y utilización como un reflejo de las demandas que presente el ave por este nutrimento, especialmente para la formación de cascarón.** Ya con anterioridad había sido postulado (Bootwalla et al., 1983) que los nutrimentos pueden ser usados más eficientemente, y por tanto mejorar el comportamiento de las aves, si estos pueden ser suministrados en el momento que se corresponda más estrechamente con su demanda por parte de los tejidos.

III HIPOTESIS

Las necesidades de Ca para la formación del cascarón son mayores durante la noche por lo que el suministro de este mineral en las horas nocturnas será más eficiente que el suministro durante las horas diurnas reduciendo la necesidad de recurrir al Ca óseo para la formación del cascarón.

IV OBJETIVOS

- * Determinar el patrón de deposición de Ca en cascarón en aves de postura durante el pico de producción bajo 4 niveles y 4 patrones de suministro de Ca.
- * Establecer la eficiencia en la utilización del Ca dietario en la formación del cascarón.
- * Estimar un patrón de suministro de Ca que incremente la eficiencia en la deposición de Ca en cascarón y reduzca la utilización de Ca óseo

V MATERIALES Y METODOS

LOCALIZACION.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en la granja comercial Los Alpes, perteneciente a la Empresa Rodrigo Arroyave Arango Suc. y la cual se encuentra localizada en el corregimiento de San Felix, Municipio de Bello, Departamento de Antioquia: municipio ubicado en la parte occidental de la cabecera municipal extendiéndose por la pendiente oriental de la Cuchilla de las Baldías, a 2100 m.s.n.m. y con una temperatura promedio de 16°C bajo una formación ecológica de Bosque Húmedo Montano Bajo (bh-MB) según la clasificación de Espinal (1992).

Durante la última semana del mes de septiembre de 1998 se ejecutaron las labores pertinentes a la preparación del área de la caseta destinada para este trabajo. Se instalaron cortinas de plástico negro que impidieran que se proyectara la luz proveniente de los bombillos hacia las demás aves que se encontraban en el galpón.

UNIDADES EXPERIMENTALES

Se emplearon 131 aves tipo Leghorn (Lohmann White) de 24 semanas de edad, seleccionadas a partir de un lote comercial ubicado en la misma granja las cuales fueron alojadas individualmente en jaulas de postura. Desde la semana 24 (primera semana de octubre) y hasta el pico de producción (semana 27), las aves se sometieron a una fase de adaptación a un programa de iluminación, tiempo

durante el cual se les suministró un alimento comercial con 3.8% de Ca. El programa modificado de iluminación intermitente que se utilizó en este experimento está basado en el trabajo de Banks y Koen, (1989) y consistió en el suministro de 16 h de luz y 8 h de oscuridad totales distribuidas de la siguiente manera:

- Horas de luz: de las 06:00 hasta las 19:00 h y de las 24:00 hasta las 01:00 h.
- Horas de oscuridad: de las 19:00 hasta las 24:00 y de las 01:00 hasta las 06:00 h.

La adaptación al periodo de iluminación entre las 18:00 y las 19:00 h y entre las 24:00 y 01:00 h se realizó con incrementos de 20 min cada cinco días a partir de un periodo inicial de 30 min hasta alcanzar el periodo total de 2 horas de luz en cuatro semanas.

Durante las tres primeras semanas del periodo de adaptación se descartaron seis aves por presentar problemas sanitarios y tres más por no haber iniciado postura. De las 122 aves restantes se seleccionaron 112 aves para la fase experimental las cuales se alojaron individualmente en jaulas de postura invertidas dotadas de comedero individual de aluminio con las siguientes dimensiones: 15 cm de largo; 10 cm de ancho, y 5 cm de profundidad.

Las 112 aves seleccionadas se distribuyeron al azar en uno de 13 tratamientos experimentales que consistieron en 12 tratamientos incluidos en un arreglo factorial 3 x 4, resultado de la combinación de tres niveles (N) de concentración de Ca en la dieta y cuatro momentos del día (P) para el suministro de estas dietas más un tratamiento control negativo (Cuadro 1). Para los 12 tratamientos del arreglo factorial se asignó seis aves por tratamiento (en la interacción N x P) en

Cuadro 1. Distribución de los tratamientos y cantidad total de Ca consumido por cada gallina al día.

TRATAMIENTO	06:00	12:00	18:00	24:00	Gr ave/día
N1 ¹ P1 ²	3.4	2.4	2.4	2.4	2.66
N1P2	2.4	3.4	2.4	2.4	2.66
N1P3	2.4	2.4	3.4	2.4	2.66
N1P4	2.4	2.4	2.4	3.4	2.66
N2P1	4.3	2.4	2.4	2.4	2.9
N2P2	2.4	4.3	2.4	2.4	2.9
N2P3	2.4	2.4	4.3	2.4	2.9
N2P4	2.4	2.4	2.4	4.3	2.9
N3P1	5.2	2.4	2.4	2.4	3.13
N3P2	2.4	5.2	2.4	2.4	3.13
N3P3	2.4	2.4	5.2	2.4	3.13
N3P4	2.4	2.4	2.4	5.2	3.13
TESTIGO	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4

¹ N = Nivel 1 = 3.4 %; 2 = 4.3 %; 4 = 5.2 % de Ca

² Periodo 1 = 06:00; 2 = 12:00; 3 = 18:00; 4 = 24:00 h

tanto que para el testigo negativo se asignó un total de 40 aves¹, esto con la finalidad de asegurar que el último día del experimento hubiera al menos 24 aves de este tratamiento en postura para obtener de estas el huevo en diferentes momentos del periodo de su formación. Durante la cuarta semana de la fase de adaptación se realizó la adaptación al programa de alimentación suministrando 25 g/ave/comida del alimento comercial en las horas indicadas en el Cuadro 1.

A partir de la quinta semana se dio inicio a la fase experimental con el suministro de las dietas experimentales. La composición de los tratamientos se presenta en el Cuadro 2.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS

El diseño experimental general fue de bloques completamente al azar en un arreglo factorial 3 x 4 más un tratamiento testigo negativo. El criterio de bloque fue la ubicación de las jaulas dentro de la caseta experimental (dos grupos de jaulas), y los factores a evaluar fueron tres dietas con niveles crecientes y equidistantes de concentración de Ca (3.4, 4.3 y 5.2% de Ca) y cuatro periodos dentro del día (06:00, 12:00, 18:00 y 24:00 h) para el suministro de las dietas experimentales (Cuadro 1).

El tratamiento control negativo consistió en el suministro de cuatro comidas con una concentración similar de 2.4% de Ca, suministradas en las mismas horas que los tratamientos incluidos en el arreglo factorial. El suministro de las dietas

¹ El tamaño de la muestra se estimó de acuerdo al procedimiento descrito por Montgomery, 1984.

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales

INGREDIENTES	Dieta Control	Dieta 3.4%	Dieta 4.3%	Dieta 5.2%
Maíz amarillo	51.74			
Pasta de soya	18.99			
Soya extruida	8.25			
T. de pescado	1.24			
DL – Metionina	0.13			
Sebo	3.34			
Sal (NaCl)	0.38			
Vitaminas	0.25			
Minerales	0.15			
Carbonato de calcio	5.49	7.63	9.79	11.93
Arena	1.21	2.01	2.79	3.58
Biofos	8.81	5.87	2.94	0.00
Análisis calculado				
EM kcal/kg MS	2.722			
PC %	16.62			
Lis %	0.87			
Met + Cis %	0.75			
Ca	2.42	3.37	4.31	5.25
P disp	0.39	0.56	0.72	0.88
Ca : P disp	6.19	6.02	5.94	5.90

experimentales se efectuó repartiendo la cantidad total del día (aproximadamente 100 g/ave/día) en cuatro porciones de cantidades iguales en las horas indicadas en el Cuadro 1.

Las dietas experimentales se suministraron únicamente durante los periodos correspondientes a cada tratamiento, mientras que en los otros tres periodos restantes se suministró una dieta basal baja en Ca (2.4% de Ca) (Cuadro 1). El alimento fue consumido en las primeras dos horas de cada periodo de tal manera que se evitó que se mezclaran las dietas correspondientes a periodos consecutivos

MEDICIONES

La fase experimental tuvo una duración de 22 días (a partir del 30 de octubre) de los cuales los tres primeros fueron de adaptación a las dietas experimentales. Diariamente se registró la producción individual de huevos. Los huevos se pesaron individualmente durante los días 2, 4 y desde el día 7 hasta el 17 de noviembre. Los huevos que se pesaron durante los días 2, 4, 9, 11, 15, 16 y 17 de noviembre se quebraron para retirar su contenido y lavar y retener los cascarones los cuales se secaron y se pesaron.

En estos huevos se realizaron las siguientes mediciones: masa de huevo, gravedad específica², peso del cascarón g de cascarón/g de huevo cm² de cascarón³ y porcentaje estimado de roturas. La concentración de Ca en cascarón

² Para calcular la gravedad específica del huevo se empleó la ecuación propuesta por Harms et al., (1990) y Sloan et al., (1990): $GEH = EW / (.968 \times (EW - SW) + (.4921 \times SW))$, donde GEH = gravedad específica del huevo; EW = peso del huevo, y SW = peso del cascarón.

se midió a partir una muestra de la mezcla de los cascarones de los huevos producidos durante los tres últimos días del periodo experimental por cada gallina, con la que se realizó las siguientes mediciones: g de Ca en cascarón (Abdallah et al., 1993), g de Ca en cascarón/g de cascarón, mg de Ca en cascarón/cm² de cascarón (SWUSA)⁴, porcentaje de utilización del Ca para la formación del cascarón⁵ y porcentaje de Ca en el cascarón.

El último día del experimento, a las 6, 12 y 18 hPOVP, se sacrificaron por dislocación cervical seis aves del tratamiento de 2.4 % de Ca a las que se les extrajo el huevo en formación y en los que se midió el peso del cascarón, la cantidad de Ca depositado en cascarón, g de Ca en cascarón/g de cascarón, y a partir de los cuales se estimó la tasa de deposición de Ca en el cascarón. En las seis aves pertenecientes al último periodo, los huevos se obtuvieron por ovoposición en los que se midió, además, las otras variables medidas durante las tres semanas experimentales. Así mismo, al finalizar el experimento, las seis aves de cada tratamiento incluidos en el arreglo factorial fueron sangradas por punción cardíaca (4 ml/ave) (Ruschkowski et al., 1993), a las 12 HOPV. El plasma fue separado por decantación luego de dejar reposar las muestras de sangre durante doce horas a temperatura ambiente. El plasma fue congelado a -20°C para la determinación de la concentración de P inorgánico.

³ Para calcular el área del cascarón se empleó la ecuación propuesta por Carter (1975): $Area = 3.9782W^{0.7066}$, donde W es el peso del huevo.

⁴ Para calcular la relación entre el peso y el área del cascarón se empleó la ecuación descrita por Abdallah et al., (1993): $SWUSA = 17.31 + 1.061EW - 12.99Area$

⁵ Para estimar el porcentaje de utilización del Ca se empleó la ecuación propuesta por Abdallah et al., (1993) $EFIC = (Ca \text{ en cascarón} / Ca \text{ consumido}) \times 100$

Se presentaron algunas dificultades en la toma de muestras de sangre en algunos animales lo que impidió que se pudiera recolectar suficiente sangre para su análisis. Esto llevo a la pérdida de varias muestras

Otro aspecto importante de resaltar fue la distribución de la postura durante el día con una alta concentración durante las horas de la mañana (antes de las 12:00 h.), con más del 95% de la postura total del día. con relación a las horas de la tarde. Esto impidió obtener un número suficiente de muestras para comparar la calidad de los cascarones de los huevos puestos antes y después del medio día.

ANALISIS QUIMICOS

Ca en cascarón. Se determinó por espectrofotometria de absorción atómica según la técnica descrita por la AOAC (1990).

P inorgánico en plasma. Se determinó por medio del procedimiento colorimétrico descrito por SIGMA (1995).

ANALISIS ESTADISTICO

Las variables de respuesta medidas en los huevos y cascarones recolectados durante las tres semanas experimentales y de las muestras de sangre obtenidas el último día del experimento, se analizaron mediante el programa estadístico SAS (SAS, 1987) de acuerdo a un diseño de bloques completamente al azar en un arreglo factorial bajo el siguiente modelo:

$$Y_{hijk} = \mu + B_h + \delta + N_i + T_j + NT_{ij} + e_{hijk}$$

$$h = 1, 2; i = 1, 2, 3; j = 1, 2, 3, 4; k = 1, 2, 3$$

donde Y_{hijk} es la observación individual, μ es la media experimental; B_h es el efecto del bloque; δ es el término de error para el bloque; N_i es el efecto del nivel de Ca; T_j es el efecto del periodo del suministro de las dietas experimentales; NT_{ij} es la interacción del nivel de Ca por el periodo de suministro de las dietas experimentales, y e_{hijk} es el término de error usado para evaluar los efectos principales y las interacciones.

Para los parámetros Porcentaje de Postura y Peso del huevo, se empleó el Porcentaje de Postura Inicial y el Peso del Huevo Inicial, como covariables, respectivamente de acuerdo al siguiente modelo.

$$Y_{hijk} = \mu + B_h + \delta + N_i + T_j + NT_{ij} + \beta(X_{ij} - X) + e_{hijk}$$

$$h = 1, 2; i = 1, 2, 3; j = 1, 2, 3, 4; k = 1, 2, 3$$

donde Y_{hijk} es la observación individual; μ es la media experimental; B_h es el efecto del bloque; δ es el término de error para el bloque; N_i es el efecto del nivel de Ca; T_j es el efecto del periodo del suministro de las dietas experimentales; NT_{ij} es la interacción del nivel de Ca por el periodo de suministro de las dietas experimentales; $\beta(X_{ij} - X)$ es la covariable; y e_{hijk} es el término de error usado para evaluar los efectos principales y las interacciones.

El porcentaje de postura se analizó como una variable transformada: la raíz cuadrada del porcentaje de no postura (Steel y Torrie, 1960)

Las variables de respuesta medidas en los huevos extraídos a las aves pertenecientes al tratamiento de 2.4% de Ca y que se sacrificaron cada seis horas el último día del experimento, se analizaron mediante el programa estadístico SAS

(SAS, 1987) de acuerdo a un diseño de bloques completamente al azar bajo el siguiente modelo:

$$Y_{nij} = \mu + B_h + \delta + T_j + e_{nij}$$

$$h = 1, 2; i = 1, 2, 3, 4; j = 1, 2, \dots, 6$$

donde Y_{nij} es la observación individual; μ es la media experimental; B_h es el efecto del bloque; δ es el término de error para el bloque; T_j es el efecto del periodo (hPOV) en el que se sacrifican las gallinas; y e_{nij} es el término de error usado para evaluar el efecto del periodo.

Se calcularon ecuaciones de regresión para la deposición de Ca en el cascarón y el incremento en el peso del cascarón para el tratamiento control negativo y, a partir de estos datos, se estimó la tasa de deposición de Ca en el cascarón en los tratamientos incluidos en el arreglo factorial.

Se aceptó las diferencias entre tratamientos cuando $P < 0.05$.

VI RESULTADOS Y DISCUSION.

No se evidenció ningún efecto de los tratamientos sobre los parámetros productivos evaluados dentro del arreglo factorial (Cuadro 3) y cuyos promedios se encuentran dentro de los valores esperados para esta línea y para la edad en la cual se realizó el experimento (Lohmann, 1998). Resultados similares son citados por Frost y Roland (1991) quienes evaluaron tres niveles de Ca (2.75, 3.75 y 4.75%) y tres niveles de P (0.30, 0.40 y 0.50%) en la dieta en aves Dekalb XL durante seis semanas en el pico de producción.

Esto era de esperarse si se tiene en cuenta que a las aves entre los diferentes tratamientos se les suministró una misma cantidad de alimento (100 g/ave/día) similar en su composición nutricional y energética siendo diferentes únicamente en su contenido de Ca y P (ver Cuadro 1). De esta manera, desde el punto de vista nutricional se dieron las condiciones para esperar respuestas similares en los parámetros productivos evaluados.

La postura se concentró en las horas de la mañana de manera que cerca del 60% de los huevos puestos durante el día se hizo entre las 08:30 y las 10:30 h y más del 80% fueron puestos antes de las 12:00 h (Gráfica 1). A partir de estos datos y, asumiendo que la ovulación se presenta alrededor de una hora posovoposición y que unas cinco horas más tarde se da inicio a la formación del cascarón (Sturkie, 1967; North, 1991; Etches, 1987), se estimó el porcentaje de aves en postura que estuvieran en la fase de formación del cascarón y cuyos resultados se presentan en la Gráfica 2. Como se puede apreciar, a partir de las 06:00 h se

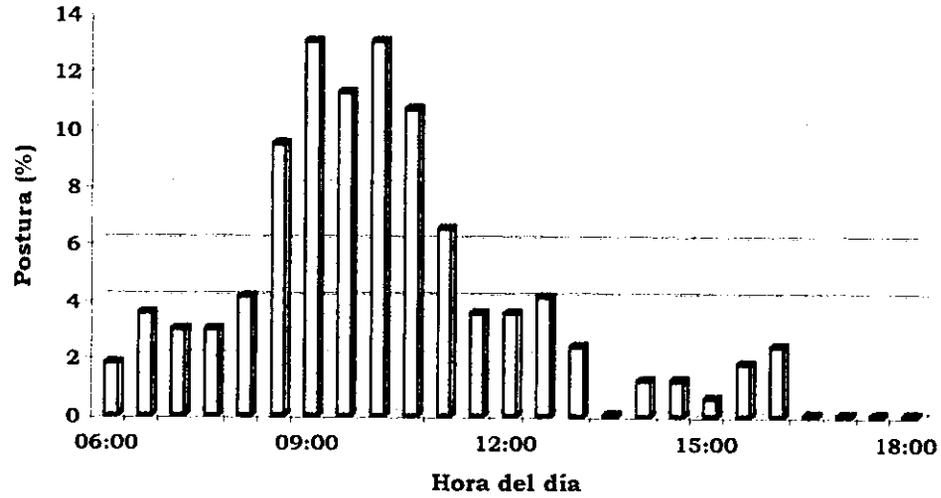
Cuadro 3. Efecto del nivel de Ca en la dieta y momento de suministro sobre algunos parámetros productivos

Tratamientos		Producción (%)	Peso huevo (g)	Masa (g)	Cambio de peso (g)
Nivel ¹	Periodo ²				
1	1	91.18	58.32	53.39	11.42
1	2	93.14	58.16	53.97	35.57
1	3	93.14	59.56	55.60	-3.57
1	4	96.72	58.19	54.95	-3.57
2	1	92.75	59.21	54.95	6.42
2	2	96.38	59.51	56.78	23.57
2	3	92.46	58.28	55.42	-44.04
2	4	94.42	58.88	54.82	0.00
3	1	93.64	59.64	56.42	41.42
3	2	93.48	59.71	54.22	48.57
3	3	94.82	59.14	58.25	6.42
3	4	92.50	59.27	54.11	86.42
Prom		93.72	58.99	55.24	18.81
EEM		5.169	2.426	4.421	71.57
R ²		0.485	0.575	0.190	0.188

¹ Nivel 1 = 3.4 %; 2 = 4.3 %; 4 = 5.2 % de Ca

² Periodo 1 = 06:00; 2 = 12:00; 3 = 18:00; 4 = 24:00 h

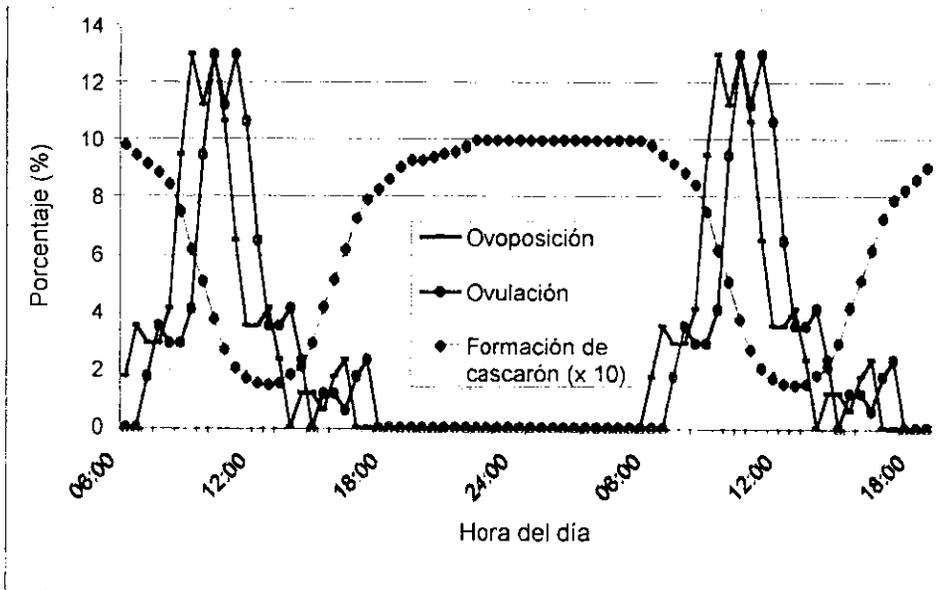
Gráfica 1. Distribución de la postura a lo largo del día.



presentó una disminución en el porcentaje de aves en formación de cascarón hasta cerca de la 13:00 h. momento a partir del cual se da inicio a un incremento paulatino en el número de aves en formación de cascarón hasta alcanzar el máximo cerca de las 22:00 h. De esta manera, desde las 22:00 h y hasta las 06:00 h del día siguiente toda la población de aves que se encontraba en postura estaría en proceso de formación de cascarón siendo este el periodo del día en el que mayor demanda por Ca se presentó para la población de aves en este experimento. Esto reitera nuevamente la necesidad de replantear la cantidad y el momento oportunos para el suministro del Ca a las aves en postura, factores que estarán determinados por el momento del día en el cual las aves concentren la formación del cascarón. Esta ampliamente aceptado que es durante las horas de la noche que las aves presentan el ritmo más intenso de formación del cascarón lo cual es corroborado en este trabajo con la información presentada en la Gráfica 2.

Aunque se podría esperar que los tratamientos incluidos dentro del arreglo factorial afectaran la formación del cascarón dado que estos se plantearon con la finalidad de suministrar cantidades diferentes de Ca en momentos diferentes del día, estos no tuvieron ningún efecto sobre los parámetros de calidad de cascarón evaluados en este experimento (Cuadro 4) los cuales, además, fueron ligeramente más altos que los citados por Uosterhout (1980), Keshavarz (1998a) y Keshavarz (1998b) pero muy similares a los reportados por Frost y Roland (1991) no obstante que la cantidad de Ca total consumida en el día por cada ave fue mucho menor en este experimento que en los de estos autores. Esto estaría indicando que de alguna manera en las aves, se establece un mecanismo

Gráfica 2. Porcentaje de ovoposición, de ovulaciones y de aves en formación de cascarón (porcentaje acumulado) en función de la hora del día.



Cuadro 4. Efecto del nivel de Ca en la dieta y momento de suministro sobre algunos parámetros de calidad del cascarón

Tratamientos		Peso del cascarón (g)	Porcentaje de Cascarón (%)	Area de cascarón (cm ²)	Gravedad específica	Porcentaje de roturas (%)
Nivel ¹	Periodo ²					
1	1	5.32	9.14	70.47	1.08121	10.57
1	2	5.57	9.47	69.99	1.08408	6.71
1	3	5.67	9.62	71.26	1.08364	6.99
1	4	5.33	9.59	68.92	1.08291	8.51
2	1	5.42	9.54	70.64	1.08195	9.4
2	2	5.63	9.32	70.43	1.08416	6.46
2	3	5.70	9.47	71.11	1.08402	6.38
2	4	5.60	9.36	69.97	1.08448	6.21
3	1	5.58	9.31	71.20	1.08298	8.11
3	2	5.53	9.19	70.20	1.08353	7.44
3	3	5.72	9.70	72.65	1.08267	8.12
3	4	5.57	9.31	70.71	1.08332	4.25
Prom		5.55	9.42	70.63	1.08325	0.105
EEM		0.44	0.55	2.094	0.00309	
R ²		0.108	0.105	0.106	0.104	

¹ Nivel 1 = 3.4 %; 2 = 4.3 %; 4 = 5.2 % de Ca

² Periodo 1 = 06:00; 2 = 12:00; 3 = 18:00; 4 = 24:00 h

homeostático que permite formar cascarones de calidad similar a pesar de haber un bajo suministro de este mineral en la ración. Este mecanismo necesariamente debe involucrar la movilización de Ca desde la médula ósea ya que la función de este tejido es servir como reservorio para este mineral (Sturkie, 1967). De esta manera es posible argumentar que se presentaron diferentes grados de movilización de Ca desde la médula ósea que permitieron compensar los diferentes niveles de consumo de Ca desde la dieta y diferentes eficiencias en la utilización del Ca dietario para la formación del cascarón en función del nivel de suministro de este mineral y el momento en que este fue suministrado. Así, cuando el nivel de Ca suministrado en la ración fue bajo (tratamientos con 3.4% de Ca con un consumo total en el día de 2.66 g/ave) y suministrado en momentos del día en los que la demanda por este mineral para la formación del cascarón era baja (06:00 a 14:00 h) se debió movilizar más Ca desde la médula ósea para compensar una menor disponibilidad de Ca para formar el cascarón en las horas de mayor demanda (22:00 a las 06:00 h) con lo cual la cantidad de Ca depositada en el cascarón fue similar en los diferentes tratamientos pero con diferentes proporciones de Ca óseo y de Ca dietario. Al respecto, Farmer et al., (1986a) empleando ⁴⁵Ca encontraron que la utilización del Ca proveniente de la médula ósea para la formación del cascarón varió entre el 30 y 96% en función de la concentración de Ca en la ración de tal manera que a mayor concentración de Ca en la ración, menor fue la contribución del Ca óseo para la formación del cascarón. Así mismo, estos autores encontraron que a medida que la proporción de Ca dietario en el cascarón se incrementó, se mejoró la calidad del cascarón medida en términos del peso del cascarón. Esto refuerza el concepto de que si se logra

mejorar la utilización del Ca dietario, se podrá mejorar la eficiencia en su utilización para la formación del cascarón y esto es factible de lograrlo cuando se puede sincronizar el suministro de este mineral con la demanda como lo demuestran los resultados de Farmer et al., (1986b) quienes estudiaron el efecto del momento del día en que se suministra el Ca a aves en postura sobre su utilización en la formación del cascarón empleando ^{45}Ca . El ^{45}Ca se suministró por intubación esofágica a las 08:00 h (AM) o a las 16:00 h (PM). Los resultados indican que las aves que recibieron el suministro de Ca diario en las horas PM depositaron significativamente más Ca dietario del día sobre el cascarón del huevo puesto al día siguiente que en el caso de las aves que se alimentaron con Ca en las horas AM. Además, las aves que recibieron el tratamiento en las horas AM excretaron más Ca que las aves tratadas en las horas PM durante las primeras 24 horas.

Al no evidenciarse efectos estadísticamente significativos de los tratamientos incluidos en el arreglo factorial sobre el porcentaje de Ca en el cascarón y los gramos de Ca depositados en el cascarón (Cuadro 5), y dado que el consumo de Ca fue diferente entre los tratamientos (Cuadro 2), se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia en la utilización del Ca dietario para la formación del cascarón en función del Ca suministrado (Cuadro 6) y cuya relación es explicada por la ecuación de regresión presentada en la Gráfica 3: a medida que se incrementa el consumo de Ca se reduce la eficiencia en su utilización para la formación del cascarón.

Los diferentes grados de movilización de Ca óseo que permitieron obtener un valor similar de calidad de cascarón entre los tratamientos incluidos en el arreglo

Cuadro 5. Efecto del nivel de calcio en la dieta y momento de suministro sobre la utilización del calcio en la formación del cascarón

Tratamientos		Porcentaje de Ca en cascarón (%)	Gramos de Ca en Cascarón (g)	SWUSA (mg/cm ²)
Nivel ¹	Periodo ²			
1	1	37.53	1.99	75.50
1	2	37.31	2.07	79.59
1	3	37.44	2.12	79.54
1	4	37.47	1.99	77.33
1	4	37.98	2.06	76.72
2	1	37.44	2.10	79.93
2	2	37.43	2.13	80.08
2	3	37.45	2.10	80.15
2	4	37.31	2.08	78.45
2	4	37.46	2.07	78.86
3	1	37.43	2.14	78.70
3	2	37.79	2.08	78.74
3	3	37.47	2.08	78.63
3	4	0.493	0.16	4.71
3	4	0.117	0.100	0.106
Prom				
EEM				
R ²				

¹ Nivel 1 = 3.4 %; 2 = 4.3 %; 4 = 5.2 % de Ca

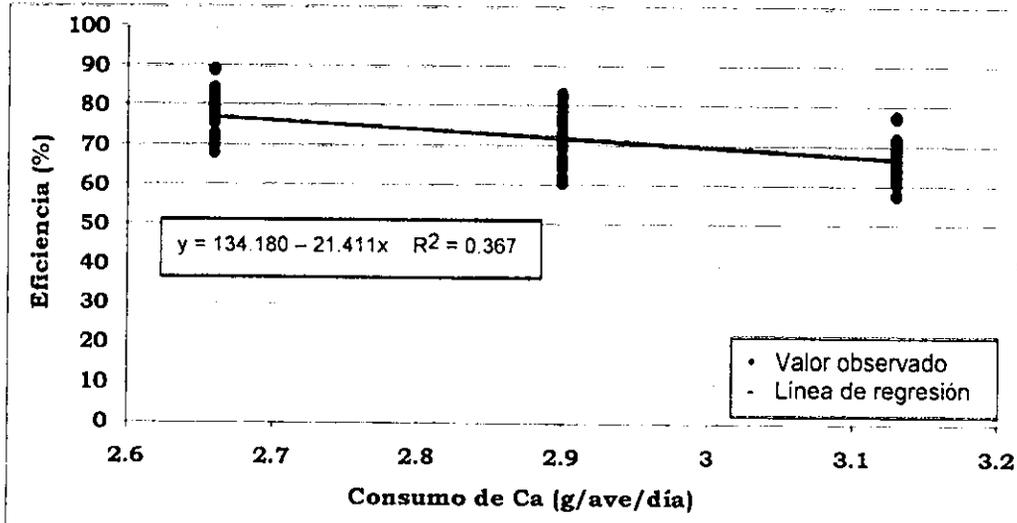
² Periodo 1 = 06:00; 2 = 12:00; 3 = 18:00; 4 = 24:00 h

Cuadro 6 Eficiencia en el uso del calcio dietario para la formación del cascarón de acuerdo al nivel de calcio en la dieta

Nivel ¹	Eficiencia (%)
1	77.03
2	72.47
3	66.96
Prom	72.16
EEM	5.68
R ²	0.424

¹ Nivel 1 = 3.4 %; 2 = 4.3 %; 4 = 5.2 % de Ca

Gráfica 3 Ecuación de regresión para la eficiencia en la utilización del Ca dietario en la formación del cascarron en función de la cantidad de Ca consumido.



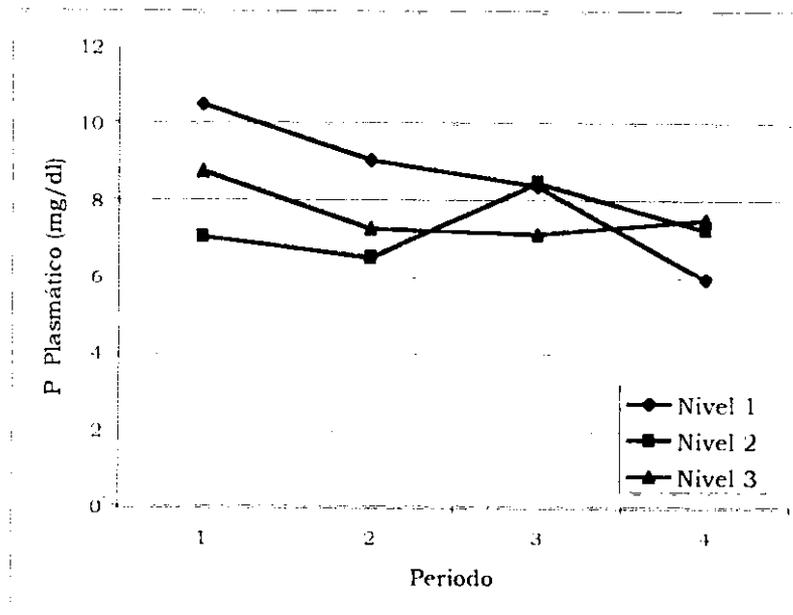
factorial se reflejan en la concentración de P plasmático medido a las 12 hPOV (Gráfica 4).

La concentración de P inorgánico en el plasma es ampliamente aceptado como un buen indicador de la movilización del Ca óseo (Gunaratne y Boorman. 1996; Sturkie. 1967; Frost et al., 1991) de tal manera que si la calidad del cascarón entre los tratamientos fue similar, no obstante las diferencias en el aporte de Ca y en el momento en que este fue suministrado, pero la concentración de P en plasma fue diferente, esto indicaría que se liberó Ca desde la médula ósea en niveles diferentes entre los tratamientos con la finalidad de asegurar una concentración adecuada de Ca en el cascarón, como se argumentó anteriormente

Esto sin embargo, no indica que niveles bajos de Ca en la dieta conduzcan a altos niveles de liberación de Ca desde la médula ósea con la finalidad de compensar la demanda para formación del cascarón con el aporte desde la dieta. La respuesta al suministro de Ca fue evidentemente diferente de acuerdo al momento del día en que este fue suministrado. Esto se vio reflejado en la interacción que para la concentración de P en plasma se observó entre el nivel de Ca y el momento en que este fue suministrado y que se aprecia en la Gráfica 4.

Cuando se suministro el Ca a las 06:00 h. éste no fue utilizado eficientemente en la formación del cascarón dado que los requerimientos por Ca no son altos en este momento del día. Si a esto se añade un suministro bajo de Ca (3.4 %) es de esperarse que para este tratamiento sea necesario movilizar mayor cantidad de Ca desde los huesos que en el caso del tratamiento con 4.3 % de Ca. Esto es, la dieta de 3.4 % de Ca suministrado a las 6:00 a.m. es una dieta deficiente en este mineral lo que se refleja en una mayor concentración de P plasmático. Sin

Gráfica 4 Interacción entre el nivel y el periodo de suministro de Ca sobre la concentración de fósforo plasmático



embargo, cuando esta misma dieta se suministra a las 24:00 h. momento en el cual existe una alta demanda por este mineral para la formación del cascarón (ver Gráfica 2) se obtiene la mejor respuesta en cuanto a la concentración de P plasmático, es decir hay una menor liberación de Ca desde huesos y, por ende, mejor utilización de Ca de la dieta para formar el cascarón.

La dieta con 5.2% de Ca que fue suministrada a las 06:00 h es una dieta que presenta una respuesta similar a la dieta con 3.4% a la misma hora de suministro, es decir, un nivel de concentración alto de P en plasma que indicaría alta movilización de Ca óseo. La explicación en este caso es diferente. Niveles altos de Ca en la dieta pueden saturar el sistema lo que se vendría a reflejar en una baja utilización del Ca de la dieta ya sea por que este no es absorbido eficientemente o este no es fijado en huesos y es perdido desde el sistema. Al suceder esto durante las horas de la mañana, en las que las demandas por Ca para la formación del cascarón no son altas, da como respuesta un bajo nivel de Ca en el sistema durante las horas de la tarde y la noche para la formación del cascarón. Esto resulta en la movilización de cantidades adicionales de Ca desde huesos y, por tanto de P el cual incrementa su concentración en el plasma. Un efecto similar fue citado por Clunies y Leeson (1995), Bar y Hurlwitz (1987) en aves de postura y por Elliot et al., (1995) en pollos de engorde.

En la Gráfica 4 se observa que hubo una tendencia a mejorar el empleo del Ca dietario a medida que este es suministrado hacia las horas de la tarde y de la noche ($P < 0.02$) que se ve reflejada en una menor concentración de P en plasma. Esto era de esperarse sobre la base de la hipótesis planteada para este trabajo de investigación. Hay una mejor utilización del Ca dietario para la formación de

cascarón en la medida en que este se suministre en el momento del día en que hay mayores demandas, esto es, las horas de la tarde y la noche. De esta manera, si el Ca se suministra a la hora adecuada, se reduce la necesidad de movilizar el Ca óseo para obtener un cascarón de buena calidad, lo que se ve reflejado en la disminución de la concentración del P plasmático.

De acuerdo con estos resultados y como se muestra en la Gráfica 4, la dieta de 3.4 % que es suministrada a las 24:00 h. es la que mejor respuesta presentó, aún por encima de las dietas con 4.3 y 5.2% de Ca. Esto último permite señalar que el nivel de Ca no es un parámetro suficiente y que es necesario acompañarlo del momento adecuado en que debe ser suministrado para obtener una calidad adecuada de cascarón con baja movilización de Ca óseo y buena utilización de Ca dietario.

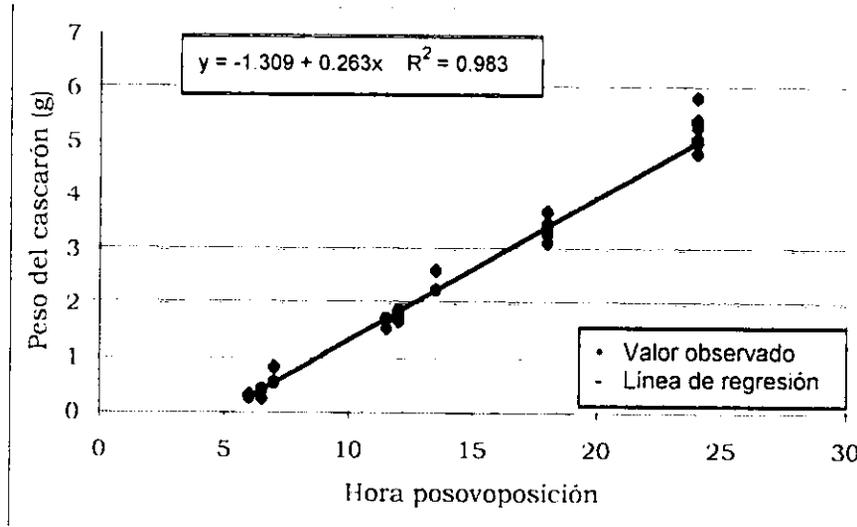
Con la finalidad de estimar la tasa de deposición de Ca en el cascarón, con el tratamiento testigo negativo se estableció la variación en el peso de los cascarones en formación y las tasas parciales de deposición de Ca en el cascarón durante la formación de los huevos al obtener muestras de huevos en formación de aves sacrificadas a las 6, 12 y 18 hPOV y de los huevos obtenidos por ovoposición. En el Cuadro 7 se presentan las ecuaciones de regresión que explican la relación entre estas variables de respuesta y la hora de formación de los huevos. Las Gráficas 5 y 6 muestran Gráficamente estas relaciones.

Durante las primeras seis hPOV la cantidad de Ca depositado en el cascarón representó menos del 4% del Ca total depositado lo que concuerda con el retraso en el inicio de la deposición de Ca en las primeras seis hPOV reportado por Sturkie (1967) y North (1991). A partir de ese momento y hasta el final de la

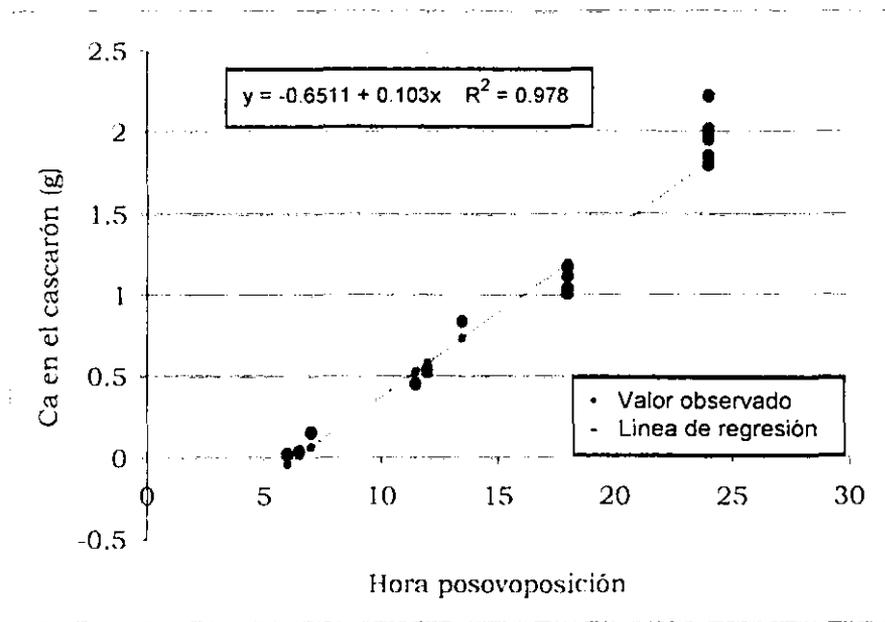
Cuadro 7. Ecuaciones de regresión para las características del cascarón en formación en las aves del tratamiento control negativo

Variable	Peso del cascarón (g)	Gramos de Ca (g)
Intercepto	-1.309	-0.651
Hora	0.263	0.103
EEM	0.262	0.118
R ²	0.983	0.978

Gráfica 5. Ecuación de regresión para el peso del cascarón en función de las horas posovoposición.



Gráfica 6. Ecuación de regresión para el Ca depositado en el cascarón en función del periodo de formación.



formación del huevo. la tasa de deposición de Ca en el cascarón fue constante la cual se encontró dentro del rango señalado por Sturkie (1967) y Etches. (1987): 100 a 150 mg/h. A diferencia de esta tendencia. Clunies y Leeson (1995) encontraron que la tasa de deposición de Ca en el cascarón fue mayor entre las 12 y 18 hPOV y que esta posteriormente declinó.

La tasa de deposición de Ca en el cascarón promedio hallada en este experimento (103 mg/h) representó cerca del 39% de la tasa de incremento en el peso del cascarón (263 mg/h), que es aproximadamente la concentración del Ca en el carbonato de Ca. Esto fue debido a que el incremento en el peso del cascarón se debe fundamentalmente a la deposición de carbonato de Ca (Parsons. 1982) Por esta misma razón se explica la alta correlación entre el incremento en el peso del cascarón y la tasa de deposición de Ca en el cascarón ($r = .996$; $P < .01$). El valor promedio en la tasa de incremento en el peso del cascarón fue más bajo que el reportado por Farmer et al., (1986a) de 290 mg/h debido, probablemente a que el suministro de Ca fue mayor y el peso de los huevos fue menor en este experimento que en el presentado aquí por los autores (55.1 vs. 58.99 g, respectivamente).

A partir de los datos de la tasa de deposición de Ca en el cascarón en el tratamiento testigo negativo y asumiendo que la cantidad de Ca depositado en el cascarón durante las primeras seis hPOV fue muy bajo y similar (0.063 g) entre los diferentes tratamientos, se estimó la tasa de deposición de Ca en el cascarón en los tratamientos incluidos en el factorial y cuyos resultados se presentan en el Cuadro 8. El análisis estadístico indica que no hubo diferencias entre los tratamientos para esta variable cuyos promedios se encuentran entre el rango

Cuadro 8. Tasa de deposición de Ca en el cascarron en los tratamientos incluidos en el arreglo factorial

Tratamientos		Deposición de Ca (g/h)
Nivel ¹	Periodo ²	
1	1	0.1027
1	2	0.1077
1	3	0.1097
1	4	0.1030
2	1	0.1050
2	1	0.1088
2	2	0.1105
2	3	0.1083
2	4	0.1078
2	4	0.1072
3	1	0.1108
3	2	0.1075
3	3	0.1074
3	3	0.0088
3	4	0.0195
Prom		
EEM		
R ²		

¹ Nivel 1 = 3.4 %; 2 = 4.3 %; 4 = 5.2 % de Ca

² Periodo 1 = 06:00; 2 = 12:00; 3 = 18:00; 4 = 24:00 h

VII CONCLUSIONES

Los resultados hallados en este experimento lograron demostrar que la hipótesis planteada en un principio fue correcta y que, dado que las necesidades de Ca para la formación del cascarón son mayores durante las horas de la noche, la utilización del Ca óseo fue menor con el regimen nocturno de suministro de este mineral. Esto se puede observar en el efecto altamente significativo ($P < 0.026$) para la interacción entre el nivel y el periodo de suministro del Ca obtenido para la concentración de P plasmático. Bajo las condiciones en las que se realizó este experimento y con el tamaño de muestra usado, la variable P plasmático fue muy eficiente para medir el efecto de los tratamientos a diferencia de las variables productivas y de calidad de cascarón analizadas. De esta manera fue posible establecer que, para las condiciones en las que se realizó este experimento, el momento óptimo del día para suministrar el Ca dirigido hacia la formación del cascarón fue las 24:00 h y que la concentración óptima fue de 3.4% de Ca. En resumen, el suministro de tres comidas de 25 g/ave con una concentración de 2.4% a las 06:00, 12:00 y 18:00 h y 25 g/ave de una comida con 3.4% de Ca a las 24:00 h (para un consumo total de Ca de 2.66 g/ave/día) fue el mejor tratamiento en términos de la calidad del cascarón, la movilización del Ca óseo y la eficiencia en el uso del Ca para la formación del cascarón.

REFERENCIAS

- Abdallah A. G., R. H. Harms, and O. El-Husseiny. 1993. Various methods of measuring shell quality in relation to percentage of cracked eggs. *Poult. Sci.* 72: 2038-2043.
- Abdallah, A. G., R. H. Harms, and O. El-Husseiny. 1995. Performance of hens laying eggs with heavy or light shell weigh when fed diets with different calcium and phosphorus levels. *Poult. Sci.* 72:1881-1891
- AL-Batshan H. A.; Scheideler S. E., Black B. L.; Garlich J. D.; Anderson K. E. Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. *Poult. Sci.* 1994; 73: 1590.
- Association OF Official Analytical Chemist, 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington, DC.
- Banks, P. A., and T. B. Koen. 1989. Intermittent lighting regimens for laying hens. *Poult. Sci.* 68: 739-743.
- Bar, A., and S. Hurwitz. 1987. Vitamin D metabolism and calbindin (calcium-binding protein) in aged laying hens. *J. Nutr.* 117: 1775-1779.
- De Blas, C. 1988. *Manejo y alimentación de la gallina ponedora*. Ed. Acribia, Zaragoza
- Bloom, M. A., L. V. Doom, A. V. Nalbandov, and W. Bloom. 1958. Medullary bone of laying chickens. *Am. J. Anat.* 102: 411-453. Citados por:
- Wideman, JR., R. F. 1987. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *J. Nutr.* 117: 808-815.
- Bootwalla, S. M., H. R. Wilson, and R. H. Harms. 1983. Performance of broiler breeders on different feeding systems. *Poult. Sci.* 62: 2321-2325.
- Brady, J. 1979. *Biological clocks*. Studies in Biology, No. 104. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
- Bronner, F. 1987. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J. Nutr.* 117: 1347- 1352.
- Carnarius, K. M., K. M. Conrad, M. G. Mast, and J. H. McNeil. 1991. Relationship of eggshell structure and shell strength to the soundness of shell eggs. *Poult. Sci.* 75: 656-663.
- Carter, T. C. 1975. The hen's egg: estimation of shell superficial area and egg volume, using measurements of fresh egg weight and shell length and breadth alone or in combination. *Br. Poult. Sci.* 16:541-543.

- Chan, C. C., and E. T. Moran, JR. 1985. Egg characteristics of high performance hens at the end of lay when given cafeteria access to energy, protein, and calcium. *Poult. Sci.* 64: 1696-1712.
- Church, D. C., y W. G. Pond. 1977. Bases científicas para la nutrición y la alimentación de los animales domésticos. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Clunies, M. and S. Leeson. 1994. Calcium dynamics of hens laying thick- or thin-shelled eggs. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 541-546.
- Clunies, M. and Leeson, S. Effect of dietary calcium level on plasma proteins and calcium flux occurring during a 24 h ovulatory cycle. *Can. Jour. Anim. Sci.* 1995; 75 (3) 439.
- Clunies, M., D. Parks, and S. Leeson. 1992a. Calcium and phosphorus metabolism and eggshell formation of hens fed different amounts of calcium. *Poult. Sci.* 71: 482-489.
- Clunies, M., D. Parks, and S. Leeson. 1992b. Calcium and phosphorus metabolism and eggshell thickness in laying hens producing thick or thin shells. *Poult. Sci.* 71: 490-498.
- Dunn, M. A., S. L. Too, and A. S. Ishizaki. 1995. Characterization of a novel protein in chick intestine that exhibits calcium-binding activity and regulation by dietary calcium, aluminium, and vitamin D. *J. Nutr.* 125: 2916-1924.
- Elaroussi, M., L. R. Forte, S. L. Eber, and H. V. Biellier. 1994. Calcium homeostasis in the laying hen. 1. Age and dietary calcium effects. *Poult. Sci.* 73: 1581-1589.
- Elliot, M. A., K. D. Roberson, G. N. Rowland, III, and H. M. Edwards, Jr. 1995. Effects of dietary calcium and 1,25-Dihydroxycholecalciferol on development of tibial dyschondroplasia in broilers during the starter and grower periods. *Poult. Sci.* 74: 1495-1505.
- Espinal, L. S. Geografía ecológica de Antioquia. Zonas de vida. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 146 p.
- Etches R. J. Calcium logistic in the laying hen. *Jour. Nutr.* 1987; 117 (3) 619.
- Farmer, M., D. A. Roland, and A. J. Clark. 1986a. Influence of dietary calcium on bone calcium utilization. *Poult. Sci.* 65:337-344.
- Farmer, M., D. A. Roland, SR., and A. J. Clark. 1986b. Influence of time of calcium intake on bone and dietary calcium utilization. *Poult. Sci.* 65: 555-558.
- Fernández, J. A. 1995a. Calcium and phosphorus metabolism in growing pigs. I. Absorption and balance studies. *Liv. Prod. Sci.* 41: 233-341.

- Fernández, J. A. 1995b. Calcium and phosphorus metabolism in growing pigs. II. Simultaneous radio-calcium and radio-phosphorus kinetics. *Liv. Prodc. Sci.* 41: 243-254.
- Frost, T. J., A. Roland, SR., and D. N. Marpie. 1991. The effects of various dietary phosphorus levels on the circadian patterns of plasma 1,25-dihydroxycholecalciferol, total calcium, ionized calcium, and phosphorus in laying hens. *Poult. Sci.* 70:1564-1570.
- Frost, T. J., A. Roland, SR., D. G. Barnes, and S. M. Laurent. 1992. The effect of sodium zeolite A and cholecalciferol on plasma levels of 1,25-dihydroxycholecalciferol, calcium, and phosphorus in commercial Leghorns. *Poult. Sci.* 71: 886-893.
- Fussel, M. H. 1960. Studies on calcium and phosphorus metabolism in hen with particular reference to absorption and excretion. Ph. D. dissertation. Cambridge University, Cambridge, England. Citado por:
- Wideman, JR., R. F. 1987. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *J. Nutr.* 117: 808-815
- Gunaratne, S. P., and K. N. Boorman. 1996. Egg-shell deposition and blood plasma inorganic phosphorus concentration in individual laying hens. *Br. Poult. Sci.* 37: 213-222.
- Halberg, F. 1989. Some aspects of the chronobiology of nutrition: More work is needed on "when to eat". *J. Nutr.* 119: 333-343.
- Harms, R. H., A. F. Rossi, D. R. Sloan, R. D. Miles, and R. B. Christmas. 1990. A method for estimating shell weight and correcting specific gravity for egg weight in eggshell quality studies. *Poult. Sci.* 69:48-52.
- Hurwitz, S. 1987. Effect of nutrition on egg quality. In: R. G. Wells and C. G. Belyavin. Egg quality current problems and recent advances. Chapter 15. *Poult. Sci. Symp.* No. 20. Butterworths, England.
- Hy-Line Internacional. Guía de manejo. Pollitas, Pollonas, Ponedoras Variedad W-36. West Des Moines Iowa U.S.A. 1996.
- Illus, A. W., and N. S. Jessop. 1996. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. *J. Anim. Sci.* 74: 3052-3062
- Johnson, B. C. 1992. Nutrient intake as a time signal for circadian rhythm. *J. Nutr.* 122: 1753-1759.

- Keshavarz, K. 1998a. Investigation on the possibility of reducing protein, phosphorus, and calcium requirements of laying hens by manipulation of time of access to these nutrients. *Poult. Sci.* 77: 1320-1332
- Keshavarz, K. 1998b. Further investigations on the effect of dietary manipulation of protein, phosphorus, and calcium for reducing their daily requirement for laying hens. *Poult. Sci.* 77: 1333-1346.
- Mercer, L. P., H. Hajjazi, and M. Hidvégi. 1993. Weanling rats display bioperiodicity of growth and food intake rates. *J. Nutr.* 123: 1356-1362
- Montgomery, D. C. 1984. *Design and Analysis Experiments*. 2th Ed. Jhon Wiley and Sons. New York 538 p.
- National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of poultry*. 9th rev. Ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Nesheim, M. C., and R. E. Austic. 1985. *Poultry production*. 13a Edition. Ed. Lea and Febifer. Philadelphia
- Norman, A. W. 1987. Studies on the vitamin D endocrine system in the avian. *J. Nutr.* 117: 797-807.
- Norman, A. W., and S. Hurwitz. 1993. The role of the vitamin D endocrine system in avian bone biology. *J. Nutr.* 123: 310-316.
- North, M. O. 1991. *Manual de producción avícola*. Ed. Manual Moderno, México.
- Oosterhout, L. E. 1980. Effects of calcium and phosphorus levels on egg weight and egg shell quality in laying hens. *Poult. Sci.* 59:1480-1484.
- Parsons, A. H. 1982. Structure of the eggshell. *Poult. Sci.* 61: 2013-2021.
- Ruckebusch, Y., L. P. Phaneuf, y R. Dunlop. 1991. Fisiología de pequeñas y grandes especies. De. Manual Moderno, México.
- Ruschkowski, S. R., F. E. Robinson, K. M. Cheng, and L. E. Hart. 1993. Comparison of two multiple blood sampling regimenes using an indwelling vascular access device for investigations of the hen's ovulatory cycle and calcium metabolism. *Poult. Sci.* 72: 172-184.
- SAS institute Inc. 1987. *SAS/STAT Guide for personal computers*. Version 6 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1987. 1028 pp.
- Sigma Chemical Company. 1995. Phosphorus inorganic (procedure No. 670). Sigma Diagnostics. St. Louis, MO 5 p.

- Sloan, D. R., A. F. Rossi, R. H. Harms, and R. B. Christmas. 1990. Redefining the equation for predicting eggshell weight on intact eggs. *Poult. Sci.* (Supl. 1): 192.
- Soares, JR., J. H. 1984. calcium metabolism and its control. A review. *Poult. Sci.* 63: 2075-2083.
- Soares JR., J. H. 1987. Metabolic aspects of calcification in avians. *J. Nutr.* 117: 783.
- Steel, R. D. G. and Torrie, J. H. 1960. Principles and procedures of statistics: with special references to the biological sciences. Ed. McGraw-Hill.
- Sturkie, P. D. 1967. Fisiología aviar. Ed. Acribia. Zaragoza
- Takahashi, J. S., and M. Zatz. 1982. regulation of circadian rhythmicity. *Science* 217: 1104-1111.
- Taylor, T. G., y D. A. Stringer. 1967. Formación de la cáscara del huevo y metabolismo esquelético. En: Sturkie, P. D. Fisiología aviar. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 390-410.
- Tullett, S. G. 1987. Egg shell formation and quality. In: R. G. Wells and C. G. Belyavin. Egg quality - Current problems and recent advances. Chapter 8. Poultry Science Symposium No. 20. Butterworths, England.
- Washburn, K. W. 1982. Incidence, cause, and prevention of egg shell breakage in commercial production. *Poult. Sci.* 61: 2005-2012.
- Wasserman, R. H., and C. S. Fuller. 1995. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *J. Nutr.* 125: 1971S- 1979S.
- Wideman, JR., R. F. 1987. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *J. Nutr.* 117: 808-815.
- Wilson J. A. Fundamentos de fisiología animal. 1a Ed. México: Limusa. 1989: 984.

ANEXO 1

INGRESO DE DATOS AL PROGRAMA SAS PARA LOS TRATAMIENTOS INCLUIDOS EN EL ARREGLO FACTORIAL

```
Data a;
options nonumber ps=55 nodate nocenter;
input ave bloque nivel per peso1 posturi pesohvo1 post pesohvo pesocasc grav casc area swusa
masa rotura calcio grcalcio eficc;
pi = sqrt(100-posturi);
p = sqrt(100-post);
cards;
19 1 3.3 1 1875 100 67.1 94.11 61.93 5.80 1.082 9.37 73.12 79.31 58.29 7.67 37.00 2.14 63.68
40 1 3.3 1 1525 75 62.9 70.58 63.40 5.20 1.076 8.20 74.34 69.94 44.75 17.02 37.30 1.94 57.55
...
74 2 5.2 4 1400 75 61.5 82.35 62.30 5.75 1.082 9.24 73.41 78.32 51.30 8.71 37.42 2.15 0.946
95 2 5.2 4 1550 75 58.6 88.23 59.93 5.33 1.080 8.89 71.45 74.64 52.88 11.61 37.49 2.00 8.050
run;
proc glm;
classes nivel per bloque;
model p = bloque nivel per nivel*per pi/ss3;
lsmeans nivel per/pdiff stderr;
lsmeans nivel*per;
title1 "Análisis de Covarianza";
run;
proc glm;
classes nivel per bloque;
model pesohvo = bloque nivel per nivel*per pesohvo1/ss3;
lsmeans nivel per/pdiff stderr;
lsmeans nivel*per;
title1 "Análisis de Covarianza";
run;
proc glm;
classes nivel per bloque;
model pesocasc grav casc area swusa masa rotura calcio grcalcio eficc = bloque nivel per
nivel*per/ss3;
lsmeans nivel per/pdiff stderr;
lsmeans nivel*per;
run;
```

SALIDA DE DATOS EN EL PROGRAMA SAS PARA LOS TRATAMIENTOS INCLUIDOS EN EL ARREGLO FACTORIAL

Analisis de Covarianza

General Linear Models Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
NIVEL	3	3 4 4.3 5.2
PER	4	1 2 3 4
BLOQUE	2	1 2

Number of observations in data set = 72

Dependent Variable: P

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	96.08910653	7.39146973	4.98	0.0001
Error	58	86.01723997	1.48305586		
Corrected Total	71	182.10634650			

R-Square	C.V.	Root MSE	P Mean
0.527654	62.92665	1.217807	1.93528154

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	12.95264448	12.95264448	8.73	0.0045
NIVEL	2	1.10120336	0.55060168	0.37	0.6915
PER	3	3.54741403	1.18247134	0.80	0.5004
NIVEL*PER	6	12.15647934	2.02607989	1.37	0.2436
PI	1	45.35338008	45.35338008	30.58	0.0001

Dependent Variable: PESOHVO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	463.61410551	35.66262350	6.06	0.0001
Error	58	341.48012893	5.88758843		
Corrected Total	71	805.09423444			

R-Square	C.V.	Root MSE	PESOHVO Mean
0.575851	4.113005	2.426435	58.99422222

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	0.23863981	0.23863981	0.04	0.8411
NIVEL	2	9.33495849	4.66747925	0.79	0.4574
PER	3	1.19852401	0.39950800	0.07	0.9760
NIVEL*PER	6	13.01816851	2.16969475	0.37	0.8960
PESOHVOI	1	377.75509874	377.75509874	64.16	0.0001

Dependent Variable: PESOCASC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	1.41798517	0.11816543	0.60	0.8329
Error	59	11.60698871	0.19672862		
Corrected Total	71	13.02497388			

R-Square	C.V.	Root MSE	PESOCASC Mean
0.108867	7.981354	0.443541	5.55720833

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	0.24325313	0.24325313	1.24	0.2707
NIVEL	2	0.24814975	0.12407487	0.63	0.5358
PER	3	0.65768449	0.21922816	1.11	0.3506
NIVEL*PER	6	0.26889781	0.04481630	0.23	0.9651

Dependent Variable: GRAV

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	0.00006578	0.0000548	0.57	0.8546
Error	59	0.00056406	0.00000956		
Corrected Total	71	0.00062984			

R-Square	C.V.	Root MSE	GRAV Mean
0.104447	0.285435	0.003091	1.08325019

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	0.00000451	0.00000451	0.47	0.4947
NIVEL	2	0.00000624	0.00000312	0.33	0.7230
PER	3	0.00003669	0.00001223	1.28	0.2899
NIVEL*PER	6	0.00001835	0.00000306	0.32	0.9241

Dependent Variable: CASC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	2.14398924	0.17866577	0.58	0.8478
Error	59	18.10732619	0.30690383		
Corrected Total	71	20.25131543			

R-Square	C.V.	Root MSE	CASC Mean
0.105869	5.879170	0.553989	9.42291261

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	0.14921654	0.14921654	0.49	0.4884
NIVEL	2	0.06899396	0.03449698	0.11	0.8939
PER	3	0.85150630	0.28383543	0.92	0.4345
NIVEL*PER	6	1.07427244	0.17904541	0.58	0.7421

Dependent Variable: AREA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	60.80508199	5.06709017	0.58	0.8467
Error	59	512.32128247	8.68341157		
Corrected Total	71	573.12636446			

R-Square	C.V.	Root MSE	AREA Mean
0.106094	4.171878	2.946762	70.63396806

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	6.55455321	6.55455321	0.75	0.3885
NIVEL	2	13.09007643	6.54503822	0.75	0.4751
PER	3	33.50577864	11.16859288	1.29	0.2875
NIVEL*PER	6	7.65467370	1.27577895	0.15	0.9890

Dependent Variable: SWUSA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	156.96978809	13.08091567	0.59	0.8425
Error	59	1310.72470893	22.21567303		
Corrected Total	71	1467.69449702			

R-Square	C.V.	Root MSE	SWUSA Mean
0.106950	5.993743	4.713350	78.63784556

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	18.56358374	18.56358374	0.84	0.3644
NIVEL	2	18.21070035	9.10535018	0.41	0.6656
PER	3	78.96300318	26.32100106	1.18	0.3233
NIVEL*PER	6	41.23250081	6.87208347	0.31	0.9297

Dependent Variable: MASA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	270.79590750	22.56632562	1.15	0.3365
Error	59	1153.36450561	19.54855094		
Corrected Total	71	1424.16041311			

R-Square	C.V.	Root MSE	MASA Mean
0.190144	8.003083	4.421374	55.24588689

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	12.5818:0006	12.5818:0006	0.64	
NIVEL	2	42.16469336	21.08234668	1.08	0.3467
PER	3	55.96833533	18.65611178	0.95	0.4204
NIVEL*PER	6	160.08107875	26.68017979	1.36	0.2438

Dependent Variable: ROTURA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	125.14505017	10.42875418	0.58	0.8520
Error	59	1066.68870815	18.07946963		
Corrected Total	71	1191.83375832			

R-Square	C.V.	Root MSE	ROTURA Mean
0.105002	55.11267	4.251995	7.71509722

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	10.16929835	10.16929835	0.56	0.4562
NIVEL	2	14.55524636	7.27762318	0.40	0.6704
PER	3	68.16812960	22.72270987	1.26	0.2975
NIVEL*PER	6	32.25237586	5.37539598	0.30	0.9358

Dependent Variable: CALCIO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	1.92176017	0.16014668	0.66	0.7851
Error	59	14.39809615	0.24403553		
Corrected Total	71	16.31985632			

R-Square	C.V.	Root MSE	CALCIO Mean
0.117756	1.318067	0.493999	37.47909722

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	0.00570668	0.00570668	0.02	0.8790
NIVEL	2	0.36837386	0.18418693	0.75	0.4746
PER	3	0.45207015	0.15069005	0.62	0.6064
NIVEL*PER	6	1.09560947	0.18260158	0.75	0.6132

Dependent Variable: GRCALCIO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	0.17724722	0.01477060	0.55	0.8723
Error	59	1.58461078	0.02685781		
Corrected Total	71	1.76185800			

R-Square	C.V.	Root MSE	GRCALCIO Mean
0.100602	7.870187	0.163883	2.08233333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	0.03345422	0.03345422	1.25	0.2689
NIVEL	2	0.04000933	0.020:00467	0.74	0.4792
PER	3	0.07764189	0.02588063	0.96	0.4160
NIVEL*PER	6	0.02614178	0.00435696	0.16	0.9857

Dependent Variable: EFIC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	1403.954225	116.996185	3.620	0.0004
Error	59	1905.384978	32.294661		
Corrected Total	71	3309.339203			

R-Square	C.V.	Root MSE	EFIC Mean
0.424240	7.875319	5.682839	72.16011111

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	46.661020	46.661020	1.44	0.2342
NIVEL	2	1220.833405	610.416702	18.90	0.0001
PER	3	98.346448	32.78214927	1.02	0.3925
NIVEL*PER	6	38.113352	6.352225	0.20	0.9765

Least Squares Means

NIVEL	PER	P LSMEAN
3.4	1	1.91105548
3.4	2	1.68994880
3.4	3	2.31795116
3.4	4	1.12265727
4.3	1	2.62891931
4.3	2	1.30746031
4.3	3	2.68755724
4.3	4	1.60338527
5.2	1	1.96509418
5.2	2	2.05517731
5.2	3	1.43579551
5.2	4	2.49837663

Least Squares Means

NIVEL	PER	PESOHVG LSMEAN
3.4	1	58.3239195
3.4	2	58.1624873
3.4	3	59.5658996
3.4	4	58.1922282
4.3	1	59.2154297
4.3	2	59.5193021
4.3	3	58.2844925
4.3	4	58.8893810
5.2	1	59.6441790
5.2	2	59.7135741
5.2	3	59.1433815
5.2	4	59.2763921

Least Squares Means

NIVEL	PER	PESOCASC LSMEAN	ORAV LSMEAN	CASC LSMEAN	AREA LSMEAN	SWUSA LSMEAN	MASA LSMEAN
3.4	1	5.32216667	1.08121791	9.14543839	70.4780500	75.5094050	52.7405000
3.4	2	5.57233333	1.08408486	9.47304244	69.9989167	79.5948150	53.6121667
3.4	3	5.67233333	1.08364216	9.62454920	71.2604333	79.5449633	55.0413333
3.4	4	5.33066667	1.08291710	9.59151604	68.9216833	77.3360400	55.3076667
4.3	1	5.42783333	1.08195273	9.54692810	70.6414833	76.7231583	54.1805000
4.3	2	5.63333333	1.08416361	9.32299191	70.4332500	79.9350833	57.5980000
4.3	3	5.70550000	1.08402270	9.47003538	71.1133167	80.0840500	56.0635000
4.3	4	5.60833333	1.08448270	9.36790353	69.9741167	80.1558217	55.8338333
5.2	1	5.58333333	1.08298550	9.31582840	71.2081333	78.4529283	56.8978333
5.2	2	5.53633333	1.08353385	9.19396889	70.2089833	78.8670817	53.2456667
5.2	3	5.72233333	1.08267512	9.70337574	72.6506000	78.7092350	59.1943333
5.2	4	5.57200000	1.08332410	9.31937336	70.7196500	78.7415650	53.2353333

NIVEL	PER	ROTURA	CALCIO	GRCALCIO
		LSMEAN	LSMEAN	LSMEAN
3.4	1	10.5728333	37.5350000	1.99683333
3.4	2	6.7123333	37.3105000	2.07833333
3.4	3	6.9988333	37.4413333	2.12333333
3.4	4	8.5165000	37.4701667	1.99816667
4.3	1	9.4021667	37.9833333	2.06250000
4.3	2	6.4606667	37.4476667	2.10950000
4.3	3	6.3893333	37.4355000	2.13316667
4.3	4	6.2138333	37.4516667	2.10016667
5.2	1	8.1123333	37.3191667	2.08150000
5.2	2	7.4465000	37.4640000	2.07383333
5.2	3	8.1238333	37.4328333	2.14183333
5.2	4	7.6320000	37.4580000	2.08683333

EFIC

Least Squares Means

NIVEL	EFIC LSMEANS	Pr> T HO: LSMEANS (i) = LSMEANS (j)			
		1/j	1	2	3
3.4	77.0370000	1	.	0.0073	0.0001
4.3	72.4777500	2	0.0073	.	0.0014
5.2	66.9655833	3	0.0001	0.0014	.

ANEXO 2

INGRESO DE DATOS AL PROGRAMA SAS PARA EL ANALISIS DE LA CONCENTRACION DE P PLASMATICO

```

data a
options nonumber ps=55 nodate nocenter;
inputs ave bloque nivel per pplasm;
cards;
19 1 1 1 10.1
51 1 1 1 12.7
...
91 2 3 3 6.8
95 2 3 4 7.0
106 2 3 4 8.6
run;
proc glm;
classes nivel per bloque;
model pplasm = bloque nivel per nivel*per/ss3;
lsmeans nivel per/stderr pdiff;
lsmeans nivel*per;
run;

```

SALIDA DE DATOS EN EL PROGRAMA SAS PARA EL ANALISIS DE LA CONCENTRACION DE P PLASMATICO

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
NIVEL	3	1 2 3
PER	4	1 2 3 4
BLOQUE	2	1 2

Number of observations in data set = 43

Dependent Variable: PPLASM

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	69.05031656	5.75419305	3.18	0.0050
Error	30	54.29014856	1.80967162		
Corrected Total	42	123.34046512			

R-Square	C.V.	Root MSE	PPLASM Mean
0.559835	16.89408	1.34524036	7.96279070

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	1	0.50885144	0.50885144	0.28	0.5998
NIVEL	2	9.56683414	4.78341707	2.64	0.0876
PER	3	19.64978733	6.54992911	3.62	0.0242
NIVEL*PER	6	30.61970572	5.10328429	2.82	0.0269

General Linear Models Procedure
Least Squares Means

NIVEL	PPLASH LSMEAN	Std Err LSMEAN	Pr > T HO:LSMEAN=0	LSMEAN Number
1	8.48535531	0.35841807	0.0001	1
2	7.33426358	0.37643146	0.0001	2
3	7.67937889	0.35575165	0.0001	3

Pr > |T| HO: LSMEAN(1)=LSMEAN(j)

1/j	1	2	3
1	.	0.0340	0.1199
2	0.0340	.	0.5098
3	0.1199	0.5098	.

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

PER	PPLASH		Std Err	Pr > T HO:LSMEAN=0	Pr > T HO: LSMEAN(1)=LSMEAN(j)			
	LSMEAN	LSMEAN			1/j	1	2	3
1	8.78677136	0.37849888	0.0001	1	.	0.0472	0.1856	0.0033
2	7.62451424	0.41878379	0.0001	2	0.0472	.	0.5358	0.2586
3	8.00307489	0.43196562	0.0001	3	0.1856	0.5358	.	0.0963
4	6.91760988	0.45408740	0.0001	4	0.0033	0.2586	0.0963	.

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

General Linear Models Procedure
Least Squares Means

NIVEL	PER	PPLASH LSMEAN
1	1	10.5172326
1	2	9.0620543
1	3	8.4000000
1	4	5.9620543
2	1	7.0750000
2	2	6.5287210
2	3	8.4712790
2	4	7.2620543
3	1	8.7690815
3	2	7.2827674
3	3	7.1379457
3	4	7.5287210

ANEXO 3

INGRESO DE DATOS AL PROGRAMA SAS PARA EL ANALISIS DE LOS DATOS DEL TRATAMIENTO CONTROL NEGATIVO

```

Data a;
input ave hora porCa membr grdeca;
cards;
7      6      9.20    0.267    0.025
28     6      8.20    0.318    0.026
...
75     24     36.70   5.400    1.982
58     24     36.60   5.067    1.854
run;
proc glm;
classes hora;
model porCa membr grdeca = hora;
means hora/nsk;
run;
proc reg;
model porCa membr grdeca = hora;
run;
    
```

SALIDA DE DATOS EN EL PROGRAMA SAS PARA EL ANALISIS DE LOS DATOS DEL TRATAMIENTO CONTROL NEGATIVO

Analisis de Varianza

Class	Levels	Values
HORA	8	6 7 12 18 24 6.5 11.5 13.5

Number of observations in data set = 18

Dependent Variable: PORCA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	1522.32726667	217.47532381	755.09	0.0001
Error	10	2.88013333	0.28801333		
Corrected Total	17	1525.20740000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	PORCA Mean	
	0.998112	1.819422	0.53666874	29.49666667	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HORA	7	1522.32726667	217.47532381	755.09	0.0001

Dependent Variable: MEMER

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	7	64.72186700	9.24598100	116.31	0.0001
Error	10	0.79494700	0.07949470		
Corrected Total	17	65.51681400			
	R-Square	C.V.	Root MSE	MEMER Mean	
	0.987867	9.303169	0.28194804	3.03066667	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
HORA	7	64.72186700	9.24598100	116.31	0.0001

Dependent Variable: GRDECA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Modcl	7	9.94495169	1.42070738	113.61	0.0001
Error	10	0.12505125	0.01250512		
Corrected Total	17	10.07000294			

R-Square	C.V.	Root MSE	GRDECA Mean
0.987582	10.69028	0.11182632	1.04605556

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BORA	7	9.94495169	1.42070738	113.61	0.0001

Student-Newman-Keuls test for variable: PORCA

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.288013
 Harmonic Mean of cell sizes= 1.476923

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	1.391501	1.7119723	1.9106094	2.0553279

Number of Means	6	7	8
Critical Range	2.1691384	2.2628236	2.3423429

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	HORA
A	37.2833	6	24
B	32.1500	4	18
B	32.1000	1	13.5
C	31.2700	2	12
C	29.9000	1	11.5
D	19.7000	1	7
E	17.0000	1	6.5
F	8.7000	2	6

Student-Newman-Keuls test for variable: MEMBER

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.079495
 Harmonic Mean of cell sizes= 1.476923

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	0.7310487	0.8994137	1.0037711	1.0798015

Number of Means	6	7	8
Critical Range	1.1395938	1.1888129	1.2305897

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	HORA
A	5.2890	6	24
B	3.4010	4	18
C	2.6080	1	13.5
D	1.7205	2	12
E	1.5280	1	11.5
E	0.8100	1	7
F	0.2925	2	6
F	0.2420	1	6.5

Student-Newman-Keuls test for variable: GRDECA

Alpha= 0.05 df= 10 MSE= 0.012505
 Harmonic Mean of cell sizes= 1.476923

Number of Means 2 3 4 5
 Critical Range 0.2899488 0.3567257 0.398116 0.4282712

Number of Means 6 7 8
 Critical Range 0.451986 0.4715073 0.4880768

Means with the same letter are not significantly different.

SNK Grouping	Mean	N	HORA
A	1.9725	6	24
B	1.0933	4	18
B	0.8370	1	13.5
C	0.5375	2	12
C	0.4570	1	11.5
D	0.1600	1	7
D	0.0410	1	6.5
D	0.0255	2	6

Model: MODEL1

Dependent Variable: PORCA

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	1	1194.37600	1194.37600	57.784	0.0001
Error	16	330.83140	20.67696		
C Total	17	1525.20740			

Root MSE 4.54719 R-square 0.7831
 Dep Mean 29.49667 Adj R-sq 0.7695
 C.V. 15.41595

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	10.129708	2.76442864	3.664	0.0021
HORA	1	1.200018	0.15789218	7.600	0.0001

Dependent Variable: MEMBR

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	1	64.28338	64.28338	833.876	0.0001
Error	16	1.23344	0.07709		
C Total	17	65.51681			

Root MSE 0.27765 R-square 0.9812
 Dep Mean 3.03067 Adj R-sq 0.9800
 C.V. 9.16137

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-1.462373	0.16879539	-8.664	0.0001
HORA	1	0.278398	0.00964086	28.877	0.0001

Dependent Variable: GRDECA

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	1	9.77092	9.77092	522.708	0.0001
Error	16	0.29909	0.01869		
C Total	17	10.07000			

Root MSE	0.13672	R-square	0.9703
Dep Mean	1.04606	Adj R-sq	0.9684
C.V.	13.07024		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	T for H0: Parameter=0	Prob > T
INTERCEP	1	-0.705640	0.08311898	-8.490	0.0001
HORA	1	0.108539	0.00474740	22.863	0.0001