



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ABSORCIÓN, DEPÓSITO Y ELIMINACIÓN DE PIGMENTO CON DIFERENTES
PROGRAMAS DE ADICIÓN DE XANTOFILAS EN DIETAS DE POLLO DE
ENGORDA**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ÁNGELES TEPOX PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL:

XÓCHITL HERNÁNDEZ VELASCO (FMVZ)

CÓMITE TUTOR:

**BENJAMÍN FUENTE MARTÍNEZ (FMVZ)
ARTURO RICARDO GARCÍA MORALES (FMVZ)**

MÉXICO D.F. FEBRERO, 2013



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.

DEDICATORIA

A mis padres: por el apoyo incondicional, por los abrazos oportunos, por quererme de la forma en que lo hacen. Los amo con toda el alma.

A mis hermanos: por estar siempre a mi lado.

A dos personas que terrenalmente abandonaron este mundo:

Mi Abuelito; por todas esas conversaciones, porque desde que tengo memoria me demostraste tu cariño.

Mi queridísimo Dr. Miguel Ángel Villalobos Villanueva; por todo lo que aprendí de usted, por los años de amistad, por los consejos, por mostrarme lo hermosa que es nuestra bella profesión. Sé que ahora ambos me cuidan desde la eternidad.

A mis amigos, los que siempre han estado ahí:

Mariel; por luchar y no rendirte. Por tantos años de amistad, sin duda los mejores de mi vida. Te quiero tanto!

Fabiola; por todo el apoyo, por esas horas interminables de plática, por las risas, esta por demás decir lo mucho que te adoro.

Hilda; porque estuviste ahí desde el inicio, siempre alentándome.

Karina; porque gran parte de todo esto lo sufrimos juntas y descubrimos que un helado gigante es la solución.

A mi Antonio: por caminar a mi lado en este arduo viaje. Porque te conocí en el momento justo. Por lo alegre que hoy está mi corazón. Realmente me faltaría entender el vocabulario de mi cuerpo, el de las nubes y el de lo eterno para poder decirte cuánto te quiero.

La satisfacción de este logro es nuestra.

“.... Siguen siendo para mí un grupo aparte, una especie de logia secreta fortalecida por un elemento unificador casi indestructible que son las nostalgia comunes...”

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad Nacional Autónoma de México por cobijarme tantos años, es un honor formar parte de tan maravillosa institución.

A mi hermosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser testigo de las mejor etapa de mi vida, porque ahí conocí a personas excepcionales.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola y a todo su personal, por los gratos momentos.

Al Dr. Ernesto Ávila, por su colaboración y apoyo en todo momento, por su calidad humana.

Al Dr. Manuel Quiroz Pesina por los consejos oportunos.

A Industrias Vepinsa SA., de CV., por la donación del pigmento, a los Ingenieros Gustavo Rodríguez y Salvador Velasco del Laboratorio de Control de Calidad por la realización de la técnica de HPLC.

Al Dr. Sergio Gómez por permitirnos la agradable estancia en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, a los técnicos de este centro quienes no dudaron en compartir el conocimiento y a Marco por su particular forma de enseñar.

Al Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, al Dr. Castrejon, a la Química Águeda por permitirnos realizar la liofilización de las muestras, a los técnicos: Fer, Tere, Martin por toda la paciencia.

Al departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, testigo de las horas interminables de trabajo.

A toda la gente y amigos que me ayudaron durante el periodo experimental: Jorge, Isaías, Lázaro, Sarahi, Silvia y a los estudiantes de la UAM Xochimilco.

A Mary una de las mejores experiencias durante la maestría fue conocerte, las horas interminables de laboratorio fueron mejor con tu compañía.

A mí estimada amiga Sharon, porque fue divertido hablar horas sobre espectrofotometría.

A mi asesora la Dra. Xóchitl por arriesgarse a vivir este reto, por la paciencia y sus consejos.

Al Dr. Benjamín Fuente porque no cualquiera trabaja a mi lado tantos años. Se merece un premio.

Al Dr. Arturo García por la disposición y el tiempo invertido en este proyecto,

Al Instituto de Nutrición, particularmente a la Dra. María Elena Carranco por despejar tantas dudas.

Al Dr. Juan Carlos del Río por su tiempo y su valiosa aportación.

A todo las personas de la Coordinación de Posgrado, por siempre tener una sonrisa y aligerar este proceso.

Gracias a todos los que pudieron hacer posible la culminación de este fantástico sueño.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el nivel de saturación en la absorción y depósito de pigmento amarillo cutáneo, así como su digestibilidad aparente en el pollo de engorda *in vivo* y por sexo por lo que se llevaron a cabo 2 experimentos (jaula y piso), se utilizaron 216 y 660 pollos Ross 308 respectivamente, que fueron separados por sexo. A los 21 días de edad, las aves se alimentaron con dietas con base en sorgo+pasta de soya y con diferentes niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* (65, 92, 119, 146, 173 y 200 ppm). Se llevaron registros semanales de: ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia, se midió el pigmento en plasma y el pigmento cutáneo *in vivo*; además, se determinó la digestibilidad aparente del pigmento. Para las variables productivas, coeficiente de variación de b+, valores mínimos y máximos de pigmentación en piel se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y para evaluar la diferencia entre medias se realizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Para la pigmentación cutánea, niveles de pigmento en plasma y digestibilidad se utilizó una regresión múltiple. En el experimento 1 (jaula) fueron necesarios 21 o 28 días en función del consumo de xantofilas para alcanzar el máximo amarillamiento cutáneo y el máximo nivel plasmático, la máxima digestibilidad aparente calculada del pigmento fue de 80.1%, las hembras ganaron 1.3 UA más que los machos, y por cada día de consumo la pigmentación cutánea incrementó 1.09 UA en promedio para todos los niveles de pigmento. En el experimento 2 (piso) el máximo amarillamiento se obtuvo después de 21 ó 28 días de consumo dependiendo de la dosis.

Palabras clave: *Tagetes erecta*, pigmentación cutánea, digestibilidad aparente del pigmento, pollo de engorda, pigmento plasmático.

ABSTRACT

Two experiments were conducted to assess the saturation level of saponified yellow xanthophylls from Aztec marigold (*Tagetes erecta*) extract during absorption and skin pigmentation as influenced by sex. Two Experiments conducted in battery cages and floor, two hundred sixteen and six hundred sixty 21-day-old Ross 308 broiler chickens were assigned to 6 dietary treatments in a completely randomized design increasing levels of dietary xanthophylls (65, 92, 119, 146, 173 and 200 ppm) added to sorghum-soybean meal based diets. The following productive parameters were recorded: body weight, feed intake and feed conversion. Plasma carotenoid levels, *in vivo* skin yellowness, and pigment apparent digestibility were also measured. Growth performance data, and coefficient of variation, minimum and maximum values for skin yellowness were analyzed through ANOVA. Treatment means were compared using Tukey's test ($P < 0.05$). Data for skin yellowness, plasma xanthophyll concentration, and xanthophylls digestibility was subjected to a multiple regression analysis. Results of the experiment 1 (battery cages) indicate that the highest skin pigmentation was observed between 21 or 28 days of pigment consumption of low or high levels of xanthophylls and the maximum plasma xanthophyll level. Apparent digestibility of xanthophylls from *Tagetes erecta* was 80.1%. Skin yellowness in females was 1.3 points higher than that of males. Skin yellowness in carcasses increased 1.09 points for every day of xanthophyll consumption. Results of the experiment 2 (floor) indicate that the highest skin pigmentation was observed between 21 or 28 days of pigment consumption depending of the xanthophylls levels.

Keys word: *Tagetes erecta*, skin b+ values (yellowness), apparent digestibility, broiler, plasma carotenoids levels

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Agentes pigmentantes	1
1.1.1. Carotenoides	1
1.1.2. Clasificación	2
1.2. Metabolismo de los carotenoides	2
1.2.1. Transporte y depósito a tejidos	4
1.3. Funciones de los carotenoides	5
1.4. Principales fuentes de pigmento empleadas en la Avicultura	8
1.4.1. <i>Tagetes erecta</i> . Proceso de obtención de los carotenoides.	9
1.5. Análisis del pigmento y evaluación del color	9
1.5.1. Métodos directos	10
1.5.2. Métodos indirectos	12
1.6. Metodología para la evaluación de los niveles de carotenoides en el plasma sanguíneo y diversos tejidos	13
1.7. Factores que afectan la pigmentación	15
1.7.1. Relacionados a la zona geográfica	16
1.7.2. Factores relacionados al pigmento	17
1.7.2.1. Origen	17
1.7.2.2. Tiempo de consumo y nivel de inclusión de pigmento en la dieta	18
1.7.2.3. Tiempo de almacenamiento	20
1.7.2.4. Presentación física	20
1.7.2.5. Interacción con otros ingredientes	21

1.7.3. <i>Relacionados al manejo</i>	22
1.7.3.1. Tipo de iluminación	22
1.7.3.2. Factores que afectan el consumo	22
1.7.3.3. Procesamiento del pollo	22
1.7.4. <i>Relacionados a las aves</i>	23
1.7.4.1. Salud intestinal	23
1.7.4.2. Genética	24
1.7.4.3. Edad	24
1.7.4.4. Sexo	25
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVO	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6. RESULTADOS	36
7. DISCUSIÓN	58
8. CONCLUSIONES	64
9. BIBLIOGRAFÍA	65
10. ANEXO	73

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Contenido de xantofilas en ingredientes usados en dietas para aves.....	8
CUADRO 2. Factores que afectan la pigmentación amarilla de la piel del pollo de engorda.....	16
CUADRO 3. Composición de las dietas y análisis calculado.....	31
CUADRO 4. Datos productivos en pollos de engorda alimentados con diferentes niveles de pigmento en la dieta del día 21 al 49 de edad (Exp 1).....	37
CUADRO 5. Xantofilas (mg) consumidas del día 21 al 49 de edad en pollos de engorda alimentados con diferentes cantidades de xantofilas (Exp 1).....	38
CUADRO 6. Amarillamiento cutáneo a partir del día 21 al 49 de edad en pollos Ross con dietas que contenían diferente nivel de xantofilas de <i>Tagetes erecta</i> (Exp 1).....	40
CUADRO 7. Xantofilas (mg/mL) en plasma de pollos Ross alimentados con xantofilas de <i>Tagetes erecta</i> del día 21 al 49 de edad.....	44
CUADRO 8. Digestibilidad aparente (%) en pollos de engorda con dietas con niveles de xantofilas de <i>Tagetes erecta</i> del día 21 al 49 de edad.....	46
CUADRO 9. Parámetros productivos en pollos de engorda alimentados con diferentes niveles de pigmento en la dieta del día 21 al 49 de edad (Exp 2)	47
CUADRO 10. Amarillamiento amarilla cutáneo (b+) en pollos de engorda con distintos niveles de pigmento en la dieta a partir del día 21 al 49 de edad (Exp 2).....	49
CUADRO 11. Pigmento consumido (mg) a partir del día 21 al 49 de edad por pollos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas... ..	51
CUADRO 12. Amarillamiento cutáneo (b+) de pollos Ross alojados en piso a partir del día 21 al 49 de edad con diferentes niveles de xantofilas en la dieta (Exp 2).....	52-53
CUADRO 13. Amarillamiento cutáneo (b+) de pollos Ross alojados en piso del día 21 al 49 de edad con diferentes niveles de xantofilas en la dieta. (Exp 2).....	52-53
CUADRO 14. Coeficiente de variación (%) de la pigmentación cutánea obtenida durante 4 semanas de experimentación.....	56

CUADRO 15. Valores mínimos y máximos de amarillamiento cutáneo en pollos de engorda alimentados con dietas de finalización con diferente nivel de xantofilas de *Tagetes erecta*57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Absorción de lípidos.....	3
FIGURA 2. Estructura de las especies reactivas del oxígeno más comunes.....	6
FIGURA 3. Estructura química de la β -ionona.....	7
FIGURA 4. Estructura química del β -caroteno.....	7
FIGURA 5. Escala de colores según el método CIE LAB.....	12
FIGURA 6. Unidades de amarillamiento (b+) en piel de hembras Ross alimentadas con diferente nivel de xantofilas amarillas de <i>Tagetes erecta</i> del día 21 al 49 de edad.....	41
FIGURA 7. Unidades de amarillamiento (b+) de machos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas amarillas de <i>Tagetes erecta</i> del día 21 al 49 de edad.....	42
FIGURA 8. Nivel de xantofilas (mg/mL) en el plasma de pollos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas amarillas en dietas de finalización (día 21 al 49 de edad).....	45
FIGURA 9. Amarillamiento cutáneo promedio en la piel de pollos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas amarillas durante 28 días (Exp 2).....	51
FIGURA 10. Amarillamiento cutáneo promedio de pollos de engorda alimentados con dietas con diferente nivel de xantofilas de <i>Tagetes erecta</i> del día 21 al 49 de edad.....	61

1. INTRODUCCIÓN

Catalogar un alimento como inocuo y de adecuadas características sensoriales está directamente relacionado con su color. Las preferencias del consumidor por los productos avícolas con cierto grado de pigmentación es un hecho definitivo, esta preferencia se asocia al valor nutritivo del producto, lo cual es subjetivo. Tanto el color de la yema del huevo, como el de la grasa subcutánea, el cual refleja el tono de la piel en el pollo de engorda está dado por un grupo de pigmentos amarillos y rojos ampliamente distribuidos en la naturaleza y pertenecientes al grupo de los carotenoides (Montilla y Angulo, 1984; Sunde, 1992; William, 1992).

1.1. Agentes pigmentantes

En la naturaleza existen varios tipos de moléculas pigmentantes, según su estructura pueden clasificarse en: (Delgado *et al.*, 2000; Wesche-Ebeling y Argaiza 2000):

- Derivados del tetrapirrol (clorofilas, pigmentos biliares y hemáticos)
- Derivados del benzopirano (antocianinas y flavonoides)
- Compuesto N-heterocíclicos (betalinas)
- Quinonas (benzoquinonas)
- Derivados de isoprenoides (carotenos y xantofilas)

1.1.1. Carotenoides

En su mayoría los carotenoides son tetraterpenos, compuestos de 8 unidades de isopreno (p. ej. β - caroteno) y 40 átomos de carbono; su estructura básica es lineal, simétrica e invertida en el centro, además poseen un sistema conjugado de dobles enlaces. Debido a la presencia de los dobles enlaces, los carotenoides se presentan en diferente forma geométrica (isomería *cis* o *trans* o Z-E), que se pueden interconvertir por acción de la luz, energía química o térmica. Evaluaciones *in vitro* señalan que la forma *trans* es más efectiva pigmentando, respecto a la forma *cis*, esto para pigmentos rojos (Sánchez *et al.*, 1999; Primo 1995; Olmedilla *et al.*, 2001; Pérez-Vendrell *et al.*, 2001; Liaaen 2004; Carranco *et al.*, 2011).

Los carotenoides, son derivados oxigenados de 4 hidrocarburos fundamentales llamados genéricamente carotenos. Los carotenoides resultan de sustituir en los carotenos, algunos de los hidrógenos por grupos oxhidrilo, carbonilo, epóxido o carboxilo (Primo, 1995).

1.1.2. Clasificación

Se han aislado y caracterizado alrededor de 600 carotenoides los cuales, se pueden clasificar en 2 grupos (Primo 1995; Pérez-Vendrell 2001; Breithaupt 2007):

1. **Carotenos:** en su estructura contienen carbono e hidrógeno (β -caroteno y licopeno), son sustancias lipófilas solubles en éter, aceites y disolventes no polares.
2. **Xantofilas (oxicarotenoides):** además de poseer carbono e hidrógeno, el oxígeno está presente en su estructura (luteína) (Anexo1)

Son solubles en solventes apolares como el éter etílico, benceno, cloroformo y acetona, los carotenos son muy solubles en éter de petróleo y hexano, mientras que las xantofilas se disuelven mejor en etanol y metanol. Sus tonalidades oscilan entre el amarillo (luteína) y el rojo (licopeno) (Sánchez *et al.*, 1999; Olmedilla *et al.*, 2001; Liaaen 2004).

1.2. Metabolismo de los carotenoides

En la dieta, los carotenoides pueden encontrarse en forma libre, unidos a proteínas o esterificados como monoésteres o diésteres a ácidos grasos. Los carotenoides, al ser sustancias liposolubles, siguen la ruta de la digestión lipídica. De manera general una vez que se han liberado de la matriz del alimento, los carotenoides son hidrolizados en el intestino delgado y se absorben (en forma libre) vía difusión pasiva a través de las membranas del intestino, que tiene la característica de ser insaturable y tiene un gradiente de concentración positivo (Breithaupt *et al.*, 2003; Tyczkowski y Hamilton 1986; Fernández 2000) (Figura 1)

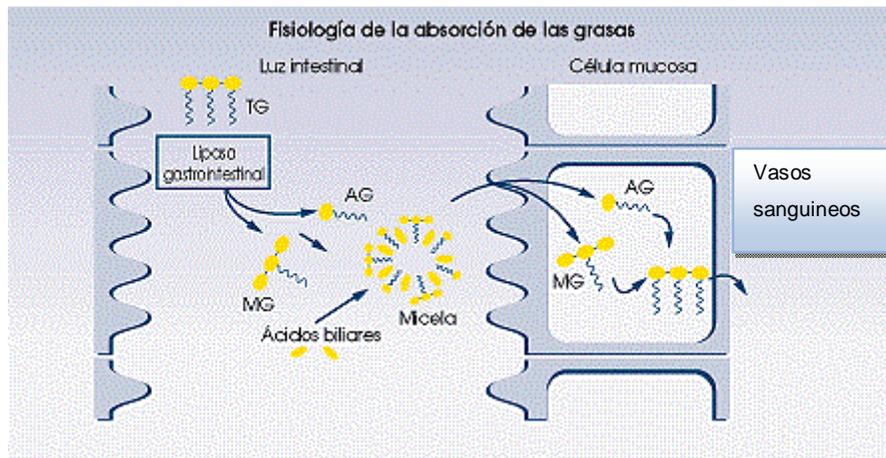


Figura 1. Absorción de lípidos en aves

Modificado de: <http://obesidad.roche.es>

Después de ser absorbidos, son depositados en el hígado, se transportan por la sangre, y posteriormente se almacenan en el tejido adiposo, piel y tarsos; en la gallina de postura llegan al ovario donde se depositan y eliminan parcialmente por la yema del huevo (Fernández 2000; Sturkey 1968).

La capacidad de pigmentación está relacionada con el grado de asimilación a nivel del intestino delgado y por la afinidad específica de cada carotenoide para depositarse en un tejido determinado (Schiedt *et al.*, 1985).

Al respecto Tyczkowski y Hamilton (1986) reportaron que mientras la zeaxantina es mayormente absorbida en el íleon, la absorción de luteína tiene lugar en el duodeno y yeyuno.

Littlefiel *et al.* (1972) llevaron a cabo una técnica para determinar los principales sitios de absorción de xantofilas en pollos, por lo que concluyeron que los sitios de mayor absorción de xantofilas son el yeyuno y el íleon; además demostraron que solo una pequeña cantidad se absorbe en el duodeno e intestino grueso, y que los ciegos no son un sitio de absorción de xantofilas.

Incluso, el grado de absorción puede depender de la forma en que se presentan los carotenoides (libres o esterificados). Aproximadamente el 90 % de las xantofilas que contiene la flor de Cempasuchil (*Tagetes erecta*) se encuentran en forma esterificada, al respecto Fletcher *et al.* (1986) encontraron que las formas esterificadas se absorben en el intestino pero no se depositan en la piel del pollo de engorda debido probablemente a que necesitan una mayor actividad enzimática. El proceso es distinto en la gallina de postura, en donde los ésteres sí se depositan en la yema del huevo (Scheidt 1998; Breithaupt, 2003; Wu *et al.*, 2009).

Breithaupt *et al.* (2003) demostraron que después del proceso de saponificación (carotenoides en forma libre) se mejora la absorción de la zeaxantina y capsantina derivada de frutos del género *Capsicum*.

Los carotenoides que se ingieren de la dieta se incorporan a las micelas junto con algunos fosfolípidos y ácidos grasos, para poder entrar a los enterocitos. La absorción de los carotenoides en la mucosa intestinal se lleva a cabo mediante un mecanismo pasivo (a favor de un gradiente de concentración), en donde la luteína en forma libre se absorbe rápidamente. Esta absorción es promovida en presencia de ácidos y sales biliares (Meléndez *et al.*, 2004; Ganong, 2006).

1.2.1. Transporte y depósito a tejidos

Los carotenoides se reesterifican en las células de la mucosa intestinal, ahí se encuentran con los portomicrones, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los portomicrones transportan aproximadamente el 90% de los carotenoides y las LDL transportan alrededor del 10%. Ambas lipoproteínas unen a los carotenoides ligándolos a la apolipoproteína A-1, y todos ellos tienen la función de transportar a los carotenoides vía sanguínea al hígado (Meléndez *et al.*, 2004; Tyczkowi y Hamilton 1986).

Los carotenos se encuentran fundamentalmente unidos a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mientras que las xantofilas se encuentran distribuidas entre lipoproteínas de alta (HDL). La vida media en el plasma depende de la estructura química de los carotenoides (Meléndez *et al.*, 2004; Scheidt 1998).

En humanos la cinética de los carotenoides en el plasma depende de su polaridad y de las dosis ingeridas; se ha observado que conforme aumenta la ingesta, la cantidad de pigmento encontrada en el plasma disminuye (Meléndez *et al.*, 2004).

Breithaupt *et al.* (2003) propusieron un mecanismo de oxidación de la luteína en pollos y gallinas, al identificarse diversas formas de ésta en el suero y la yema: luteína, monoésteres y diésteres de luteína y 3'-oxoluteína; aunque los diésteres de luteína solo se encuentran en el suero después de haber puesto dosis altas de harina de cempasúchil en el alimento.

En el hígado, la mayor parte de la luteína transportada se encuentra en forma libre (80%), mientras que los monoésteres representan el 20% restante, cuando los carotenoides entran a los sitios donde se depositan son reesterificados por enzimas locales. En la grasa subcutánea, se encuentra la luteína en forma de diester (Pérez-Vendrell *et al.*, 2001; Breithaupt *et al.*, 2003).

1.3. Funciones de los carotenoides

Pigmentación; la principal función de los carotenoides es captar energía luminosa, que posteriormente se transfiere a la clorofila para ser transformada durante la fotosíntesis. Debido a la presencia de una cadena de dobles enlaces conjugados en su molécula poseen la característica de pigmentar con tonalidades que van desde el amarillo hasta el rojo (Meléndez *et al.*, 2004; Carranco *et al.*, 2011).

En los animales, los carotenoides son incorporados a través de la dieta y se almacenan en el tejido adiposo. La yema del huevo debe su color a dos xantofilas, luteína y zeaxantina y a trazas de β -caroteno. Algunos carotenoides como la astaxantina (responsable del color rosado de la carne del salmón), se unen a proteínas originando unos compuestos conocidos como carotenoproteínas, lo cual ocurre en algunos crustáceos. Las carotenoproteínas confieren a estos animales colores verdosos o azulados (Meléndez *et al.*, 2004).

Antioxidantes; en general un antioxidante es un compuesto presente en bajas concentraciones en comparación del sustrato oxidable que retrasa o previene la oxidación, debe ser capaz de reaccionar fácil y específicamente en contra de un radical libre, neutralizándolo e impidiendo el daño oxidativo en contra de las células. La habilidad de algunas moléculas como los carotenoides para actuar como antioxidantes depende de numerosos factores (Krinsky *et al.*, 2004):

- Estructura
- Propiedades químicas
- Localización y forma en los tejidos

Los carotenoides son antioxidantes por excelencia, atrapan las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Figura 2), que se forman por la radiación y protegen a los lípidos de la oxidación. Además, pueden proteger a las células del estrés oxidativo, ya que son capaces de atrapar los radicales libres que causan daño a los lípidos insaturados de la membrana celular, iniciando una reacción en cadena que resulta en la peroxidación del lípido y finalmente en un daño sobre la funcionalidad de las membranas, enzimas y ácidos nucleicos (Krinsky 1988; Bendich y Olson 1989; Krinsky 2004; Carranco *et al.*, 2011).

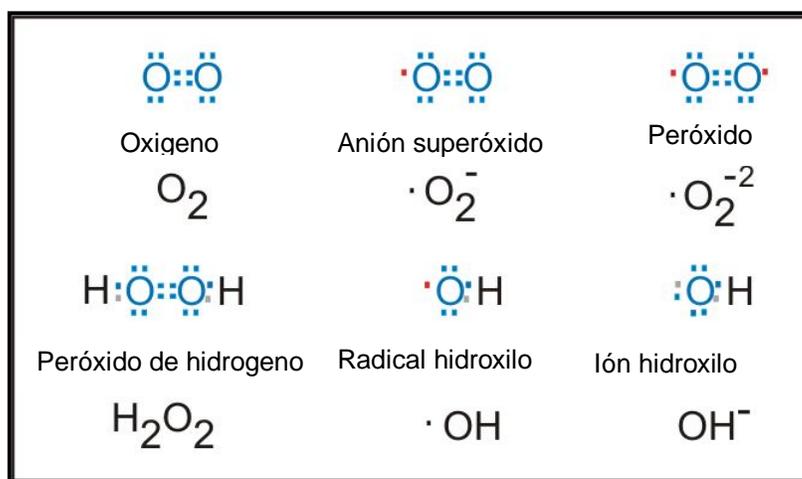


Figura 2. Estructura de las especies reactivas del oxígeno más comunes

Tomado de: www.biotek.com

Precursores en la síntesis de la Vitamina A; entre las funciones de la vitamina A destacan el mantenimiento de la piel y de la visión, puede incluirse en la dieta de distintas maneras, vitamina como tal (retinol 0.3 μg)[§], análogos (0.344 μg de acetato de vitamina A y 0.55 μg de palmitato de vitamina A)^{**} o bien como precursores, en este caso, los carotenoides (0.6 μg de β -caroteno)^{††} (Olmedilla *et al.*, 2001, Meléndez *et al.*, 2004, Hencken 1992).

[§] Equivalente a 1 UI de vitamina A.

^{**} Equivalente a 1 UI de vitamina A.

^{††} Equivalente a 1.667 UI de vitamina A

El número de carotenoides precursores de la vitamina A oscila entre 50 y 60, destacan: α , β y γ carotenos (carotenos) y la β -criptoxantina (xantofilas). La capacidad de los carotenos para actuar como provitamina A, depende de la presencia de mínimo un anillo de β -ionona (Figura. 3) para que puedan convertirse en retinol (Olmedilla *et al.*, 2001).

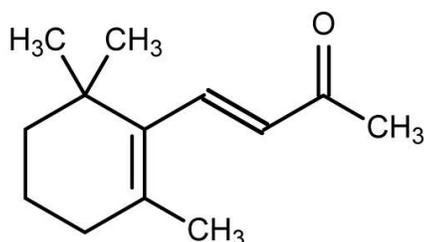


Figura 3. Estructura química de la β -ionona

Tomado de: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---/Beta-Ionone.htm>

El carotenoide más importante al respecto es el β -caroteno que contiene dos de estos anillos (Figura. 4), el α y γ caroteno así como la β -criptoxantina se transforman con la mitad de eficiencia del β -caroteno (Olmedilla *et al.*, 2001).

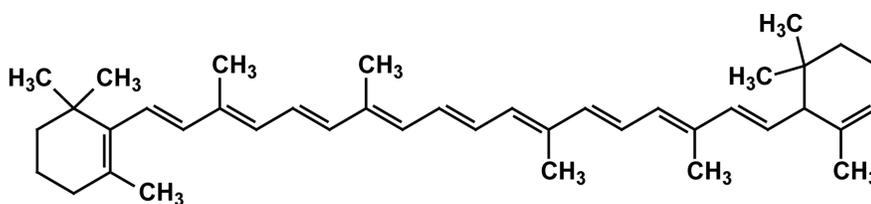


Figura 4. Estructura química del β -caroteno

Tomado de: <http://patentados.com/patente/procedimiento-mejorado-obtener-caroteno-carotenoides-algas-cianobacterias/>

Mejoramiento de la respuesta inmune; en humanos, los carotenoides provitamínicos actúan como potenciadores positivos de la respuesta inmune. Elevadas dosis de β -caroteno aumentan el número de los linfocitos CD4 y CD8, que es muy bajo en enfermos de VIH (Olmedilla *et al.*, 2001). Además, ayudan a mantener la fluidez de la membrana que es esencial para la función inmune, son importantes en la liberación de las moléculas inmunomoduladoras como las prostaglandinas (Bendich y Olson 1989; Higdon *et al.*, 2005).

Gallos alimentados con β -caroteno y cantaxantina obtienen títulos más altos en respuesta a la vacuna contra la Enfermedad de Newcastle (Cheng *et al.*, 2001).

1.4. Principales fuentes de pigmento empleadas en la Avicultura

La actual producción intensiva de las aves impide que tengan libre acceso a vegetales ricos en pigmentos, aunado a esto la duración del ciclo productivo es más corta, por lo que para alcanzar los niveles de pigmentación que demanda el mercado mexicano la formulación de las dietas para pollo de engorda debe incluir ingredientes que proporcionen una alta concentración de xantofilas debido a que los pollos de engorda no pueden sintetizar los carotenoides *de novo*. (Cuadro 1), (Sirri *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Contenido de xantofilas en ingredientes usados en dietas para aves.

Ingrediente	Contenido de xantofilas (mg/kg de base seca)
Alfalfa deshidratada (20% de proteína cruda)	400-450
Maíz Amarillo	20-25
Flor de cempasúchil	6000-10000
Gluten de maíz Amarillo	180-250
Etil ester del ácido apo-8 carotenoico	100
Cantaxantina	100
Extracto saponificado de flor de cempasúchil	12000-40000
Extracto saponificado de chiles	2500-8000

Tomado de: Cuca *et al.*, 2009.

La flor de cempasúchil, maíz amarillo, harina de alfalfa y el gluten de maíz aportan xantofilas del tipo de la luteína, que dan una coloración amarilla a la piel del pollo. Es común el empleo de xantofilas rojas, provenientes de frutos del género *Capsicum*. También se utilizan pigmentos de síntesis química; como el apoester y la cantaxantina (Martínez *et al.*, 2004; Cuca *et al.*, 2009; Perry *et al.*, 2009).

En la industria avícola se usan los carotenoides provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) para pigmentar la piel de los pollos de engorda. Más del 95% de la luteína presente en los pétalos de la flor de cempasúchil se encuentra en forma de diésteres de ácido palmítico, laúrico, esteárico y mirístico (Breithaupt *et al.*, 2007; Breithaupt *et al.*, 2003).

1.4.1. *Tagetes erecta*. Proceso de obtención de los carotenoides.

La flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) es originaria de México y cultivada en diferentes zonas del país, como (Guanajuato, Michoacán y Sinaloa). Las xantofilas provenientes de los pétalos de *Tagetes erecta* se obtienen por un proceso de prensado, deshidratación y molienda de la flor, posteriormente se realiza una extracción con solventes y se obtiene una oleorresina (carotenoides esterificados con ácidos grasos como el palmítico y mirístico), alcanzando un rendimiento de hasta 70,000 a 120,000 ppm de xantofilas. La oleorresina es saponificada con NaOH a 90°C, (hidrólisis alcalina) y así se tiene como resultado xanfolas en su forma libre, (Del Villar, 2007; Ávila, 1990; Delgado, 1997).

El producto terminado contiene alrededor de un 80 a 90% de luteína, 5% de zeaxantina y de 5-15% de otros carotenoides como; violaxantina, criptoxantina y β -caroteno, los cuales carecen de valor pigmentante para el pollo de engorda (Ávila, 1990).

1.5. Análisis del pigmento y evaluación del color

La evaluación del color y el análisis del pigmento son conceptos diferentes, aunque de manera común se les emplea como sinónimos. La habilidad para describir un color en términos simples es difícil, aun teniendo una excelente visión, existen limitaciones que interfieren en la correcta evaluación del color de la piel y los tarsos en el pollo de engorda (Becerril, 1989).

Se han desarrollado y utilizado muchos métodos para evaluar la pigmentación en la piel de pollo y la yema de huevo. La selección del mejor método debe ser en función de alguna situación en particular, debido a que un solo método a veces no puede cumplir con lo que se desea evaluar. Mientras algunos procedimientos describen el color final del producto, otros describen el depósito del pigmento. Muchos sistemas no evalúan el producto final, sino que determinan las propiedades potenciales de pigmentación de un alimento o ingrediente específico (Davis y Kratzek, 1958; Fletcher, 1992).

El término pigmentación es considerado una herramienta para describir el color del producto final y existen varios métodos para evaluarlo:

1.5.1. Métodos directos

Consisten en comparar directamente mediante observación visual los productos avícolas con patrones pre-establecidos, aunque esta apreciación es subjetiva existen diferentes herramientas (Becerril, 1989).

- **Abanicos colorimétricos;** en el caso de la yema del huevo se han empleado diferentes dispositivos como el abanico de DSM®, Purina®, tarjetas de color de Hoechst que se comparan con el abanico colorimétrico, dispositivo que consta de una escala numérica del 1 al 15 donde las tonalidades varían del amarillo pálido hasta naranja intenso (Becerril, 1989; Fletcher, 1992).

La desventaja de este método es que los patrones de coloración no son una medida exacta, ya que varía de una persona a otra; además, no describe con precisión el color por incapacidad de los ojos a distinguir las diferencias verdaderas en concentración de pigmentos (Becerril, 1989; Fletcher, 1992).

- **Colorimetría de reflectancia;** útil para medir el color de la piel del pollo de engorda o la yema del huevo. Se basa en el empleo de espectrofotómetros de reflectancia especializada, que usan una fuente lumínica y un detector constante. Estos instrumentos iluminan el objeto con una fuente de luz conocida y determinan la reflectancia en cuanto a longitudes de onda predefinidas que se usan para expresar y calcular el color. Pueden utilizarse equipos portátiles o fijos, y pueden emplearse tanto en interiores como en exteriores, sin que esto implique diferencias en las lecturas (Becerril, 1989).

En el pollo de engorda se utiliza como método de referencia la medición del color con el colorímetro Minolta CR 400 ® éste consta de 3 variables, las cuales se basan en el sistema CIELab (Figura 5) (Janky, 1986):

- **a) Luminosidad (L);** la cual va de 0 (negro absoluto) hasta el 100 que corresponde a la iluminación total. En el caso de la piel de pollo el rango aceptable es entre 64 a 72.
- **b) Enrojecimiento (a);** que oscila entre -60 a +60. Los valores con tendencia negativa corresponden a los colores verdes y los de tendencia positiva corresponden a los rojos. El valor mínimo para esta variable es 2.
- **c) Amarillamiento (b);** varían de -60 a +100 siendo los azules los valores negativos, mientras que los amarillos corresponden a valores positivos. En condiciones comerciales el valor adecuado de amarillamiento cutáneo *in vivo* es de 18-20 UA (b+), o bien 46-47 UA (b+) para canales refrigeradas o 41 como valor mínimo. La determinación del color de la piel del pollo de engorda por este método elimina la subjetividad de las lecturas y evita la variación entre las personas que realizan la medición, aunque el precio del equipo es relativamente alto (Janky, 1986).

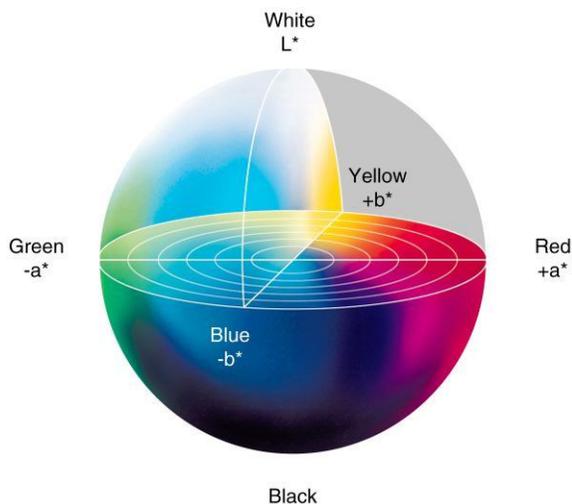


Figura 5. Escala de colores según el método CIE Lab^{‡‡}

Tomado de: <http://disenoypreimpresionmozadr.wordpress.com/2012/03/20/traductor-universal-de-color-espacio-cielab/>

1.5.2. Métodos indirectos

Análisis químico del pigmento; se basa en la extracción y cuantificación de los pigmentos ya sea individualmente o en grupo. El análisis cuantitativo de los carotenoides involucra un manejo adecuado de los materiales que se requieren en el proceso. Durante la manipulación de los carotenoides se requiere de atmosferas inertes, reducción de la presión, luz tenue, temperaturas bajas y solventes libres de ácidos y peróxidos. La cuantificación de carotenoides se basa en la absorción de luz visible (Krinsky, 2001).

- **HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución);** esta técnica se basa en la separación, identificación y cuantificación de los pigmentos. Es un proceso lento. Se aplica una pequeña presión hidrostática para hacer que los fluidos pasen a través de una columna y la elución requiere de varias horas, por lo que no se recomienda utilizar esta técnica para compuestos sensibles (Skoog, 2001).

^{‡‡} El CIE L*a*b* (CIELAB) es el modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano. Fue desarrollado por la *Commission Internationale d'Eclairage* (Comisión internacional de la iluminación), razón por la cual se abrevia *CIE*.

- **Cromatografía de gases;** tiene una aplicación muy amplia en la separación y medición de los componentes de muestras de naturaleza variada. Sin embargo, en muestras complejas, el análisis cualitativo es limitado, por lo que suele emplearse en conjunto con otras técnicas como la espectroscopía de masas (Skoog, 2001).
- **Espectroscopia de masas;** es una técnica esencial para la identificación de carotenoides, requiere solo una pequeña cantidad de la muestra a analizar. Su capacidad de identificación tiene poca probabilidad de error, ya que proporciona el espectro específico para cada molécula, proporcionando información estructural para cada molécula, además mide la concentración de la sustancia a analizar (Skoog, 2001).
- **Espectroscopia molecular o espectrofotometría de luz VIS-UV;** Se pueden identificar y cuantificar moléculas, con el empleo de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar y forman un producto coloreado que permite detectarlo en muestras (Skoog *et al*, 2001; Valladares, 1994).

1.6. Metodología para la evaluación de los niveles de carotenoides en el plasma sanguíneo y diversos tejidos

Debido a que los mecanismos bioquímicos por los cuales los carotenoides son absorbidos en el intestino delgado no están claramente establecidos, se han desarrollado diversos métodos para la determinación de niveles de carotenoides no solo en el plasma y sus fracciones, sino en una variedad de tejidos humanos y de animales, incluidos órganos mayores como el hígado y pulmón, además en próstata, retina, células de la mucosa bucal y tejido cervical, en el caso de humanos. (Allen, 1987; Krinsky, 2004)

En el plasma del pollo de engorda, las xantofilas están ligadas a lipoproteínas de alta densidad, y el hígado, la piel y la grasa son los sitios que funcionan como almacén de los carotenoides (en formas esterificadas) que son aportados a través de la dieta. En condiciones normales, los niveles plasmáticos de carotenoides del pollo de engorda son un reflejo de la proporción que se absorbe en el intestino, la proporción que se elimina a través de la bilis, y de la cantidad que se deposita en los sitios de almacén (Allen, 1987).

Aceves (2004) cuantificó el nivel de xantofilas derivadas de la flor de cempasúchil en el plasma de pollos Ross alimentados con una dieta que contenía 85 ppm y reportó que el nivel de carotenoides fue constante a partir del día 14 al 21 de haber iniciado el consumo del alimento pigmentado y este mismo incremento se observó en la cantidad de xantofilas de *Tagetes erecta* depositadas en el intestino delgado, en donde sin importar la semana de consumo del pigmento, se encontró una mayor concentración en la mucosa de yeyuno e íleon, y a partir del día 28 de consumo de alimento la concentración de xantofilas disminuyó en íleon y duodeno.

Breithaupt *et al.*, (2003) midieron el nivel de carotenoides en el plasma de aves Leghorn alimentadas con una dieta suplementada con luteína libre y esterificada, y no encontraron diferencia estadística entre los niveles plasmáticos después de la primera semana.

Castañeda *et al.*, (2005) encontraron que sin importar el origen del pigmento (natural o sintético) a nivel plasmático, se alcanzó una meseta a los 28 días de consumo del alimento pigmentado, pero que las aves alimentadas con pigmento sintético alcanzaron niveles mayores en plasma que las aves alimentadas con pigmento natural.

Park *et al.*, (1998) reportaron que los niveles plasmáticos de la luteína+zeaxantina son dosis-dependiente del nivel de xantofilas naturales suplementado a las dietas de ratones hembra.

No solo la cuantificación de los carotenoides sino también el análisis cualitativo es importante, Teixeira y Meleiro (2008) alimentaron a pollos Cobb machos con una dieta en base a maíz amarillo e identificaron a la zeaxantina como el mayor carotenoide a nivel plasmático y éste fue usado para la expresión de los resultados.

El análisis y cuantificación del pigmento en el plasma da posibles puntos de vista de cómo se lleva a cabo el proceso de absorción de los pigmentos que son administrados en la dieta, debido a que la cantidad que se absorbe en intestino tienen una influencia directa sobre los niveles del pigmento en el plasma (Allen, 1987).

Al respecto se han desarrollado y modificado diversas técnicas para poder determinar la cantidad de xantofilas que se encuentran en el plasma, dentro de las más importantes destacan la metodología de:

- Wilson, 1956 (μg de zeaxantina/ml de plasma)
- Allen, 1987 (μg de carotenoides/ml de plasma)
- Ruff *et al.*, 1975 (equivalentes de β -caroteno/ml de plasma)
- Fletcher, 1977 (μg de pigmento rojo y amarillo/ml de plasma)
- Kahachik *et al.* 1997 (μmol de luteína y capsantina/ml de plasma)

Para cuantificar el pigmento en el plasma las técnicas comúnmente empleadas son la espectrofotometría de luz UV, la cromatografía líquida de alta resolución y la espectroscopia de masas.

Es necesario primero determinar qué carotenoide va a cuantificarse, para elegir la longitud de onda adecuada y los solventes necesarios para la obtención de carotenoides:

- Allen (1987), 478 nm (curva estándar de luteína)
- Fletcher (1977), 423 nm para pigmento Amarillo y 473 nm para pigmento rojo (curva estándar de caroteno)
- Perez-Vendrel (2001), 445 nm para luteína y 450 nm para zeaxantina (curva estándar de carotenoides de flor de cempasúchil)
- Wilson (1956), 190-500 nm (curva estándar de zeaxantina)

El uso de los niveles del pigmento en el plasma es un indicador rápido y sensible para detectar cambios en la absorción de los pigmentos, en comparación con la medición de pigmento en piel.

1.7. Factores que afectan la pigmentación

Existen diversos factores que pueden afectar la pigmentación amarilla en piel del pollo de engorda como los relacionados con la zona geográfica, al ave, al producto pigmentante y al manejo (Cuadro 2.).

Cuadro 2. Factores que afectan la pigmentación amarilla de la piel del pollo de engorda

Relacionados a la zona geográfica	Relacionados a las aves	Relacionados al producto pigmentante	Relacionados al manejo
	Salud intestinal	Origen	Tipo de iluminación
	Genética		Que afectan el consumo
Cultura y costumbres de los consumidores		Nivel de inclusión de pigmento y tiempo de consumo	
	Edad	Tiempo de almacenamiento	Procesamiento del pollo
	Sexo	Presentación física Interacción con otros ingredientes	

1.7.1 Relacionados a la zona geográfica

Cultura y costumbres de los consumidores; las preferencias en relación a la pigmentación de los pollos de engorda son mucho más variables que con la yema del huevo, hay países donde se prefieren a los pollos con piel blanca, otros lo exigen con diferentes tonos de amarillo y algunos otros con ligero tono anaranjado. La preferencia está ligada a conceptos erróneos y apreciaciones subjetivas, en ocasiones se prefiere un pollo de piel blanca por considerar que sería un animal con menor grasa, el amarillo intenso está asociado a una buena salud (Montilla *et al.*, 1984).

El color es un aspecto clave en la calidad de los alimentos y no debe subestimarse. Los colores fuertes estimulan el apetito, la digestión y aumentan el gusto por comer; la mayoría de la gente prefiere un buen color en la piel del pollo de engorda sobre el peso, el aseo o incluso la marca al momento de comprar, ya que esto les representa un signo de frescura. En el caso del color de la yema del huevo, los consumidores consideran esta característica como un indicador de la calidad del huevo (Suarez, 2000; Fletcher, 1992).

De manera común, en la industria avícola, suele agregarse carotenoides en el alimento de las aves para asegurar el nivel más adecuado para minimizar las fluctuaciones en el color final de la piel del pollo de engorda y así garantizar la satisfacción del consumidor (Suarez 2000).

1.7.2. Factores relacionados al pigmento

1.7.2.1. Origen

Fuentes naturales: En décadas pasadas, se incluían ingredientes ricos en carotenoides en las dietas para pollo de engorda como (Castañeda, 2005, Quart *et al.*, 1988, Cuca *et al.*, 2009):

- Maíz amarillo; es un ingrediente rico en trans-luteína, pero la cantidad de trans-zeaxantina es elevada.
- Gluten de maíz amarillo; posee un alto contenido de xantofilas, pero la proteína es de bajo valor biológico.
- Harina de alfalfa; es un ingrediente rico en luteína y zeaxantina, el origen de la cosecha, las condiciones de cultivo y recolección pueden afectar el grado de pigmentación en los animales.
- Flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*); en su composición cuenta con 90% de luteína y 10% de zeaxantina y otros carotenoides sin valor pigmentante.
- Frutos del género *Capsicum*; principalmente provee xantofilas rojas para lograr la tonalidad anaranjada en la yema del huevo.

Fuentes sintéticas: entre los pigmentos sintéticos se encuentran (Pérez-Vendrell *et al.*, 2001, Castañeda *et al.*, 2005):

- Cantaxantina; es el principio activo para los pigmentos rojos sintéticos. Incrementa el grado de pigmentación cuando la dieta, además contiene carotenoides amarillos.
- Apoester; proporciona una tonalidad amarilla similar a la que da la zeaxantina. La efectividad de un pigmento natural o sintético depende de su contenido de carotenoides y de la disponibilidad de estos, debido a lo anterior, la cantidad total de pigmento administrada durante un determinado periodo afectará la pigmentación cutánea. La concentración de carotenoides en la dieta varía dependiendo del nivel de pigmentación que se demande en cada región (Vicente, 2000; Cuca *et al.*, 2009).

La cantidad que se añade de xantofilas amarillas en la dieta, puede ser menor cuando se incluyen alguno de los ingredientes antes mencionados o bien cuando se combina pigmento natural y sintético. Cuca *et al.*, mencionan que la dosis de xantofilas amarillas puede reducirse a 80 mg/kg en dietas de pollo de engorda y 8 mg/kg para gallina de postura cuando se añade pigmento sintético rojo o cantaxantina a razón de 10 mg/kg.

Castañeda *et al.*, (2005) sugirieron que los pigmentos sintéticos se absorben mejor a nivel intestinal, pero los pigmentos naturales alcanzan mejores tonalidades de amarillo en la piel.

1.7.2.2. Tiempo de consumo y nivel de inclusión de pigmento en la dieta

Debido a que las aves no son capaces de sintetizar los carotenoides de *novo* dependen de la cantidad suministrada en la dieta, si las aves no consumen la cantidad suficiente de carotenoides para saturar los tejidos de depósito, no se obtendrá el color esperado (Sirri *et al.*, 2007).

Para lograr una pigmentación cutánea aceptable para el mercado mexicano, es común añadir pigmento a las dietas durante las últimas 4 semanas del ciclo de producción. En el proceso de pigmentación los diversos tejidos responden de manera distinta, en la grasa el metabolismo es rápido por lo que un cambio de color se observa a corto plazo, en la epidermis existe un fenómeno de descamación por lo que el cambio de color es menos rápido que el de la grasa (Cuca *et al.*, 2009).

Las xantofilas en las aves tienen la característica de acumularse en casi todos los tejidos, la piel, grasa subcutánea, hígado, órganos reproductivos y en la yema del huevo, exceptuando la retina. La presencia de anillos β en la molécula de las xantofilas les confiere una alta polaridad, lo que determina en parte, las características distintivas durante la absorción, transporte, metabolismo y depósito en los tejidos (Liaaen, 2004).

Bilgili *et al.* (2009) mencionaron que mientras más días se proporcione alimento con pigmento amarillo a las aves, mayor será el depósito de éste en su piel. Cortés (2005) sugirió que es importante asegurar un consumo mínimo de xantofilas en un periodo que va desde el día 21 hasta los 49 días de edad (28 días máximo).

Cuca *et al.* (2009) mencionaron que de manera práctica puede incluirse una dosis baja de pigmento (10-12 g de xantofilas de *Tagetes erecta* /Ton de alimento) desde el primer día de vida hasta las 4 semanas de edad del pollo de engorda ocasionando un mayor depósito de xantofilas en los tarsos y piel, debido a la existencia de una base primaria de pigmento, y que durante las últimas 4 semanas es suficiente administrar 40-60 g de xantofilas amarillas/Ton para adquirir una buena pigmentación.

Martínez (2003) adicionó 60, 70 y 80 ppm de xantofilas amarillas saponificadas en el alimento finalizador de pollos de engorda y reportó que como mínimo son necesarias 80 ppm de xantofilas amarillas para obtener al menos 20 unidades de amarillamiento en piel *in vivo* (UA).

Por otro lado, Muñoz (2009) menciona que es posible llegar a 20 UA utilizando dosis de 141 a 162 ppm en los últimos 14 días del ciclo de producción del pollo de engorda, encontrando que la disminución por cada día que las aves no consumen el pigmento es de 0.11 UA y que la pérdida de pigmentación es más severa en las hembras; también señala que las hembras ganan 1.73 UA más que los machos. Otro experimento realizado también por Muñoz (2009) donde la dieta contenía diferentes niveles de energía metabolizable y cada nivel tenía una inclusión de 85 ppm, encontró que por cada 100 kcal/kg de incremento de energía metabolizable en la dieta se incrementan 2 UA en la pigmentación cutánea, por cada día de consumo la pigmentación mejora 0.13 UA, y en las hembras 1.77 UA más que los machos.

1.7.2.3. Tiempo de almacenamiento

Las condiciones de almacenamiento afectan el grado de pigmentación en las aves, ya que estos se. El contacto prolongado con el calor, humedad, luz y el oxígeno alteran sus características, incluso puede existir una transformación de las formas *trans* a *cis* afectando significativamente su valor pigmentante (Ávila, 1990; Fernández, 2000).

Sirri *et al.* (2007) reportaron que la concentración de un producto comercial al comenzar un experimento fue de 14.7 g/kg de xantofilas, luego de 10 semanas, se redujo a 10.4 g/kg y después de 20 semanas a 8.9 g/kg de xantofilas.

Para prevenir esto es común el uso de antioxidantes como la etoxiquina y el BHT; al respecto Potter *et al.* (1956) notaron un ligero incremento en la pigmentación del pollo de engorda con el uso de BHT como antioxidante.

Hencken (1992) en un estudio *in vitro* reportó que la cantidad de formas *trans* en compuestos naturales es de aproximadamente 60 a 90% y del 30 a 10% de formas *cis* y que los carotenoides en forma *trans* proporcionaron mejor pigmentación.

1.7.2.4. Presentación física

Los productos derivados de la flor de *Tagetes erecta* se comercializan de diversas formas:

- **Forma líquida;** es una emulsión de xantofilas, se utiliza agua además de un surfactante y para su almacenamiento son necesarios tanques especiales (Fernández, 2000, Vicente, 2000).
- **Polvo;** la desventaja de este tipo de presentación es el tamaño desigual de las partículas, ya que se emplea como vehículo el “bagazo” de la flor de cempasúchil, si no hay un mezclado homogéneo, la pigmentación final puede ser de mala calidad (Fernández, 2000, Vicente, 2000).

1.7.2.5. Interacción con otros ingredientes

Algunos ingredientes que se utilizan para la formulación de dietas para pollo de engorda pueden interactuar con los carotenoides:

- **Aceites o grasas;** la adición de niveles crecientes de grasa mejora la absorción de los carotenoides. Los lípidos promueven la pigmentación, este proceso se ve favorecido por la presencia de ciertos tipos de grasa (ácidos grasos de cadena corta o ácidos grasos insaturados de cadena larga). En general los aceites o grasas de origen animal tienen un efecto negativo sobre la pigmentación (Fernández, 2000; Vicente, 2000; Raghavan, 2001).

Schaeffer y Hamilton (1990) encontraron que la adición creciente de grasa a partir de 2 a 6% mejora la absorción de carotenoides. Cuando los niveles son mayores también se incrementa la velocidad de tránsito del alimento por el intestino y los efectos son negativos.

La absorción de carotenoides dependerá en cierto grado del tipo de grasas en la dieta. Los ácidos grasos saturados de cadena corta (p. ej. ácido laurico), promueven la absorción debido a que favorecen la formación de micelas lipídicas, mientras que los triglicéridos y ácidos grasos insaturados de cadena larga favorecen la absorción en menor grado (Hencken 1992).

Hamilton (1992) observó que existe una relación lineal, entre el contenido de lípidos en la dieta y en el contenido plasmático de luteína.

- **Vitamina E;** es conveniente emplear vitamina E debido a sus características antioxidantes. Es común el empleo de la etoxiquina y el BHT para prevenir la oxidación de las grasas, xantofilas y vitaminas liposolubles. Debe considerarse que entre mayor sea el nivel de grasa o aceite en el alimento el nivel de vitamina E suplementado también debe ser mayor (Ávila 1999).

Cuando el nivel de vitamina E en las dietas no es suficiente, el organismo moviliza los carotenoides para que sean utilizados como antioxidantes, lo que genera una disminución en el proceso de depósito de los carotenoides en los tejidos (Fernández 2000).

- **Vitamina A;** concentraciones mayores a 25,000 UI/kg provocan una competencia entre la absorción de los carotenoides y la vitamina A, por otra parte una deficiencia ocasiona alteraciones de concentración de pigmentos en algunos tejidos (Fernández 2000).

1.7.3. Relacionados al manejo

1.7.3.1. Tipo de iluminación

El tipo de luz (natural o artificial), repercute sobre la pigmentación de la piel del pollo de engorda. Janky (1983) reportó que los animales criados con luz natural obtienen una mayor pigmentación cutánea en comparación con los pollos criados con luz artificial, esto se debe a que la luz UV promueve la transformación del 7—dehidrocolesterol (presente en la piel de los animales) a vitamina D₃. Ya que se ha demostrado que esta vitamina tiene influencia sobre la pigmentación, en humanos la pigmentación ocurre después de que la piel es expuesta a la luz solar y la irradiación es suficiente para que los niveles de vitamina D₃ aumenten, ya que esta vitamina tiene un efecto directo sobre los melanocitos (Tomita *et al.*, 1988).

Muñoz *et al.* (2012) proporcionaron diferentes niveles de iluminación para verificar su efecto sobre la pigmentación cutánea de pollos Cobb, utilizando mallasombra de diferentes cierres de tejido, encontrando que la pigmentación cutánea incrementa 0.015 UA (unidades de amarillamiento) por cada 1% que se incremente la intensidad de luz.

1.7.3.2. Factores que afectan el consumo

Los sistemas de crianza y las prácticas de manejo en los pollos de engorda tienen un impacto sobre la calidad de la pigmentación con la que llegan al final del ciclo. Animales sometidos a manejos excesivos o alojados en instalaciones inadecuadas manifiestan mayor estrés y un menor consumo de alimento y por lo tanto también en el consumo de xantofilas por lo que la pigmentación será menor (Fernández, 2000; Vicente, 2000).

La calidad e integridad de la piel, representa uno de los atributos más importantes para la distribución del producto y la aceptación por parte de los consumidores (Bilgili *et al.*, 2009).

1.7.3.3. Procesamiento del pollo

El estrés de la manipulación, captura, transporte, los golpes, el aturdimiento, escaldado, desplume mecánico y las contaminaciones durante el enfriamiento, son factores que afectan negativamente la pigmentación de la piel durante el procesamiento del pollo de engorda.

- **Manchas de sangre (hemorragias);** generalmente se deben a traumatismos antes o durante la captura o el transporte y a que hay ruptura de vasos sanguíneos y la hemoglobina se va degradando a biliverdina o bilirrubina haciendo que la piel tenga una coloración verdosa. También puede deberse a un mal desangrado o incluso a micotoxinas, ya que estas provocan fragilidad vascular. Las medidas para evitar este problema consisten en revisar el voltaje, amperaje del aturdidor y el tiempo de desangrado (Harms *et al.*, 1977; Cortes 2005; Bilgili *et al.*, 2009).

- **“Pollo tallado”;** durante el procesamiento de las canales, es importante considerar la temperatura durante el escaldado ya que temperaturas mayores a 60°C, ocasionan una separación de la epidermis y “arrastrado del pigmento” lo que provoca que el pollo pierda coloración, esto se conoce como “pollo tallado” dando una apariencia moteada a la piel, debido a una pérdida de aproximadamente el 30% de los depósitos subcutáneos de las xantofilas. La temperatura ideal para el agua de escaldado es de 52-53 °C y el tiempo recomendado es de 1 minuto con 15 segundos, esta temperatura ayudará a disminuir la fuerza necesaria para realizar el desplume, el tipo de desplumadora es otro factor importante para el buen cuidado de la epidermis, las desplumadoras que contienen muchos dedos en sus masas serán muy agresivas en las zonas donde el pollo ya fue desplumado, se prefiere desplumadoras que tengan de 6 a 8 dedos (Cortes 2005; Bilgili *et al.*, 2009; Cuca *et al.*, 2009).

1.7.4. Relacionados a las aves

1.7.4.1. Salud intestinal

Cualquier enfermedad que disminuya el consumo de alimento o provoque su rechazo, causará una reducción en el consumo de la cantidad de pigmento. Además, las enfermedades que causen lesiones en la mucosa intestinal, afectarán particularmente el mecanismo de absorción y depósito de los carotenoides (Pérez-Vendrell *et al.*, 2001; Schaeffer y Hamilton 1990).

- **Coccidiosis**; la infección por parásitos del género *Eimeria*, se caracteriza por lesionar el epitelio intestinal y por lo tanto afecta negativamente la digestión y absorción de nutrientes y aditivos como el pigmento. Las aves manifiestan baja de peso, mala uniformidad y menor pigmentación amarilla en la piel (Allen, 1987; Ruff *et al.*, 1975; Fadly *et al.*, 2008).

El mecanismo que origina una mala pigmentación de la piel de pollos de engorda, es distinto dependiendo de la especie de *Eimeria* :

- Allen (1987) reportó un menor pH en el intestino delgado ocasionado por la infección con *Eimeria acervulina*, que interfiere con la absorción de carotenoides en el intestino.
- Ruff (1975) encontró que *Eimeria tenella*, no provoca alteraciones en el pH del intestino, pero los niveles de carotenoides en el plasma disminuyen debido a que del día 5 al 7 post-infección produce hemorragias y provocan la pérdida de sangre en ciegos y por lo tanto también de carotenoides (Fadly *et al.*, 2008).
- **Micotoxinas**; además de causar una enteritis, en particular las micotoxinas de tipo dermonecróticas, producen un rechazo al consumo de alimento; mientras que las aflatoxinas alteran la esterificación de la luteína disminuyendo su transporte y absorción. Al haber una baja disponibilidad de las formas esterificadas, aumenta el “secuestro” de luteína en el hígado y disminuye el depósito de pigmento en la piel o yema del huevo (la severidad del daño dependerá de la cantidad de aflatoxinas ingerida y el tiempo de consumo) (Schaeffer y Hamilton 1990; Cheng *et al.*, 2001).

1.7.4.2. Genética

No todas las estirpes presentan la misma eficiencia para depositar el pigmento en piel, probablemente este hecho se relaciona con la diferente cantidad de grasa subcutánea entre cada estirpe (Harms *et al.*, 1977, Bilgili *et al.*, 2009).

1.7.4.3. Edad

Los pollos de engorda bajo condiciones normales ganan peso conforme la edad aumenta, esto resulta en un mayor depósito de grasa en la canal, lo cual permite una mejor pigmentación, en general a mayor cantidad de grasa mayor pigmentación, aunque debe considerarse que la oxidación de las xantofilas en el tracto digestivo se incrementa también conforme el ave tenga mayor edad (Ávila, 1990; Bilgili *et al.*, 2009).

1.7.4.4. Sexo

Tyczkowski y Hamilton (1986), Juárez (2002), Martínez *et al.* (2004), Castañeda *et al.* (2005) y Muñoz (2009) han evidenciado que las hembras alcanzan una mayor pigmentación cutánea en comparación con los machos, esta característica va ligada a la mayor capacidad de depósito de grasa en las hembras. Las xantofilas, al ser sustancias solubles en lípidos se fijan en la grasa, por lo que la pigmentación de la piel es mayor en las hembras; además, se ha sugerido que la diferencia en la pigmentación cutánea en machos y hembras se debe a la presencia de hormonas sexuales femeninas, y en algunas otras especies de aves se debe específicamente a hormonas hiposifariarias (Hudon 1994; Cortes 2005).

Si bien, las causas del porque existe diferencia en la pigmentación cutánea entre machos y hembras está establecida, es importante saber cuántas UA expresadas como b+ ganan las hembras a comparación de los machos, al respecto existen pocos estudios que cuantifiquen esta ganancia.

Muñoz (2009) encontró que las hembras alimentadas con una dieta que contenía niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* de 75 hasta 172 ppm pigmentan 1.77 UA más que los machos. En otro experimento realizado por Muñoz (2009), en donde se adicionó 85 ppm de xantofilas de flor de cempasúchil a dietas con diferente nivel de energía metabolizable (2800 a 3400 kcal/kg), la ganancia en las hembras fue de 1.73 b+ mayor a los machos.

Además de evaluar las unidades de amarillamiento dependiendo del sexo de las aves, Muñoz (2009) concluyó que por cada 100 kcal de energía metabolizable (EM) que se incrementaron en la dieta, la coloración amarilla de la piel aumentó 0.13 UA (b+) en aves alimentadas con 85 ppm de xantofilas de flor de cempasúchil y 2800 a 3400 kcal de EM.

Para conocer el nivel y dosis de inclusión del pigmento adecuado en las dietas de pollo de engorda, es necesario conocer la cantidad de xantofilas que es aprovechada por las aves y tener en cuenta la importancia de cuantificar la cantidad de pigmento que se deposita en los diversos tejidos, órganos, sangre y cuál es la cantidad que se elimina; de tal manera que si se presentan problemas en la pigmentación cutánea del pollo de engorda, sea posible llegar a predecir el tiempo y la dosis del pigmento necesario para corregir una mala pigmentación.

2. JUSTIFICACIÓN

En México, un factor de gran importancia económica es alcanzar una pigmentación amarilla intensa en la piel y en los tarsos del pollo de engorda finalizado. La relación entre la salud de los pollos de engorda con un mayor nivel de pigmentación amarilla cutánea, genera preferencia por parte de los consumidores hacia los pollos que tengan la piel y los tarsos más pigmentados, alcanzando mayor demanda y precio de venta en pie sobre los pollos que no poseen esta característica.

A pesar de la importancia económica que la pigmentación amarilla de la piel del pollo de engorda representa para su comercialización y aceptación por parte del consumidor; así como, de la dificultad a nivel práctico de alcanzar los niveles de pigmento amarillo cutáneo rápidamente que demanda el mercado, no existen estudios suficientes que evalúen las cantidades de pigmento de que son absorbidos en el intestino, se transportan en el plasma, se depositan en la piel y se eliminan en las excretas del pollo de engorda actual, y que aporten información de cómo se afectan estos procesos debido a los diferentes niveles de inclusión de pigmento en la dieta y de la diferencia que existe en ellos con relación al sexo del ave; así como evaluar el punto de saturación del ave al administrar grandes cantidades de pigmento.

3. HIPÓTESIS

Si se aumenta la cantidad de xantofilas provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) en las dietas para pollos de engorda hembras y machos a partir del día 21 de edad, el nivel de pigmento en plasma y piel se incrementa en forma proporcional a la cantidad administrada en la dieta y se encuentra un punto de saturación en piel o plasma después de 14 días de consumo de alimento con una concentración mayor a 100 ppm de xantofilas.

4. OBJETIVO

Evaluar *in vivo* y por sexo el nivel de saturación en la absorción y depósito de pigmento cutáneo amarillo del pollo de engorda, mediante la administración de diferentes dosis de xantofilas de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) en el alimento finalizador.

Objetivos particulares

- Medir las variables productivas del pollo de engorda por sexos separados, al adicionar diferentes niveles de xantofilas en la dieta de finalización.
- Evaluar el efecto de adicionar diferentes dosis de pigmento de la flor de cempasúchil a la dieta de finalización (día 21 a 49 de edad) sobre los niveles de pigmento en plasma.
- Evaluar el efecto de adicionar diferentes dosis de pigmento de a la dieta de finalización en la pigmentación cutánea del pollo.
- Determinar el grado de digestibilidad aparente del pigmento en pollos de 21 a 49 días de edad, al usar dietas con diferente concentración de xantofilas amarillas en dietas de finalización.
- Cuantificación de los niveles de pigmento en plasma, piel y su digestibilidad aparente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Instalaciones y cuidado de los animales de experimentación:

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.A.v) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual se localiza en la calle de Salvador Díaz Mirón No.89, en la Colonia Santiago Zapotitlán de la Delegación Tláhuac, Distrito Federal a una altura de 2250 msnm entre los paralelos 19°15´ latitud Oeste. Bajo condiciones de clima templado húmedo Cw, siendo enero el mes más frío, y mayo el más caluroso, su temperatura promedio anual es de 16°C, con una precipitación pluvial anual media de 747 mm (INEGI, 1992).

Se realizaron dos experimentos con pollos de engorda evaluado el amarillamiento cutáneo en jaula y la pigmentación en piso.

Todos los procedimientos de manejo de las aves cumplieron con los requisitos señalados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (CICUAE- FMVZ-UNAM con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999).

Análisis químicos:

La cuantificación de la concentración de xantofilas en plasma, se realizó en la sección de Biología molecular en el laboratorio del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia ubicado en Ciudad Universitaria circuito exterior, Delegación Coyoacán, México D.F., C.P 04510.

La determinación de oxido de titanio en alimento y excretas se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENID-FA) ubicado en el km 1 de la carretera a Colon, en Ajuchitlán, Querétaro.

Cuantificación de xantofilas derivadas de la flor de cempasúchil, en excretas y alimento, se realizó en el laboratorio de control de calidad de Industrias Vepinsa SA de C.V, carretera al campo 35 km, 8 SN. Zona industrial, Los Mochis, Sinaloa.

Experimento 1. Evaluación del amarillamiento cutáneo en jaula

Para realizar la determinación del depósito cutáneo del pigmento, el nivel plasmático de xantofilas de *Tagetes erecta* y la digestibilidad aparente del pigmento en pollos criados en batería, se utilizaron 216 pollos de engorda de la estirpe Ross provenientes de una incubadora comercial. Los pollos a partir del día 21 y hasta los 49 días de edad se alojaron en jaulas en batería Petersime ® dentro de una caseta experimental de ambiente natural.

Se empleó un diseño completamente al azar con 6 tratamientos (diferentes niveles de xantofilas de *Tagetes erecta*), cada tratamiento con 3 réplicas de 6 aves cada para cada sexo, con un arreglo factorial 6X2. Las dietas de finalización fueron con base en sorgo + pasta de soya (Cuadro 3.) para satisfacer las recomendaciones de la línea genética^{§§}.

^{§§} Manual de manejo del pollo de engorde Ross 308. 2009. Aviagen.

Cuadro 3. Composición de las dietas y análisis calculado.

Ingrediente	Tratamientos					
	65 ppm	92 ppm	119 ppm	146 ppm	173 ppm	200 ppm
Sorgo	626.33	623.26	619.29	614.42	608.65	601.97
Pasta de soya	274.79	274.79	274.79	274.79	274.79	274.79
Aceite vegetal	56.27	56.27	56.27	56.27	56.27	56.27
Fosfato de calcio	15.19	15.19	15.19	15.19	15.19	15.19
Carbonato de calcio	13.39	13.39	13.39	13.39	13.39	13.39
Sal	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85	3.85
Pigmento amarillovegetal*	2.17	3.07	3.97	4.87	5.77	6.67
DL- Metionina	3.02	3.02	3.02	3.02	3.02	3.02
L-lisina HCl	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57
Cloruro de colina 60%	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-treonina	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Vitaminas**	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Minerales***	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Bacitracina zinc	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Coccidiostato****	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antioxidante*****	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Nutriente	Cantidad
EM (kcal/kg)	3225
Proteína cruda (%)	19.00
Met+Cis (%)	0.83
Metionina (%)	0.58
Lisina (%)	1.05
Triptófano (%)	0.24
Treonina (%)	0.71
Calcio (%)	0.85
Fósforo disponible (%)	0.42
Sodio (%)	0.16

*FLORAFIL 93 POWDER (Vepinsa): 30g/kg (mínimo) de xantofilas totales.

** Vitaminas/kg: vitamina A 20,000,000 UI, vitamina D₃ 6,000,000 UI, vitamina E 75,000 UI, vitamina K₃ menadiona 9g, tiamina 3g, riboflavina 8g, ácido pantoténico 18 g, niacina 60 g, piridoxina 5g, ácido fólico 2g, biotina 0.02g, cianocobalamina 16mg, ácido ascórbico 200g. Excipiente cbp 1000g.

*** Minerales/kg: Cantidad por kg: manganeso (120.0g), zinc (100.0g), hierro (120.0g), cobre (12.0g), yodo (0.7g), selenio (0.4g), cobalto (0.2g), cbp. (1000g)

**** Coccidiostato: monensina sódica. Solo se adicionó a la dieta de los pollos alojados en piso.

***** Antioxidante: IQ-AN

Se agregó óxido de titanio como marcador a una proporción de 2 kg/ton todos los tratamientos empleados.

El alimento y el agua se ofrecieron a libre acceso durante todo el experimento y se llevaron registros semanales de las siguientes variables productivas: consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia.

Amarillamiento cutáneo

Durante las 4 semanas que duró el experimento se midió la pigmentación de la piel en todos los pollos 2 veces por semana en la zona apterílica costal derecha, con un colorímetro de reflectancia Minolta CR 400® (Martínez, 1996).

Cuantificación de xantofilas en el plasma

Durante estas 4 semanas se obtuvieron dos veces por semana 2 ml de sangre de 3 aves por réplica, por medio de punción en la vena radial con jeringas estériles (23 G X 25 mm), utilizando EDTA (etilendiaminotetracetato) al 2% como anticoagulante. Todas las muestras, fueron protegidas de la luz y mantenidas en refrigeración hasta la determinación de la concentración de carotenoides en plasma por medio de la técnica de *Allen et al.* (1987).

Digestibilidad aparente del pigmento

Para evaluar la cantidad de pigmento que se elimina en las excretas, se realizó un muestreo de éstas el mismo día y a la misma hora a partir de la segunda semana de experimentación, por réplica. Las muestras se mezclaron para homogenizarse y se almacenaron en un ultracongelador a (-70° C) hasta su posterior liofilización. Se enviaron al laboratorio muestras de excretas liofilizadas y una muestra de alimento de cada uno de los 6 tratamientos empleados para determinar la cantidad de xantofilas derivadas de la flor de cempasúchil por medio de HPLC aplicando la metodología USP29 NF24.^{***} A estas mismas muestras, también se les determinó titanio, por medio de la técnica descrita por Jagger *et al.*, (1991).

^{***} USP-NF. 30. Edición 2012. Versión en Inglés.

Análisis estadístico

Para las variables productivas y datos de digestibilidad aparente, se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 6X2, donde el primer factor fueron los diferentes niveles de pigmento adicionado en la dieta (65, 92, 119, 146, 173 y 200 ppm) y el segundo factor correspondió al sexo (hembras y machos) mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde: $i = 1, 2, 3, 4, 5$ y 6 $j = 1$ y 2 $k = 1, 2$ y 3

Y_{ijk} = variable de respuesta

μ = media general

α_i = efecto del i -ésimo nivel de pigmento

β_j = efecto del j -ésimo sexo

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel de pigmento y el j -ésimo nivel de sexo

ϵ_{ijk} = efecto del error experimental

Cuando se detectó diferencia significativa a factores en alguna de las variables, estos fueron comparados mediante la prueba de Tukey con una $P < 0.05$.

Se realizó una regresión múltiple para cada nivel de pigmento para obtener los datos de pigmentación cutánea.

Experimento 2. Evaluación de la pigmentación en piso

Para determinar la pigmentación de la piel con xantofilas derivadas de *Tagetes erecta* se utilizaron 660 pollos de engorda de la estirpe Ross del día 21 al 49 de edad, que se alojaron por sexos separados en corrales en piso dentro de una caseta experimental de ambiente natural.

Se empleó un diseño completamente al azar de 5 tratamientos con 3 réplicas de 22 pollos para sexo. Se empleó un arreglo factorial de 5X2, donde el primer factor fueron distintos niveles de xantofilas amarillas en el alimento y el segundo correspondió al sexo de las aves (hembras y machos).

Las aves fueron alimentadas a libre acceso con las dietas sorgo + pasta de soya de acuerdo con las recomendaciones nutricionales señaladas por la estirpe^{†††} (Cuadro 3) empleadas en el experimento 1 con 5 diferentes tratamiento o niveles de xantofilas de *Tagetes erecta*:

Se llevaron registros semanales de las variables productivas; consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia.

Amarillamiento cutáneo

Se midió la pigmentación cutánea de todos los pollos en la zona apterílica costal derecha con un colorímetro de reflectancia Minolta CR 400® *in vivo* (Martínez 1996). La medición se realizó en todos los animales, una vez por semana a partir del día 21 hasta el día 49 de edad de las aves. Además, se obtuvo el valor mínimo y máximo de la pigmentación en piel y se calculó el coeficiente de variación.

^{†††} Manual de manejo del pollo de engorde Ross 308. 2009. Aviagen.

Análisis estadístico

Para las variables productivas, coeficiente de variación de b+, valores mínimos y máximos de pigmentación en piel (b+) se realizó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 5X2; donde el primer factor fueron los diferentes niveles de pigmento adicionado en la dieta (65, 119, 146, 173 y 200 ppm) y el segundo factor correspondió al sexo; mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde: $i = 1, 2, 3, 4 \text{ y } 5$ $j = 1 \text{ y } 2$ $k = 1, 2 \text{ y } 3$

Y_{ijk} = variable de respuesta

μ = media general

α_i = efecto del i-ésimo nivel de pigmento

β_j = efecto del j-ésimo sexo

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel de pigmento y el j-ésimo nivel de sexo

ϵ_{ijk} = efecto del error experimental

Cuando se detectó diferencia significativa en alguna de las variables, los factores fueron comparados mediante la prueba de Tukey con una $P < 0.05$.

Se realizó una regresión múltiple para cada nivel de pigmento, para obtener los datos de pigmentación cutánea.

6. RESULTADOS

Experimento 1. Jaula

Parámetros productivos

Los datos de peso corporal, ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Datos productivos en pollos de engorda alimentados con diferentes niveles de pigmento en la dieta del día 21 al 49 de edad (Exp 1).

Nivel del pigmento en la dieta (ppm)	Peso inicial (g)		Promedio
	Machos	Hembras	
65	647 ± 20	644 ± 20	646 ± 14 ^a
92	641 ± 20	624 ± 20	633 ± 14 ^a
119	686 ± 20	627 ± 20	657 ± 14 ^a
146	672 ± 20	607 ± 20	640 ± 14 ^a
173	637 ± 20	641 ± 20	639 ± 14 ^a
200	623 ± 20	617 ± 20	620 ± 14 ^a
Promedio	651 ± 8.17 ^a	627 ± 8.17 ^b	
Ganancia de peso (g)			
65	2354 ± 85	2008 ± 85	2181 ± 61 ^a
92	2312 ± 85	1922 ± 85	2117 ± 61 ^a
119	2349 ± 85	1787 ± 85	2067 ± 61 ^a
146	2351 ± 85	2034 ± 85	2192 ± 61 ^a
173	2309 ± 85	2081 ± 85	2194 ± 61 ^a
200	2343 ± 85	2021 ± 85	2181 ± 61 ^a
Promedio	2336 ± 35 ^a	1975 ± 35 ^b	
Consumo de alimento (g)			
65	4518 ± 146	3999 ± 146	4259 ± 103 ^a
92	4305 ± 146	4125 ± 146	4215 ± 103 ^a
119	4595 ± 146	3799 ± 146	4198 ± 103 ^a
146	4665 ± 146	4127 ± 146	4396 ± 103 ^a
173	4512 ± 146	4388 ± 146	4450 ± 103 ^a
200	4542 ± 146	4251 ± 146	4397 ± 103 ^a
Promedio	4523 ± 60 ^a	4115 ± 60 ^b	
Conversión alimenticia (kg:kg)			
65	1.920 ± 0.09	1.998 ± 0.09	1.953 ± 0.06 ^a
92	1.862 ± 0.09	2.155 ± 0.09	2.009 ± 0.06 ^a
119	1.955 ± 0.09	2.148 ± 0.09	2.051 ± 0.06 ^a
146	1.983 ± 0.09	2.027 ± 0.09	2.005 ± 0.06 ^a
173	1.973 ± 0.09	2.117 ± 0.09	2.045 ± 0.06 ^a
200	1.963 ± 0.09	2.120 ± 0.09	2.042 ± 0.06 ^a
Promedio	1.943 ± 0.04 ^a	2.092 ± 0.04 ^b	

Letras distintas en la misma fila muestran diferencia estadística (P<0.05).

Media ± error estándar de la media.

En ninguno de los tratamientos se afectó ($P > 0.05$) la ganancia de peso, conversión alimenticia y consumo de alimento. Se encontró un efecto debido al sexo para la ganancia de peso; los machos tuvieron una mayor ganancia de peso (2336 g) en comparación con las hembras (1975 g) ($P < 0.05$). La conversión alimenticia de los machos (1:1.943 kg:kg) y el consumo de alimento (4523 g) fue estadísticamente diferente con respecto al de las hembras ($P < 0.05$).

El consumo de xantofilas (Cuadro 5) fue aumentando a medida que se incremento el nivel de xantofilas en la dieta. ($P < 0.05$). La variable sexo afectó el consumo de pigmento de los animales. ($P > 0.05$), siendo los machos los que consumieron una mayor cantidad de xantofilas.

Cuadro 5. Xantofilas (mg) consumidas del día 21 al 49 de edad en pollos de engorda alimentados con diferentes cantidades de xantofilas (Exp 1).

Nivel de xantofilas en la dieta (ppm)	Machos	Hembras	Promedio
65	294 ± 23	260 ± 23	277 ± 16 ^f
92	396 ± 23	379 ± 23	388 ± 16 ^e
119	547 ± 23	452 ± 23	499 ± 16 ^d
146	681 ± 23	603 ± 23	641 ± 16 ^c
173	780 ± 23	759 ± 23	769 ± 16 ^b
200	908 ± 23	850 ± 23	879 ± 16 ^a
Promedio	601 ± 9 ^a	550 ± 9 ^b	

Letras distintas en la misma fila o columna muestran diferencia estadística ($P < 0.05$).
Media ± error estándar de la media.

Amarillamiento cutáneo

El efecto de los niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* sobre los días de consumo se muestra en el Cuadro 6. Se puede observar como el amarillamiento cutáneo fue en incremento conforme pasaban los días de consumo del pigmento ($P < 0.05$), siendo diferente la pigmentación entre hembras y machos, los animales alimentados con las dietas de 65 y 92 ppm tuvieron valores de amarillamiento más bajos (17.28 y 20.03 respectivamente) que con las dietas de 119, 146, 173 y 200 ppm, alcanzaron en promedio una pigmentación amarilla similar de 20.77, 21.58, 19.99 y 20.70 UA respectivamente.

El tratamiento con 65 ppm quien obtuvo la menor pigmentación en piel (14.42 b+), seguido del tratamiento de 92 ppm (14.66 b+) respecto al resto de los tratamientos ($P < 0.05$). Los tratamientos que alcanzaron la menor pigmentación (65 y 92 ppm) tuvieron también el menor consumo de pigmento (Cuadro 5).

Cuadro 6. Amarillamiento cutáneo del día 21 al 49 de edad en pollos Ross con dietas que contenían diferente nivel de xantofilas de *Tagetes erecta*. (Exp 1)

Días de consumo del pigmento	Niveles de pigmento en la dieta (ppm)						Promedio
	65	92	119	146	173	200	
7	10.39±1.29	11.69±1.29	13.12±1.29	12.87±1.29	13.14±1.52	12.12±1.29	12.39±0.55 ^c
14	14.13±1.18	15.45±1.18	16.32±1.18	18.19±1.18	20.66±1.18	14.46±1.27	16.59±0.49 ^b
21	13.94±1.18	16.46±1.18	17.50±1.23	20.05±1.23	16.84±1.18	20.44±1.34	17.40±0.50 ^b
28	17.28±1.40	20.03 ±1.48	20.77±1.48	21.58±1.48	19.99±1.48	20.70±1.56	18.70±0.60 ^a
Promedio Machos				18.17±0.74 ^b			
Promedio Hembras				21.94±0.72 ^a			

Literales distintas en la misma fila o columna muestra diferencia estadística significativa. (P< 0.05).

Media ± error estándar de la media

Todos pollos iniciaron con una coloración promedio de 3.06±0.52 UA (b+)

Las figuras 6 y 7 muestran el efecto del consumo de diferentes niveles de xantofilas provenientes de *Tagetes erecta* sobre el amarillamiento cutáneo de acuerdo con el sexo del ave y el tiempo de consumo; las ecuaciones para cada nivel de pigmento se describen en el anexo (Anexo 4), se observa como los pollos alimentados con un nivel de 173 ppm de pigmento, ganan 1.49 UA (b+) por cada día que el pigmento se consumió a diferencia de los pollos alimentados con los demás niveles de pigmento. Las UA promedio que ganan las hembras (1.31 UA) a diferencia de los machos ($P < 0.05$) varía dependiendo del nivel de pigmento añadido en la dieta (Anexo 4), y con el nivel de 173 ppm de pigmento es donde se observa una mayor ganancia de UA en las hembras (2.8 UA), mientras que por cada día de consumo la ganancia promedio es de 1.09 UA y también los animales alimentados con el nivel de 173 ppm de xantofilas ganan más pigmentación (1,49 UA) por cada día de consumo, a diferencia de los otros niveles de pigmento. También se observa un punto de estabilidad en la pigmentación cutánea a partir del día 18 sin importar el nivel de pigmento.

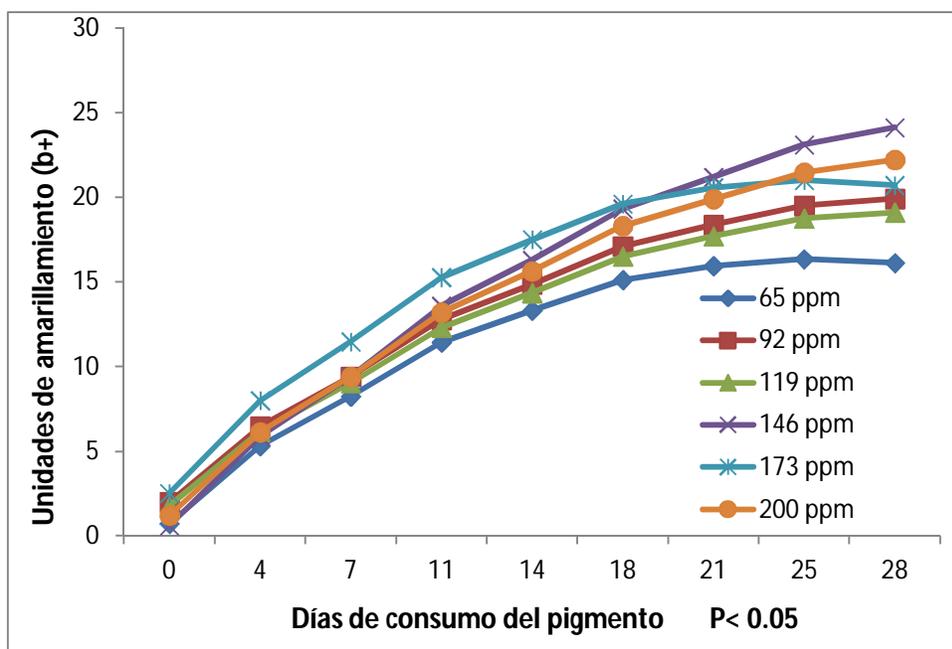


Figura 6. Unidades de amarillamiento UA (b+) en piel de hembras Ross alimentadas con diferentes niveles de xantofilas amarillas de *Tagetes erecta* del día 21 al 49 de edad.

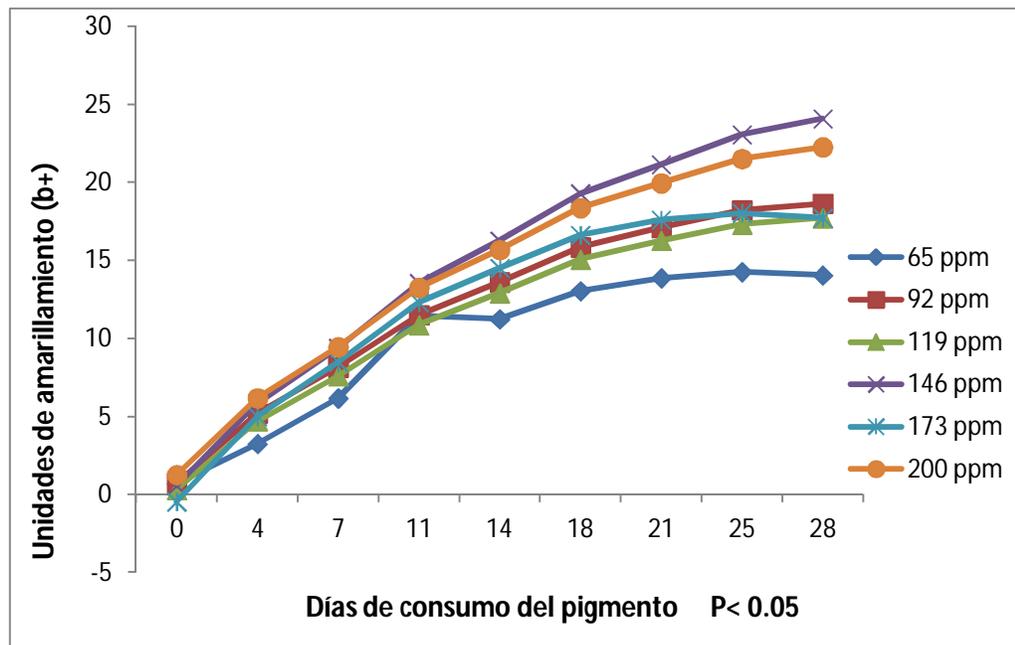


Figura 7. Unidades de amarillamiento UA (b+) en piel de machos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* del día 21 al 49 de edad.

Cuantificación de xantofilas amarillas en plasma

El pigmento promedio inicial (mg/mL) en plasma fue de 1.54 mg/mL, (Cuadro 7), además se muestra que el nivel plasmático en los machos y hembras alimentados con diferentes niveles de xantofilas amarillas en la dieta alcanzaron niveles similares de pigmento en plasma (42.88 y 41.26 respectivamente) ($P > 0.05$)

El Cuadro 7 muestra, que la cantidad más baja de pigmento en el plasma se encontró en los animales alimentados con dietas que contenían 65, 92 y 119 ppm de pigmento (41.36, 43.54 y 45.60 mg/mL respectivamente) y el mayor nivel de xantofilas en plasma se obtuvo con el nivel de 173 ppm (55.47 mg/mL). El nivel estable de pigmento en el plasma, se alcanzó 14 días después del inicio en el consumo de pigmento (45.45 mg/mL)

En la figura 8 se observa como el nivel de pigmento en el plasma va en aumento conforme el pigmento es consumido ($P < 0.05$), por ejemplo el mayor nivel plasmático que se alcanzó en 28 días de consumo con el nivel 65 ppm de xantofilas, puede obtenerse en menor tiempo con los niveles de 92, 119, 146, 173 y 200 ppm, debido a que la cantidad de pigmento que se consumió fue mayor con los niveles más altos de pigmento, además se encontró que el máximo nivel de pigmento en plasma se obtuvo a los 28 días después de iniciado el consumo de pigmento. Los niveles de 65 y 200 ppm tienen un comportamiento lineal, mientras que los demás niveles (92, 119, 146 y 173 ppm) se comportan de manera cuadrática.

Cuadro 7. Xantofilas (mg/mL) en plasma de pollos Ross alimentados con xantofilas de *Tagetes erecta* del día 21 al 49 de edad. (Exp. 1)

Días de consumo del pigmento	Xantofilas (mg/mL) en plasma						Promedio
	65 ppm	92 ppm	119ppm	146ppm	173 ppm	200 ppm	
7	28.35±4.53	36.51±4.53	30.39±4.53	36.40±4.53	36.44±4.81	29.63±4.81	32.95±1.87 ^e
10	40.95±5.24	47.51±5.24	44.84±5.24	46.81±5.23	55.67±6.00	42.99±5.85	45.16±2.23 ^{bcd}
14	37.89±4.53	45.00±4.53	42.78±4.53	45.35±4.53	57.62±4.53	44.09±4.81	45.45±1.87 ^{cd}
17	41.65±4.53	46.66±4.53	46.52±4.53	52.44±4.53	53.50±4.53	44.58±6.54	47.56±1.89 ^{bcd}
21	32.06±4.53	37.59±4.53	38.65±4.53	40.36±4.80	47.74±4.53	40.11±5.48	39.42±2.03 ^{de}
25	42.89±4.53	38.55±4.53	54.50±4.80	56.65±4.80	59.79±4.53	73.11±5.07	54.25±2.00 ^{ab}
28	61.22±4.53	56.86±4.81	57.71±4.80	57.68±4.80	78.59±4.80	62.02±5.07	62.34±1.96 ^a
Promedio	40.71±1.54 ^b	44.09±1.56 ^b	45.05±1.57 ^b	47.95±1.58 ^{ab}	55.76±1.66 ^a	48.07±1.76 ^{ab}	
Machos				42.88±0.92 ^a			
Hembras				41.26±0.94 ^a			

Distintas literales en la misma fila o columna muestran diferencia estadística (P< 0.05)

Media ± error estándar de la media

Promedio inicial para todos los tratamientos 1.54± 1.85 mg/mL de plasma.

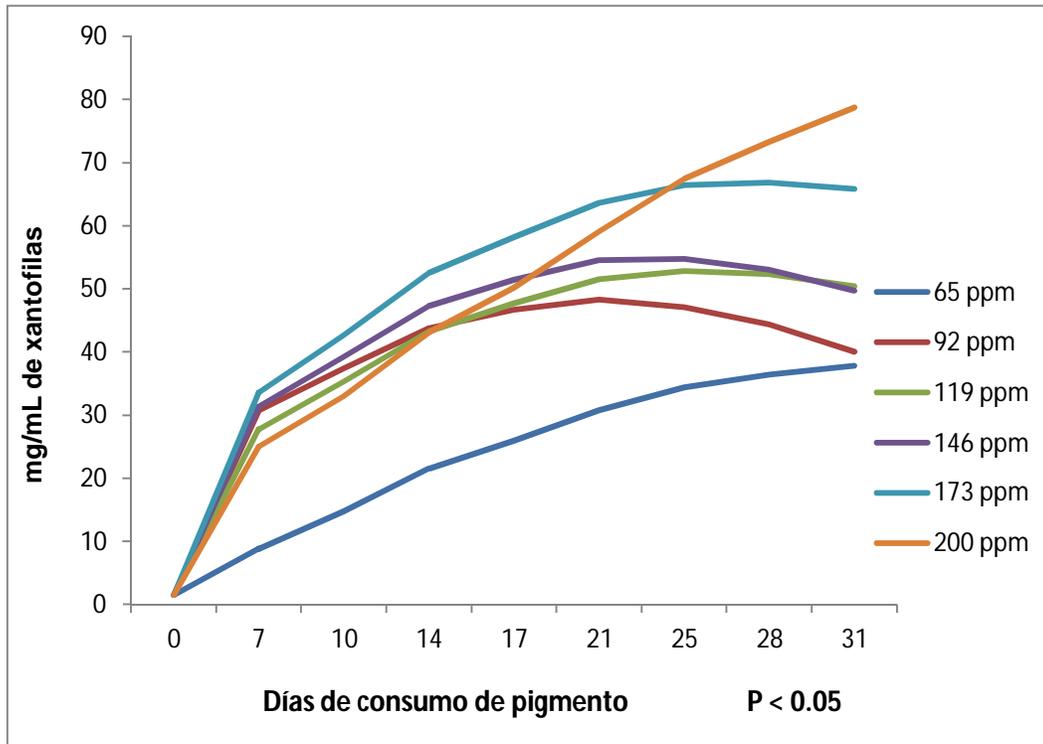


Figura 8. Nivel de xantofilas (mg/mL) en el plasma de pollos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas amarillas en dietas de finalización (día 21 al 49 de edad)

Digestibilidad del pigmento

En relación a la digestibilidad aparente del pigmento (Cuadro 8), ésta fue similar para machos y hembras (81.0 y 79.8% respectivamente) ($P > 0.05$) y que independientemente del nivel de pigmento utilizado en las dietas, la digestibilidad es similar entre cada uno de los tratamientos ($P > 0.05$).

Cuadro 8. Digestibilidad aparente (%) en pollos de engorda con dietas con niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* del día 21 al 49 de edad.

(ppm de xantofilas en la dieta)	Hembras	Machos	Promedio
65	76.60 ± 2.75	78.28 ± 2.25	77.61 ± 1.98 ^a
92	78.11 ± 3.19	77.20 ± 3.19	76.70 ± 1.94 ^a
119	86.28 ± 2.75	84.28 ± 2.75	85.28 ± 1.94 ^a
146	82.97 ± 2.75	74.37 ± 2.75	78.67 ± 1.94 ^a
173	78.57 ± 2.75	83.19 ± 2.75	80.88 ± 1.94 ^a
200	82.82 ± 2.75	83.60 ± 2.75	83.21 ± 1.94 ^a
Promedio	81.06 ± 1.23 ^a	79.82 ± 1.19 ^a	

Distinta literales en una misma columna o fila muestra diferencia estadística ($P < 0.05$)

Media ± error estándar de la media

Experimento 2. Piso

Parámetros productivos

En el Cuadro 9, se muestran los resultados promedio de parámetros productivos en pollos de engorda Ross 308 alimentados con diferentes niveles de pigmento en la dieta del día 21 al 49 de edad.

Cuadro 9. Parámetros productivos en pollos de engorda Ross 308 alimentados con diferentes niveles de pigmento en la dieta del día 21 al 49 de edad. (Exp 2)

Nivel de pigmento en la dieta (ppm)	Peso inicial (g)		Promedio
	Hembras	Machos	
65	713 ± 51	779 ± 51	746 ± 36
119	728 ± 51	795 ± 51	762 ± 36
146	677 ± 51	777 ± 51	727 ± 36
173	674 ± 51	789 ± 51	731 ± 36
200	700 ± 51	730 ± 51	715 ± 36
Promedio	694 ± 25 ^a	769 ± 25 ^b	
Ganancia de peso (g)			
65	1939 ± 83	2175 ± 83	2057 ± 59
119	2041 ± 83	2446 ± 83	2244 ± 59
146	2037 ± 83	2443 ± 83	2240 ± 59
173	2056 ± 83	2207 ± 83	2131 ± 59
200	1998 ± 83	2393 ± 83	2196 ± 59
Promedio	2018 ± 41 ^a	2320 ± 41 ^b	
Consumo de alimento (g)			
65	4388 ± 208	4692 ± 208	4540 ± 147
119	4446 ± 208	5199 ± 208	4823 ± 147
146	4728 ± 208	5156 ± 208	4942 ± 147
173	4641 ± 208	4735 ± 208	4688 ± 147
200	4474 ± 208	5105 ± 208	4790 ± 147
Promedio	4530 ± 104 ^a	4947 ± 104 ^b	
Conversión alimenticia (kg:kg)			
65	2.261 ± 0.09	2.171 ± 0.09	2.216 ± 0.07
119	2.174 ± 0.09	2.126 ± 0.09	2.150 ± 0.07
146	2.315 ± 0.09	2.112 ± 0.09	2.213 ± 0.07
173	2.262 ± 0.09	2.163 ± 0.09	2.212 ± 0.07
200	2.244 ± 0.09	2.144 ± 0.09	2.194 ± 0.07
Promedio	2.244 ± 0.05 ^a	2.141 ± 0.05 ^b	

Distinta letra en la misma fila muestra diferencia estadística ($P < 0.05$)

Media ± error estándar.

Los diferentes niveles de pigmento adicionados a las dietas del pollo de engorda del día 21 al 49 de edad, no afectaron los parámetros productivos (ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia), siendo similares entre ellos ($P > 0.05$) y a los resultados obtenidos en el Experimento 1. El sexo de las aves si tuvo efecto en los parámetros productivos, en el Cuadro 9, se observa como en los machos, el consumo de alimento (4947g) y la ganancia de peso (2320 g) fue mayor en comparación con las hembras (4530 y 2018 g) respectivamente; así como, la conversión alimenticia fue mejor en los machos (1:2. 14 kg:kg) en comparación con las hembras (1:2. 24 kg:kg) ($p < 0.05$)

Amarillamiento cutáneo

El amarillamiento cutáneo promedio fue de 4.71 (b+) al iniciar el experimento, (Cuadro 10) en los pollos alimentados con los tratamientos de 146, 173 y 200 ppm de xantofilas de *Tagetes erecta* en la dieta el amarillamiento cutáneo alcanzado fue similar ($P > 0.05$). Solo se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de 65 y 119 ppm (11.73 y 13.60 UA) respectivamente ($P < 0.05$).

Se observa como la pigmentación cutánea, se incrementa después de 14 días de consumo de pigmento. El amarillamiento cutáneo más alto se obtiene con altos niveles de pigmento (146, 173 y 200 ppm de xantofilas).

Cuadro 10. Amarillamiento cutáneo (b+) en pollos de engorda con distintos niveles de pigmento en la dieta del día 21 al 49 de edad (Exp 2).

Días de consumo de pigmento	Días de consumo de pigmento					Promedio
	65	119	146	173	200	
4	8.21±0.46 ^k	8.16±0.46 ^k	8.61±0.46 ^k	8.65±0.46 ^k	8.50±0.46 ^k	8.43±0.21 ^a
7	11.34±0.34 ^l	13.04±0.34 ^{ij}	13.85±0.34 ^l	14.59±0.34 ^{gni}	14.57±0.34 ^{gni}	13.48±0.16 ^b
14	16.08±0.34 ^a	18.67±0.34 ^d	19.40±0.34 ^{bc}	20.32±0.34 ^c	19.52±0.34 ^{bc}	18.80±0.16 ^c
28	16.29±0.37 ^{ab}	19.74±0.37 ^{bcd}	21.08±0.37 ^{ab}	21.75±0.37 ^a	21.18±0.37 ^{ab}	20.01±0.16 ^d
Machos						18.79±0.23 ^d
Hembras						21.23±0.23 ^a

Distinta letra en la misma fila o columna muestran diferencia estadística (P< 0.05)

Media ± error estándar.

Coloración cutánea promedio al inicio del experimento 4.71±16

El amarillamiento cutáneo más bajo fue la de las aves alimentadas con los niveles de pigmento de 65 ppm seguido por las de 119 ppm (Cuadro 13), estos niveles también obtuvieron los menores consumos de pigmento (300 y 544 mg respectivamente) con respecto al resto de los tratamientos (Cuadro 11) (P <0.05).

Cuadro 11. Pigmento consumido (mg) del día 21 al 49 de edad por pollos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas.

Nivel de pigmento en la dieta (ppm)	Hembras	Machos	Promedio
65	279 ± 25	320 ± 25	300 ± 17 ^e
119	505 ± 25	582 ± 25	544 ± 17 ^d
146	623 ± 25	734 ± 25	678 ± 17 ^c
173	779 ± 25	853 ± 25	816 ± 17 ^b
200	882 ± 25	1058 ± 25	970 ± 17 ^a
Promedio	614 ± 12 ^b	709 ± 12 ^a	

Diferente letra en la misma fila o columna muestran diferencia estadística ($P < 0.05$).
Media ± error estándar.

En la figura 9 se muestra las unidades de amarillamiento en pollos Ross que fueron alimentados con los diferentes niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* durante 28 días, donde se observa un efecto lineal para el nivel de 65 ppm de xantofilas ya que los pollos alimentados con este nivel alcanzaron la máxima pigmentación al día 28 y un efecto cuadrático para los demás niveles de pigmento (119, 146, 173 y 200 ppm), notándose que alcanzaron la máxima pigmentación el día 21 (Anexo 5).

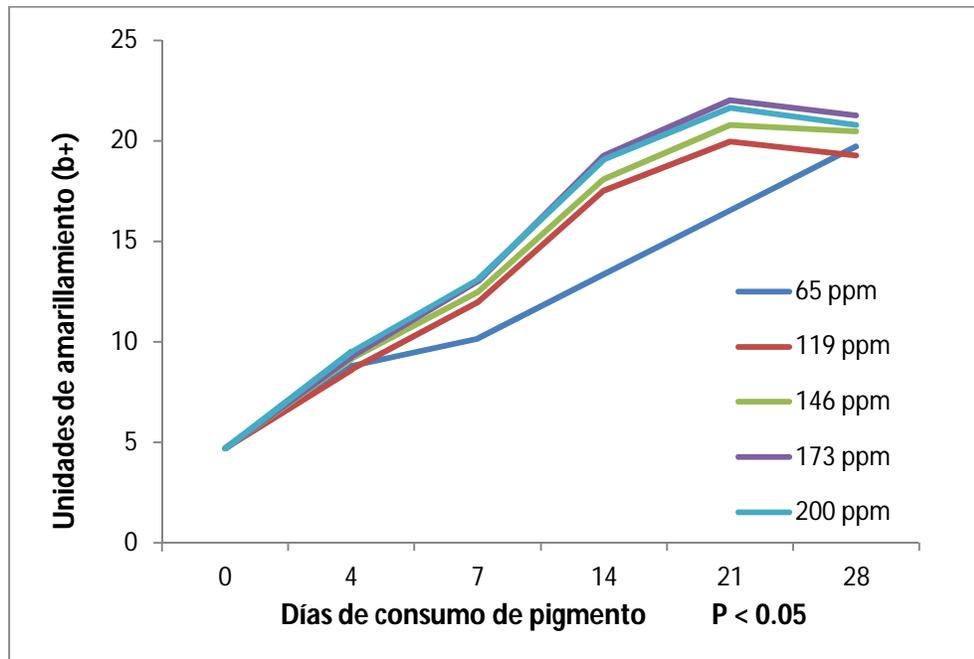


FIGURA 9. Amarillamiento cutáneo promedio en la piel de pollos Ross alimentados con diferentes niveles de xantofilas amarillas durante 28 días (Exp 2)

Cuadro 13. Amarillamiento cutáneo (b+) de pollos Ross alojados en piso del día 21 al 49 de edad con diferentes niveles de xantofilas en la dieta. (Exp 2)

Días de consumo de pigmento	65 ppm		Promedio
	Machos	Hembras	
0	3.95 ± 0.48	4.33 ± 0.48	4.14 ± 0.34
4	8.66 ± 0.65	7.77 ± 0.65	8.21 ± 0.46
7	10.57 ± 0.48	12.11 ± 0.48	11.34 ± 0.34
14	14.46 ± 0.48	17.71 ± 0.48	16.08 ± 0.34
28	14.62 ± 0.52	17.96 ± 0.51	26.29 ± 0.37
119 ppm			
0	4.72 ± 0.48	4.43 ± 0.48	4.58 ± 0.34
4	8.20 ± 0.65	8.12 ± 0.65	8.16 ± 0.46
7	13.18 ± 0.49	12.90 ± 0.47	13.04 ± 0.34
14	18.08 ± 0.49	19.26 ± 0.47	18.67 ± 0.34
28	18.93 ± 0.52	20.55 ± 0.51	19.74 ± 0.37
146 ppm			
0	5.00 ± 0.48	5.30 ± 0.49	5.15 ± 0.34
4	9.03 ± 0.65	8.18 ± 0.66	8.60 ± 0.46
7	13.20 ± 0.48	14.50 ± 0.49	13.85 ± 0.34
14	18.01 ± 0.48	20.80 ± 0.49	19.40 ± 0.34
28	19.23 ± 0.53	22.23 ± 0.53	21.08 ± 0.37
173 ppm			
0	4.04 ± 0.49	5.07 ± 0.48	4.55 ± 0.34
4	8.83 ± 0.65	8.46 ± 0.65	8.65 ± 0.46
7	13.87 ± 0.50	15.31 ± 0.47	14.59 ± 0.35
14	19.59 ± 0.50	20.05 ± 0.47	20.32 ± 0.35
28	20.37 ± 0.56	23.14 ± 0.51	21.75 ± 0.38
200 ppm			
0	4.75 ± 0.49	5.52 ± 0.48	5.14 ± 0.34
4	7.96 ± 0.66	9.04 ± 0.66	8.50 ± 0.47
7	13.48 ± 0.49	15.65 ± 0.48	14.57 ± 0.34
14	18.00 ± 0.49	21.04 ± 0.49	19.52 ± 0.35
28	20.11 ± 0.53	22.26 ± 0.54	21.18 ± 0.37

Distintas letras en la misma fila muestran diferencia estadística (P< 0.05).
Media ± error estándar.

La Figura 10 muestra que al finalizar el periodo de experimentación (28 días) los niveles de pigmento en el alimento tuvieron un efecto sobre la pigmentación cutánea ($P < 0.05$), que los pollos alimentados con 65 ppm no alcanzaron el nivel de amarillamiento requerido por el mercado mexicano (al menos 20 UA en piel *in vivo*), y que para cumplir este requisito es necesaria una inclusión mayor de xantofilas de *Tagetes erecta*.

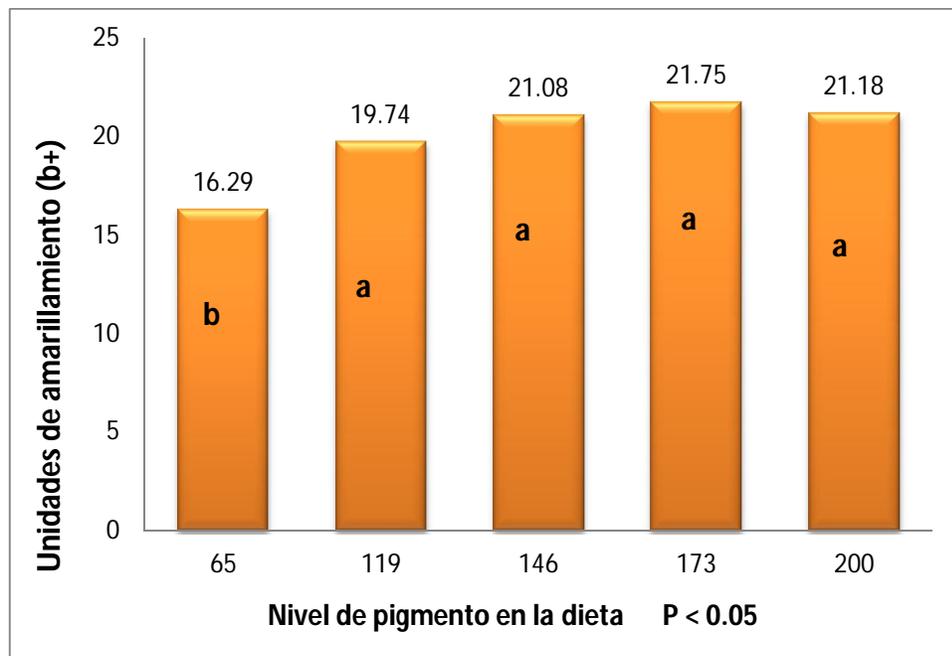


Figura 10. Amarillamiento cutáneo de pollos de engorda alimentados con dietas con diferente nivel de xantofilas de *Tagetes erecta* del día 21 al 49 de edad.

En el Cuadro 14, se muestran los coeficientes de variación correspondientes al amarillamiento cutáneo, se observa como la pigmentación en la piel fue menos variable a partir de los 7 días después de que el pigmento es adicionado a las dietas, con respecto a los distintos niveles de pigmento y al sexo de las aves, no tuvieron efecto sobre el coeficiente de variación ($P > 0.05$).

El Cuadro 15 corresponde a valores mínimos y máximos de amarillamiento cutáneo e indica que durante la primera semana de consumo del pigmento, la pigmentación cutánea en las aves fue la menor durante el tiempo que duro la prueba y se incrementó conforme transcurrieron los días de consumo de pigmento. Además los valores mínimos obtenidos al alimentar a los pollos con 65 ppm (6.68) mostraron un amarillamiento cutáneo menor ($P < 0.05$) al compararse con el de los otros tratamientos (8.11, 8.68, 9.04, 9.50 respectivamente).

Con respecto a los valores máximos de amarillamiento cutáneo los cuales se estabilizaron a partir de la semana 5, además los pollos alimentados con dietas que contenían un nivel de pigmento a partir de 119 hasta 200 ppm alcanzaron los mejores valores de de pigmentación cutánea (20.26 y 21.13 respectivamente) a diferencia de los que consumieron alimento con un nivel de 65 ppm (17.30) de xantofilas amarillas ($P < 0.05$). Además las hembras obtuvieron una mejor pigmentación (20.92) en contraste de los machos (19.55) ($P < 0.05$).

Cuadro 14. Coeficiente de variación (%) del amarillamiento cutáneo durante 4 semanas de experimentación.

Edad*	Nivel de pigmento en la dieta (ppm)										Prom**
	65 ppm		119 ppm		146 ppm		173 ppm		200 ppm		
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	
3	51.98 ±126.92	63.86± 126.92	68.27 ±126.92	61.52 ±126.92	59.12 ±126.92	37.35 ±126.92	73.29 ±126.92	46.42 ±126.92	46.70 ±126.92	48.40 ±126.92	52.68 ±3.00 ^a
4	23.75 ±155.44	19.42 ±155.44	21.56 ±155.44	20.41 ±155.44	20.62 ±155.44	17.05 ±155.44	21.14 ±155.44	16.22 ±155.44	22.05 ±155.44	14.82 ±155.44	19.78 ±3.45 ^b
5	22.21 ±155.44	17.05 ±155.44	20.65 ±155.44	17.64 ±155.44	21.51 ±155.44	15.80 ±155.44	21.42 ±155.44	17.86 ±155.44	20.33 ±155.44	17.96 ±155.44	19.24 ±3.54 ^b
6	28.94 ±155.44	19.90 ±155.44	27.98 ±155.44	21.74 ±155.44	25.30 ±155.44	18.58 ±155.44	26.30 ±155.44	22.67 ±155.44	24.05 ±155.44	22.72 ±155.44	23.82 ±3.45 ^b
7	26.61 ±1555.44	18.74 ±155.44	25.68 ±155.44	22.17 ±155.44	22.67 ±155.44	19.44 ±155.44	23.31 ±155.44	20.23 ±155.44	21.00 ±155.44	22.40 ±155.44	22.42 ±3.4 ^b
Prom**	31.93±3.33 ^a		29.14±3.38 ^a		27.88±3.33 ^a		31.86±3.33 ^a		28.02±3.33 ^a		
Machos						31.33±2.17 ^a					
Hembras						27.47±2.20 ^a					

Distintas letras en la misma fila o columna muestran diferencia estadística (P < 0.05)

Media ± error estándar.

*Edad en semanas

*Promedio

Cuadro 15. Valores mínimos y máximos de amarillamiento cutáneo en pollos de engorda alimentados con dietas de finalización con diferente nivel de xantofilas de *Tagetes erecta*.

Nivel de pigmento (ppm)	Sexo	Semana de edad												Promedio	
		3		4		5		6		7		Min	Max		
65	M	1.27	8.99	5.82	15.30	7.68	19.67	6.57	18.46	7.74	22.08	6.68	17.30		
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±0.47 ^b	±0.57 ^b		
	H	1.58	9.48	7.59	16.56	11.80	23.07	9.43	22.91	12.56	23.98				
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86				
119	M	1.84	9.53	8.68	19.10	10.96	23.35	7.81	25.42	11.79	28.09	8.11	20.26		
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±0.47 ^{ab}	±0.57 ^a		
	H	1.78	9.39	7.80	18.31	12.84	25.91	12.34	26.36	11.53	28.09				
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86				
146	M	1.82	10.86	8.42	17.64	10.69	25.56	13.07	25.13	13.67	28.77	8.68	20.68		
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±0.47 ^a	±0.57 ^a		
	H	2.12	9.42	9.92	19.46	13.79	26.12	13.07	26.89	13.67	28.77				
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86				
173	M	1.79	10.11	7.74	18.96	12.56	27.13	9.73	27.05	11.32	28.30	9.04	21.81		
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±0.47 ^a	±0.57 ^a		
	H	2.66	9.73	10.64	19.84	13.85	28.40	12.73	29.74	14.82	30.78				
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86				
200	M	2.59	9.39	8.55	20.39	11.44	23.90	9.79	24.87	13.70	26.45	9.50	21.13		
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±0.47 ^a	±0.57 ^a		
	H	2.42	10.65	11.89	19.86	15.15	29.15	13.36	27.99	13.13	29.82				
		±1.25	±1.52	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86	±1.53	±1.86				
Prom*	Min	1.89±0.49 ^c		8.62±0.54 ^b		12.12±0.4 ^a		10.42±0.4 ^a		12.12±0.4 ^a					
	Max	9.55±0.70 ^c		18.48±0.66 ^b		25.31±0.66 ^a		25.51±0.66 ^a		27.42±0.66 ^a					
Prom*	M													9.23±0.33 ^a (Min)	
														19.55±0.41 ^a (Max)	
	H													7.54±0.33 ^b (Min)	
														20.92±0.41 ^b (Max)	

Distintas letras en la misma fila o columna muestran diferencia estadística (P< 0.05).

Media ±error estándar.

*Promedio, M= machos, H= hembras

7. DISCUSIÓN

Parámetros productivos

Los resultados de los parámetros productivos de los Experimentos 1 y 2, no fueron afectados por los diferentes niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* adicionadas en las dietas. Esto ha sido demostrado en diversos estudios como los realizados por Pérez-Vendrell *et al.*, (2001), Martínez (2003), Muñoz (2004), Martínez *et al.*, (2004) y Castañeda *et al.*, (2005), quienes reportaron que la dosis del pigmento, e incluso el origen, no tienen un efecto sobre el consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia.

Pérez-Vendrell *et al.*, (2001) reportaron un efecto significativo del sexo de las aves en los parámetros productivos, así como en los niveles de pigmento amarillo en la piel similar a lo encontrado en los experimentos 1 y 2.

La ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia obtenidos por los pollos del experimento 1 y 2 estuvieron dentro de lo que establece el manual de la estirpe *

Amarillamiento cutáneo, cuantificación en el plasma y digestibilidad aparente del pigmento

Los niveles plasmáticos obtenidos en el Experimento 1 (Cuadro 7) fueron altas a comparación de los resultados obtenidos por Castañeda *et al.*, (2005) quienes reportaron un incremento notable a partir de los primeros 7 días de consumo del pigmento, además que el pigmento natural alcanzó el mayor nivel (12.22 y 12.39 µg/mL) utilizando 65 y 85 ppm de xantofilas de *Tagetes erecta* respectivamente en las dietas para pollo de engorda.

Breithaupt *et al.*, (2004) reportaron que después de 1 semana de consumo el nivel plasmático fue de 0.5 a 2.8 µmol/l de luteína+capsantina para pollos Hubbard alimentados con dietas que contenían luteína libre y diésteres de luteína. Teixeira (2008) reportó que los niveles plasmáticos de zeaxantina en pollos Cobb machos alimentados con una dieta a base de maíz amarillo fue de 3.554 µg/mL. La diferencia encontrada en el nivel de xantofilas en el plasma puede deberse al tiempo de consumo, a la dosis de xantofilas añadida a la dieta, e incluso a la técnica empleada para la cuantificación de los carotenoides debido a que los solventes utilizados en cada técnica pueden llegar a afectar la determinación de los carotenoides (Teixeira 2008).

* Ross Broiler. Performance objectives. 2009. Aviagen

Aceves (2004) no encontró diferencia estadística en el nivel plasmático a partir de la 5ª semana, de manera similar, Breithaup *et al.*, (2003) no encontraron diferencia estadística en los niveles plasmáticos de aves Leghorn después de la primera semana de consumo. Kostic *et al.*, (1995) notaron un pico de luteína a nivel plasmático en humanos 16 h después de haber consumido luteína, pero no encontraron un punto de saturación. En ratones, Park *et al.*, (1998) obtuvieron una saturación plasmática de luteína 7 días después, de haber iniciado el consumo de luteína. La saturación a nivel plasmático, se puede relacionar con la velocidad de absorción en el intestino, la cual varía entre especies y sobre todo con la cantidad consumida de carotenoides, por lo cual probablemente en el experimento 1 se encontró un máximo biológico para todos los niveles de pigmento a los 28 días una vez iniciado el consumo de pigmento, a un mayor consumo de xantofilas corresponde un mayor nivel plasmático (mg/mL) por ejemplo, las aves alimentadas con el nivel máximo de xantofilas de *Tagetes erecta* (200 ppm) consumieron en promedio 879 g de pigmento, a diferencia de Aceves (2004) que ofreció dietas que contenían solo 80 ppm, por lo que probablemente no encontró un punto de saturación a nivel plasmático y por lo que tampoco observó un cambio en el nivel plasmático después de la quinta semana. Park *et al.*, (1998) mencionaron que el plasma es rápidamente saturable, ya que se requieren cortos periodos de consumo de pigmento, a diferencia de los órganos que funcionan como almacén de carotenoides, como el hígado o el bazo en donde se requieren de un tiempo más prolongado de consumo para alcanzar un punto de saturación. El efecto lineal del tratamiento con 65 ppm de xantofilas observado en Fig. 8 puede deberse a que esta cantidad de pigmento añadida a la dieta, no es suficiente para saturar el nivel plasmático a los 28 días y así observar un punto de saturación a diferencia de los otros niveles, donde es posible saturar el plasma en un menor tiempo de consumo.

Respecto al amarillamiento cutáneo, en los Experimentos 1 y 2., independientemente del nivel de pigmento en la dieta, se observó un incremento de los valores de amarillamiento en la piel (b+) de pollos de engorda a partir del 7º día de consumo, en donde el valor mínimo fue 8.62 b+ (Cuadro 15) y el valor máximo fue 18.48 b+. Castañeda *et al.*, (2003) encontraron un aumento en la pigmentación cutánea (b+) 7 días después de que las aves iniciaron el consumo del pigmento, sin que el origen o dosis del pigmento afectara este aumento. El incremento del amarillamiento en piel también se encontró en el plasma y puede deberse a la absorción de los carotenoides en el intestino. Aceves (2004) reportó un incremento de carotenoides, en los 3 segmentos del intestino de los pollos de engorda cuando estos consumieron durante 7 días una dieta que contenía xantofilas de *Tagetes erecta*.

El punto de estabilidad para el amarillamiento cutáneo, se encontró después que los pollos consumieron el pigmento por 21 días (a la 6ª semana de edad) (Figura 6 y 7). Aceves (2004) notó que esto puede ser debido a que el proceso de absorción se estabiliza en el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), probablemente este efecto se ve reflejado en la piel logrando que la pigmentación alcance un nivel estable a partir de estos días, en el experimento 1 y 2 el punto de estabilidad es a la misma edad (4ª semana) se infiere que la forma de alojamiento (jaula o piso) no afecta este proceso.

En el experimento 1, se observó que el incremento del amarillamiento cutáneo en ambos sexos a través de los días de consumo tuvo un comportamiento cuadrático (Figura 6 y 7) ($P < 0.05$), la coloración fue menor a comparación del Experimento 2, esto puede ser atribuido a las condiciones de alojamiento, ya que en jaulas tipo batería, la densidad de población es menor y esto puede favorecer que los parámetros productivos mejoren (Valdivié y Dieppa 2002), como se observa en el consumo de pigmento (Cuadro 5 y 13), ya que las aves del Experimento 1 consumieron menor cantidad de pigmento que las aves alojadas en piso (Experimento 2), probablemente debido a esto es que las aves del Experimento 2 alcanzaron una coloración más alta desde días antes que las aves alojadas en jaula.

En el día 28 en general el amarillamiento cutáneo de las aves del Experimento 1 alcanzaron los valores más altos; sin embargo a dosis elevadas de xantofilas el tiempo se acortó una semana, esto puede deberse a que la piel de las aves almacena los carotenoides en función del crecimiento de la misma, desde la dermis hasta la capa superior queratinosa de la epidermis. Este proceso transcurre en aproximadamente 21 días, desde el crecimiento de las capas más profundas, hasta que llegan a la superficie y después se pierden por descamación, por lo que es importante, durante este periodo, acompañar el crecimiento de la piel con cantidades de pigmento en el alimento que sean ofrecidas de manera continua (Cortés, 2005). En ocasiones se ha observado un efecto de disminución en el amarillamiento cutáneo del día 21 al día 28 como fue en el tratamiento que incluyó 92 ppm al igual que en el experimento realizado por Canela (2007), con una dieta que contenía 90 ppm de xantofilas de flor de cempasúchil. Sin embargo, esto no se observó en el Experimento 2 (Cuadro 11). Esta diferencia puede deberse al manejo, al cual fueron sometidos los animales del Experimento 2, el cual fue menor en comparación con las aves del experimento 1 (mediciones del pigmento y muestras sanguíneas 2 veces a la semana) ya que se ha mencionado que el manejo excesivo tiene un efecto negativo sobre la pigmentación cutánea (Vicente, 2000).

En cuanto al comportamiento (cuadrático o lineal) del amarillamiento cutáneo, por la adición de dosis altas o bajas de xantofilas en la dieta Cortés (2005) mencionó que el comportamiento es cuadrático, esto se debe a que el impacto en el color de la piel es alto en las primeras 20-40 ppm de xantofilas pero empieza a disminuir e incluso alcanza una meseta alrededor de las 80 ppm para el caso de xantofilas de *Tagetes erecta*, este mismo efecto no sólo se observa en el amarillamiento cutáneo, sino en la concentración plasmática de xantofilas (Figura 8) del Experimento 1, el efecto cuadrático también se presentó en la pigmentación cutánea de las aves del experimento 2. De manera contraria, Aceves (2004) y Muñoz (2009) encontraron que la pigmentación cutánea tiene un comportamiento lineal; a mayor tiempo de consumo, las concentraciones de pigmento en la piel incrementan de manera lineal, tal y como se observa en la pigmentación cutánea de las aves del experimento 2 (Fig 10) que consumieron la dieta con 65 ppm, debido a que la cantidad consumida de pigmento no es la necesaria para alcanzar una pigmentación máxima, esto puede solucionarse ofreciendo el pigmento en un periodo mayor a los 28 días ocasionando un efecto negativo sobre el costo (Cortés, 2005). Para ambos casos el incremento en el amarillamiento cutáneo (b+), se atribuye a que la piel de las aves almacena los carotenoides en función del crecimiento de la misma (Cortés, 2005).

Al finalizar el periodo de experimentación (49 días de edad), el amarillamiento cutáneo de los pollos alojados en jaula fue de 19.45 UA (Cuadro 6), en contraste con los animales alojados en piso donde la pigmentación en piel fue de 20.01 UA ($P > 0.05$) (Cuadro 10), sin importar el nivel de xantofilas añadido en la dieta, esto puede deberse a la cantidad de luz natural que recibieron los animales, ya que en condiciones de jaula la luz natural puede verse disminuida. Janky *et al.* (1980) y Muñoz *et al.* (2012) mencionaron que la pigmentación de las aves que son mantenidas sin luz natural es menor a diferencia de aquellas aves que tienen acceso a la luz natural, Muñoz *et al.*, (2012) cuantificaron que la pigmentación cutánea (b+), incrementa en 0.015 UA por cada 1% de incremento en la intensidad de la luz. O bien puede atribuirse a que las aves del experimento 2 tenían una pigmentación inicial mayor.

Tyczkowski y Hamilton (1986) encontraron que el intestino no posee un punto de saturación para los pigmentos en machos de estirpe ligera, pero de manera fisiológica debe existir un punto de saturación a nivel intestinal y a nivel plasmático en donde sin importar cuánto pigmento ingiera el ave, la asimilación no incrementará y por lo tanto tampoco el depósito a nivel cutáneo. De manera contraria, Aceves (2004) extrajo y cuantificó xantofilas amarillas de los distintos segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y encontró un punto de saturación intestinal a los 28 días, el mayor amarillamiento cutáneo (b+) observado fue a los 28 días coincidiendo con los resultados del Experimento 1.

Probablemente los días que la piel tarda en alcanzar su punto máximo de pigmentación, se debe a que la luteína en el plasma debe ser transportada por lipoproteínas de baja densidad hacia los tejidos de depósito, y posteriormente la luteína debe ser re-esterificada por enzimas locales, para que pueda depositarse en los tejidos (Tyczkowski y Hamilton, 1986).

Es probable que niveles altos de pigmento promuevan un aumento de las enzimas encargadas de reesterificar la luteína para su posterior depósito en la piel, haciendo más rápido el proceso de pigmentación en contraste con los niveles bajos de pigmento. A esto puede atribuirse que las aves alimentadas con los niveles más altos de xantofilas (119-200 ppm), hayan obtenido en piel los valores más altos a comparación de los otros niveles de pigmento en la dieta. La cinética de una reacción enzimática afirma que cuando se aumenta la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción aumenta de manera lineal hasta alcanzar un punto máximo, en el que las enzimas se saturan, a partir de este momento la velocidad disminuye hasta que las enzimas sean capaces de procesar el sustrato (Nelson, 2005). Probablemente a esto se debe el efecto cuadrático observado en la pigmentación cutánea.

Se ha descrito, que niveles bajos de xantofilas amarillas en las dietas de pollo de engorda (60 ppm) no son suficientes para alcanzar 20 UA (Castañeda *et al.*, 2003, Martínez, 2003). Con los bajos niveles de xantofilas de *Tagetes erecta* del Experimento 1 no fue posible saturar el intestino y por lo tanto los niveles transportados en el plasma fueron bajos (Cuadro 7). Se encontró que para poder obtener una buena pigmentación utilizando 60 ppm de xantofilas en el alimento se debe incrementar el consumo de pigmento hasta el día 56 de edad. (Ávila, 1990).

Al respecto, Parker (1988) reportó que en humanos los niveles de carotenoides encontradas en la sangre y depositadas en los tejidos, son un reflejo de la cantidad de carotenoides suplementados en el alimento, y este mismo efecto se observa también en el pollo de engorda.

No hay suficientes investigaciones que evalúen la digestibilidad aparente del pigmento en el pollo de engorda. Aceves (2004) reportó cantidades promedio de xantofilas encontradas en las excretas de pollos de engorda alimentados con 80 ppm, y existe poca diferencia en la cantidad de xantofilas en heces a través de las 4 semanas de experimentación. En los datos obtenidos en el Experimento 1, no se encontró diferencia en la digestibilidad aparente del pigmento utilizando niveles bajos o altos en las dietas, la digestibilidad aparente (Cuadro 8) tampoco se ve afectada por el sexo de las aves ($P > 0.05$). Cortés (2005) reportó que el intestino del pollo de engorda tiene un punto de saturación cercano a las 100 ppm de xantofilas, debido a esto es probable que no se encuentre una diferencia entre cada uno de los niveles de pigmento porque hay 27 ppm de xantofilas de diferencia entre cada uno, probablemente si se reduce el rango de diferencia en estudios posteriores puede llegar a encontrarse una diferencia en la digestibilidad aparente del pigmento. Pocos estudios que cuantifiquen las UA que se ganan por día de consumo de pigmento, cuantas al incrementar el nivel de pigmento en la dieta o bien la cantidad de UA que una hembra gana a diferencia de los machos. Al respecto, Muñoz (2009), reportó una mayor ganancia para las hembras; 1.73 UA más que los machos, al utilizar dietas con diferente nivel de pigmento (75, 108, 141 y 162 ppm), esta mayor ganancia en las hembras puede deberse a que el alimento solo se ofreció las 2 últimas semanas del ciclo de producción (semana 6 y 7). La diferencia por sexo, en la cantidad de UA, es debido a que las hembras depositan una mayor cantidad de grasa, favoreciendo también el depósito de carotenoides debido a que son sustancias solubles en lípidos. De manera general, es posible obtener una mejor coloración en piel en menor tiempo y dependiendo el sexo de las aves, si se utilizan los niveles más altos de pigmento en las dietas (173 ppm).

Los resultados reportados por Muñoz (2009), son parecidos a los encontrados en el Experimentos 1, demostrando que sin importar las condiciones de alojamiento la cuantificación de las UA son altamente repetibles.

Las técnicas empleadas en los Experimentos 1, aportan en conjunto información valiosa para poder predecir el nivel de xantofilas de *Tagetes erecta* necesario, para alcanzar un determinado nivel de amarillamiento en la piel del pollo de engorda con base en el sexo de las aves, además de predecir el tiempo necesario para alcanzar esta pigmentación cutánea deseada.

8. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales empleadas, se puede concluir que:

- Los diferentes niveles de xantofilas amarillas empleadas en dietas sorgo-soya a partir del día 21 al 49 de edad no afectaron los parámetros productivos del pollo de engorda.
- Las condiciones de alojamiento (piso o jaula), no afectaron el depósito de pigmento en la piel del pollo de engorda en la etapa de finalización.
- De acuerdo al tiempo de experimentación los días requeridos de consumo de pigmento para llegar al punto de saturación en la piel de pollos de engorda se encontraron entre 21 y 28 días de consumo.
- El nivel máximo de xantofilas en el plasma, se alcanzó 25 días después de iniciado el consumo de pigmento.
- Los animales alimentados con 173 ppm de xantofilas en el alimento alcanzaron 49.47 mg de pigmento por cada mL de plasma.
- El tiempo de consumo y el sexo de las aves no afectaron la digestibilidad aparente de las xantofilas.
- La digestibilidad aparente del pigmento proveniente de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) no se ve afectada por el nivel de pigmento utilizado en la dieta ni tampoco por el sexo de las aves.
- El coeficiente de variación del color, se estabilizó a los 7 días posteriores a la adición del pigmento en la dieta del pollo de engorda independientemente del nivel de xantofilas de *Tagetes erecta*.
- Las hembras pigmentaron en promedio 1.31 UA más que los machos.
- Por cada día de consumo del pigmento, los pollos de engorda incrementaron en promedio 1.09 UA en todos los niveles de pigmento en la dietas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abril DN, Barcena RJA, Fernández RE, Galván CA, Jorin NJ, Peinado PJ, Toribio MVF, Túnez FI. Espectrofotometría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. 2006.

Aceves AMG. Cinética de la absorción, transporte y deposición de luteína en pollos de engorda. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2004.

Allen PC. Physiological responses of chicken gut tissue to coccidial infection comparative effect of *Eimeria acervulina* and *Eimeria mitis* on mucosal mass, carotenoid content, and brush border enzyme activity. *Poult. Sci.* 1987; 66: 1306-1315.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. Fifteenth Edition 1990.

Ávila GE. Pigmentantes en la Avicultura en: Ávila GE, Shimada AS, Llamas G. Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria. Sistema de Educación Continua en Producción animal en México. A.C. 1990; 239-250.

Becerril GM. Evaluación del poder pigmentante de luteína y capsantina en pollo de engorda y gallinas en postura con un colorímetro de reflectancia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 1989.

Bendich A, Olson JA. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 1989; 3: 1927-1932.

Bilgili SF, Hess JB. Problemas de la piel en la canal de pollo: causas y soluciones. XLVI Symposium Científico de Avicultura. Septiembre 29 a 2 de octubre; Zaragoza (España). 2009.

Breithaupt DE, Weller P, Grashorn MA. Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Poult. Sci.* 2003; 82: 395-401.

Breithaupt DE. Modern application of xanthophylls in animal feeding a review. *Trends in food science & technology.* 2007; 18: 501-506.

Brunatti C, Martín AM. Introducción a la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. 2006.

Canela HA. Pigmentación en pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas con micotoxinas, análisis de funcionamiento hepático y pigmentos en hígado por HPLC. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.

Carranco JME, Calvo CMC, Pérez-Gil RF. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. Arch Latinoam Nutr. 2011; 61 (3): 233-241.

Castañeda MP, Hirschler EM, Sams AR. Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. Poult. Sci. 2005; 84:143-147.

Cortes CR. Análisis de riesgos en puntos críticos de control de la pigmentación de la piel del pollo de engorda. 1ª mesa de Discusión AMENA sobre Producción de pollo de engorda. [CD-ROOM]. 2005 abril 6-7; Juriquilla (Querétaro). México. Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal. AC. 2005.

Cortes CR. Factores que afectan la pigmentación. 1ª mesa de Discusión AMENA sobre Producción de pollo de engorda. [CD-ROOM]. 2005 abril 6-7; Juriquilla (Querétaro). México. Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal. AC. 2005.

Cuca GM, Ávila GE, Pro MA. Alimentación de las aves. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección del patronato universitario. Departamento de Zootecnia. 2009.

Cheng YH, Shen TF, Pang VF, Chen BJ. Effects of aflatoxin and carotenoids on growth performance and immune response in mule ducklings. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 2001; 128: 19-26.

Davis PN, Kratzek FH. The relation of serum xanthophyll in chickens to the pigmentation of their shanks. [Abstract]. Poult Sci. 1958: 37 (3); 851-854.

Day EJ, Williams WP. A study of certain factor that influence pigmentation in broilers. [Abstract]. Poult Sci. 1958: 37 (3); 1373-1381.

Delgado VF. Pigmentos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*). Caracterización fisicoquímica, procesamiento y eficiencia pigmentante (Tesis doctoral). Irapuato (Guanajuato). Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 1997.

Delgado VF, Jiménez AR, Paredes OP. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. Critical review in food and science and nutrition. 2000; (40) 3: 173-289.

De la Cruz SCE. Comportamiento productivo y calidad del huevo con la adición de aceites de avestruz y pescado en dietas de gallinas semipesadas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.

Del villar MAA. Serrato CMA. Solano NA. Arenas OML. Quintero GAG. Sánchez MJL. Evangelista LS. Jiménez AA. Vanegas EPE. Carotenoides en *Tagetes erecta*, la modificación genética como alternativa. Revista Fitotecnia Mexicana. México. 2007; 30 (2): 109-118. Sociedad fitogenética, A.C. Chapingo.

Fadly AM, Glisson JR, Mc Dougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Protozoan. In: Saif YM, Barnes HJ. Editors. Diseases of poultry. Iowa: Iowa State University. 2008: 1067-1091.

Fernández S. Pigmentación en la avicultura: Memorias de Diplomado en Producción Avícola; 2000 febrero-marzo; México (D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM). 2000; 151-171.

Fletcher DL. Papa M. The effect of saponification on the broiler coloring capability of marigold extracts. Poult Sci. 65: 1708-1714. 1986.

Fletcher DL. Methodolgy for achieving pigment specifications. Poult Sci. 2002 71: 733-741.

Ganong WF. Fisiología Médica. 18ª . Ed. El manual moderno, 2006.

Guzmán CAE. Evaluación del óxido de cromo (Cr_2O_3) y del dióxido de titanio (TiO_2) como marcadores de la digestibilidad aparente en ovinos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010.

Hamilton PB. The use of high-performance liquid chromatography for studying pigmentation. Poultry Sci. 1992; 71: 718-724.

Harms RH, Fry JL and Mc Pherson BN. Evidence of differences in pigmentation among strains and crosses of broilers. Poult. Scie. 1977; 56: 86-90.

Hencken H. Chemical and physiological behavior of feed carononoids and their effects on pigmentation. Poult Sci. 1992; 71: 711-717.

Higdon J. Pauling L. Carotenoides; alpha-Carotene, Beta-Carotene, Beta-Cryptoxanthin, Lycopene, lutein and zeaxanthin. Linus Pauling Institute. 2005.

Hudon J. Biotechnological applications of research on animal pigmentation. Biotech. Adv. 1994.12: 49-69.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Tláhuac: Cuaderno de información básica delegacional. México (DF): INEGI. 1992.

Janky, DM. Los efectos causados por la luz en la pigmentación de los pollos para asar. - Decimoséptima conferencia anual sobre ganadería y avicultura en América latina. Florida, EE.UU. Universidad de Florida. pp. 15-20. 1983

Janky DM. The use of the Minolta reflectance chroma meter II™ for pigmentation evaluation of broiler shanks. *Poult Sci.* 1986; 65(3); 491-496.

Juárez RM. Efecto de varios agentes sobre la pigmentación cutánea en pollos de engorda. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2002.

Khan MA. Nisa MU. Sarwar M. Techniques measuring digestibility for the nutritional evaluation of feeds. *Int. J. Agri. Biol.* 2003, 5: (1); 91-94.

Kostic D, White WS, Olson JA. Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and β -carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995. 62; 604-610.

Krinsky. NI. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.* 1988; 7: 617-635.

Leone JL. Collaborative study of the quantitative determination of titanium dioxide in cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* 1973; 56(3); 535-537.

Liaaen JS. Basic carotenoid chemistry in: Krinsky NI, Mayne ST, Sies H, editors. *Carotenoids in health and disease.* New York: Marcel Dekker. 2004: 1-30.

Littlefiel LH, Bletner JK, Shirley HV, Goff OE. Locatin the site of absortion of xantophyll in the chicken by a surgical technique. [Abstract]. *Poult Sci.* 1972: 51 (5); 1721-1725.

Martínez GAI. Evaluación de los valores de pigmentación de la piel en la pechuga del pollo de engorda comparándola con otras regiones anatómicas medidas con colorímetro de reflectancia. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 1996.

Martínez PM. Efecto de diferentes niveles de xantofilas de flor de cempasúchil sobre la pigmentación de la piel en pollo de engorda. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2003.

Martínez PM, Cortes CA, Ávila GE. Evaluation of three pigment levels of marigold petals (*Tagetes erecta*) on skin pigmentation of broiler chicken. Tec. Pecu. Mex. 2004; 42 (1): 105-111.

Mc Donald P. Edwards RA. Nutrición animal. Greenhalgh UFD. Morgan CA. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza, España. 5ª edición. 1995.

Meléndez MAJ, Vicario IM, Heredia FJ. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Publicación oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Arch Latinoam Nutr. 2004; 54 (2). Venezuela.

Montilla JJ, Angulo IA. Pigmentantes en raciones para aves. Memorias del IV ciclo de conferencias de producción avícola; 1984 octubre 25-26. Maracay (Venezuela). 1984. Muñoz DJI, Fuente MB, Hernández VX, Ávila GE. 2012. Skin pigmentation in broiler chickens fed various levels of metabolizable energy and xanthophylls from *Tagetes erecta*. J. Appl. Poult. Res. 21:788-796.

Muñoz DIJ. Tepox PMA, Jiménez FMJ, Fuente MB, Hernández VX. Quiroz PM, Ávila GE. Modulando la pigmentación amarilla en la piel del pollo de engorda. Memorias de la V Reunión Anual de la Asociación de Especialistas en Ciencias Avícolas del Centro de México A.C. "MVZ. Fermín Triguero Morales" Marzo. 7-9. 2012. San Juan del Rio, Querétaro. (México). Asociación de Especialistas en Ciencias Avícolas del Centro de México. A.C. 2012. 288-303.

Martínez PM. Efecto de niveles de xantofilas de flor de cempasúchil sobre la pigmentación de la piel del pollo de engorda. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2003.

Myers WD. Ludden PA. Naygihugu V. Hess BW. A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. J. Anim. Sci. 2004. 82: 179-183.

National Research Council. 1994. Nutrients requirements of poultry; 9th Revised Edition. National Academy Press, Washington, DC.

Nelson DL. Lehninger principles of biochemistry. 4ª edición. New York: Worth. 2005.

Olmedilla AB, Granado LF, Blanco NI. Carotenoides y salud humana. Fundación Española de Nutrición. Unidad de Vitaminas. Sección Nutrición. 2001. Madrid.

Quart MD. Bell DE. Janky DM, Dukes MG. Marion JE. Influence of source and physical form of xanthophylls pigment on broiler pigmentation and performance. Poult. Sci. 1988. 67: 544-548.

Peddie J, Dewar WA, Gilbert AB, Waddington D. The use of titanium dioxide for determining apparent digestibility in mature domestic fowls (*Gallus domesticus*). J. agric. Sci. 1982. Camb. 99: 233-236.

Park JS, Chew BP, Wong TS. Dietary lutein absorption from marigold extract is rapid in BALB/C mice. J. Nutr. 1998. 128; 1802-1806.

Parker RS. Carotenoids in human blood and tissues. J. Nutr. 1988. 119; 101-104.

Pérez-Vendrell AM, Hernandez JM, Llauro L, Schierle J, Brufau J. Influence of source and ratio of xanthophyll pigments on broiler chicken pigmentation and performance. Poult. Sci. 2001; 80: 320-326.

Perry A, Rasmussen H, Johnson E. Xanthophyll (luteina, zeaxantina) content in fruits, vegetables and corn and egg products. J Food Compos Anal. 2009. 22: 9-15.

Primo YE. Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria. Tomo 2. Universidad Politécnica de Valencia. Reverte S.A, 1995.

Raghavan V. Pigmentation in broilers. Feed Mix. 2001; 9 (3): 14-15.

Rodríguez NM, Simoes EO, Guimaraes-Júnior R. Sci D. Uso de indicadores para estimar consumo y digestibilidad de pasto. LIPE, lignina purificada y enriquecida. Rev. Col Cienc. Pec; 2007. 20: (4): 518-525.

Ruff MD, Fuller HL. Some mechanism of reduction of carotenoid levels in chickens infected with *Eimeria acervulina* or *E. tenella*. J. Nutr. 1975; 105: 1447-1456.

Sánchez A, Flores-Cotera LB, Langley E, Martín R, Maldonado G, Sánchez S. Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y funciones. Rev Latinoam Microbiol. 1999; 41; 175-191.

Schaeffer JL, Hamilton PB. Effect of dietary lipid on lutein metabolism during aflatoxicosis in young broiler chickens [Abstract]. Poult Sci. 1990; 69 (1): 53-59.

Schiedt K, Leuenberger FJ, Vecchi M, Glinz E. Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. Puree and appl. Chem. 1985. 57 (5): 685-692.

Scheidt K. Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans. In : Britton G, Liaaen JS. Pfander H. Editors. Carotenoids. Vol 3. Biosynthesis. Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland. 1998; 285-352.

Sirri F, Laffaldano N, Minelli G, Meluzzi A, Rosato MP, Franchini A. Comparative pigmentation efficiency of high dietary levels of apo-ester and marigold extract on quality traits of whole liquid egg of two strains of laying hens. J. Appl. Poul. Res. 2007. 16; 429-437.

Skoog DA. West DM. Holler FJ. Crouch SR. Química analítica. 7ª. Edición. Traducción: María del Carmen Ramírez Medeles. Editorial. Mc Graw-Hill. 2001.

Suarez AML. Protagonista, el huevo. Consuelo Mendoza Ediciones. 1ª edición. Dirección General de Mercadeo de Huevo. Federación Nacional de Avicultores de Colombia (FENAVI). 2000.

Sunde, ML. The scientific way to pigment poultry products. Poult Sci. 1992; 71: 709-710.

Sturkey PD. Fisiología Aviar. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1968.

Titgemeyer EC. Armendariz CK. Bindel DJ. Greenwood RH. Loest CA. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. J. Anim. Sci. 2001. 79: 1059-1063.

Tyczkowski J. Hamilton B. absorption, transport and deposition in chickens of lutein diester a carotenoid extracted from marigold (*Tagetes erecta*) petals. Poult Sci. 1986. 65: 1526-1531.

Tobal CF. Evaluación de los alimentos a través de los diferentes métodos de digestibilidad. Anuario de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de la Pampa. 1999.

Tomita Y. Torinuki W. Tagami H. Stimulation of human melanocytes by vitamina D₃ possibly mediates skin pigmentation after sun exposure. J Invest Dermatol. 1988. 90: 882-884.

Valdivié M, Dieppa O. Densidad de pollos de ceba. Producción de peso vivo de aves. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 2002. 36 (2); 131-135.

Valladares S. Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible. Depósito de documentos de la FAO. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. 1994. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S03.htm>

Vicente SJ. Aspectos básicos sobre la pigmentación en la industria avícola. Memorias del Diplomado en Producción Avícola. 2000 febrero-marzo. México (D.F). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (UNAM). 2000: 145-149.

Wesche-Ebeling P, Argaiza A. Antocianinas monoméricas y copolimerizadas: caracterización, síntesis y su uso como colorantes. Proyecto de Investigación CONACyT. 2000.

William WD. Origin and impact of color on consumer preference for food. Poultry Sci. 1992; 71 (4): 744-746.

Wu L. Huang X. Shi K. Tan R. Bioavailability comparison of free and esterified lutein for layer hens. Rev. Bras. Cienc. Avic. 2009. 11 (2).

10. ANEXO

1. CLASIFICACIÓN DE LOS OXICAROTENOIDES (Primo 1995)

- a) **Alcoholes (Xantofilas);** son derivados alcohólicos, no suelen estar aislados, sino en mezclas complejas.
- Criptoxantina; derivada del β caroteno.
 - Zeaxantina; derivada del β caroteno, es el principal colorante del maíz.
 - Luteína; derivada del α caroteno, llamada también "xantofila".
- b) **Epóxidos;** son carotenoides en cuya molécula existen grupos funcionales epoxi. La epoxidación provoca un acortamiento en el espectro de absorción hacia longitudes de onda más cortas.
- Violaxantina; puede obtenerse por oxidación de la zeaxantina.
 - Luteoxantina y auroxantina; son ejemplos de carotenoides con epóxidos 1-4 (furanoides).
- c) **Aldehídos y Cetonas:**
- Capsantina; se encuentra en los frutos maduros del pimiento rojo, la capsantina se puede obtener por ruptura del doble enlace de uno de los anillos de la zeaxantina.
 - Capsorrubina; derivada de la zeaxantina por ruptura de los 2 anillos.
 - Cantaxantina; este carotenoide se usa en la coloración artificial.
 - Astaxantina; derivado también de la zeaxantina
 - B-apo-8'-carotenal; es un carotenoide sintético.
- d) **Ácidos o esteres:**
- Ester metílico del ácido β -apo-8'carotenoico; uno de los anillos terminales está reemplazado por grupos carboxilo.

2. Técnica de digestibilidad

- **Análisis de la Espectrofotometría:**

La cuantificación de carotenoides totales en alimentos para aves y excretas fue determinada por espectrofotometría en un instrumento Beckman modelo 65 UV/Vis, equipado con lámpara de deuterio y tungsteno, celda de cuarzo de 1 cm por lado, con un slit o ancho de banda de 2 nm, a una longitud de onda de 474 nm, calculado con un coeficiente de extinción $E1\% / 1\text{cm} = 236$ para hexano, en un rango de lectura de 0.3 a 0.6 de absorbancia de las muestras.

- **Análisis HPLC:**

Para la determinación del perfil de carotenoides en las muestras de alimentos y excretas se utilizó un cromatógrafo de Líquidos marca Varían equipado con bomba isocrática modelo 9002 y detector UV/Vis modelo 9050 con rango de lectura en absorbancia de 190 a 700 nm, lámpara de deuterio, con paso de luz de 8mm, ancho de banda espectral de 5nm, celda de 15 uL, flujo de solvente de 0.010 a 10 mL/min, presión máxima de operación 410 atms, columna Phenomenex luna 5 micras sílica (2) de 4.6 x 250 mm de diámetro, fase móvil hexano + acetato de etilo (75+25), flujo de 2.5 ml/min, longitud de onda 447 nm, tiempo de corrida 35 mins.

El perfil de cada carotenoides determinado por HPLC expresado en porcentaje, fue referido a la concentración total de carotenoides cuantificado por espectrofotometría de acuerdo a metodología USP29 NF24.

3. Metodología descrita por Allen et al (1987) para la extracción de carotenoides.

1. Para obtener el plasma; centrifugación de 1500 rpm/10 min de todas las muestras.
2. Transferir a un tubo limpio 0.5 mL de plasma+4.5 ml de Acetona, emplear un vortex para homogenizar la solución.
3. Volver a centrifugar (1500 rpm/10 min).
4. Decantar para extraer el sobrenadante.
5. Preparar diluciones para una curva estándar.*
6. Leer las muestras en un espectrofotómetro de luz ultravioleta, utilizando una longitud de onda de 478 nm.

* Preparar 5 diluciones (mínimo) hasta 10 (máximo)
Tomar la concentración del producto al hacer la dilución inicial
Absorbancias > 1 no son validas

3. Ecuaciones para cada nivel de pigmento (Exp 1)

65 ppm. $B+= 0.73+1.25$ (Días de consumo de pigmento)-2.08 (sexo)-0.025(Días de consumo de pigmento)² $R^2= 66.1$

92 ppm. $B+= 2.0+1.20$ (Días de consumo de pigmento)-1.27(Sexo)-0.02(Días de consumo de pigmento)²

119 ppm. $B+= 1.76+1.18$ (Días de consumo de pigmento)-1.45(Sexo)-0.02(Días de consumo de pigmento)² $R^2= 83.7$

146 ppm. $B+= 0.61+1.40$ (Días de consumo de pigmento)-0.04(Sexo)-0.02(Días de consumo de pigmento)² $R^2= 83.5$

173 ppm. $B+=2.52+1.49$ (Días de consumo de pigmento)-2.98(Sexo)-0.03(Días de consumo de pigmento)² $R^2= 82.1$

200 ppm. $B+=1.22+1.31$ (Días de consumo de pigmento)+0.05(Sexo)-0.02(Días de consumo de pigmento)² $R^2= 79.3$

4. Ecuaciones para cada nivel de pigmento (Exp 2).

65 ppm. $B+= 5.968+ 0.455$ (Días de consumo)

119 ppm. $B+= 3.2351+ 1.4685$ (Días de consumo)- 0.0329 (Días de consumo)²

146 ppm. $B+= 3.8800+1.4406$ (Días de consumo)- 0.0303 (Días de consumo)²

173 ppm. $B+= 3.2146+ 1.6498$ (Días de consumo)- 0.0359 (Días de consumo)²

200 ppm. $B+= 3.7295+ 1.5834$ (Días de consumo)- 0.0348 (Días de consumo)²

5. Determinación de óxido de titanio (TiO₂) por medio de la técnica de Jagger *et al.*, 1991

Diversas técnicas son utilizadas para la determinación de óxido de titanio (TiO₂). El análisis se realiza a través de espectrofotometría. (Guzmán 2010)

Técnica de Leone (1973).

1. Recomienda incinerar la muestra a 850° C,
2. Dejar enfriar y añadir 1.5 g de sulfato de sodio (Na₂SO₄)
3. Se lleva a punto de ebullición y se deja enfriar.
4. Añadir 30 mL de agua (H₂O)
5. Aforar a 100 mL con agua destilada
6. Se obtienen 3 mL para el análisis y se agregan 0.2 mL de H₂O₂)
7. Utilizar un espectrofotómetro a una longitud de onda de 408 nm.

Técnica de Jagger *et al.*, 1991. Modificación a la técnica de Leone (1973). (Myers *et al.*, 2004, Titgemeyer *et al.*, 2001, Peddie *et al.*, 1982).

1. Pesar cada muestra por duplicado (0.5 g). La muestra puede ser heces, contenido ileal o duodenal o forrajes.
2. Depositar la muestra pesada dentro de tubos de 250 mL Kjeldahl para digestión
3. Adicionar 20 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄)
4. Al mismo tiempo adicionar una mezcla catalizadora de sulfato de potasio (K₂SO₄) y sulfato de cobre (CuSO₄) a cada tubo.
5. Digerir durante 1 h con 30 minutos a 420° C.
6. Remover del calor y dejar enfriar mínimo 30 minutos.
7. Adicionar 10 mL de H₂O₂ cada tubo y dejar enfriar por 30 minutos.
8. Aforar a 100 mL utilizando agua destilada.
9. Filtrar utilizando papel filtro whatma No. 541
10. A la solución filtrada añadir 0.2 mL de peróxido de hidrogeno (H₂O₂)
11. Medir la absorbancia utilizando 408 nm.
12. La curva de calibración debe contener 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg de óxido de titanio que se incluyó como marcador en las dietas.
13. Digestión de la muestra (0.5 g) por 30 minutos utilizando 20 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) más el uso de catalizadores como el sulfato de potasio (K₂SO₄) y sulfato de cobre (CuSO₄).
14. Agregar 10 mL de agua destilada

15. Filtrar
16. Aforar a 100 mL
17. Adicionar 0.2 mL de peróxido de hidrogeno
18. Leer en un espectrofotómetro de luz ultravioleta a 408 nm

6. Espectrofotometría

Consideraciones para el uso de las celdas

En las paredes de la celda o cubeta puede haber pérdidas por reflexión y dispersión. Para compensar este efecto, la energía del haz transmitido por la solución del analito se compara con la energía de un haz que atraviesa una celda que contiene solo el disolvente del analito o blanco. (Skoog *et al.*, 2001).

Curvas de calibración

Para verificar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer se debe realizar una curva de calibración, gráficamente se observara la absorbancia de la sustancia en función de su longitud de onda. (Abril *et al.*, 2006).

Se preparan una serie de soluciones patrón del analito, se mide su absorbancia y se construye una curva de calibración de absorbancia frente a concentración, o se determina la ecuación de regresión lineal, la ecuación más común, que relaciona la concentración con la absorbancia es la siguiente (Skoog *et al.*, 2001):

$$Y = Ax + B$$

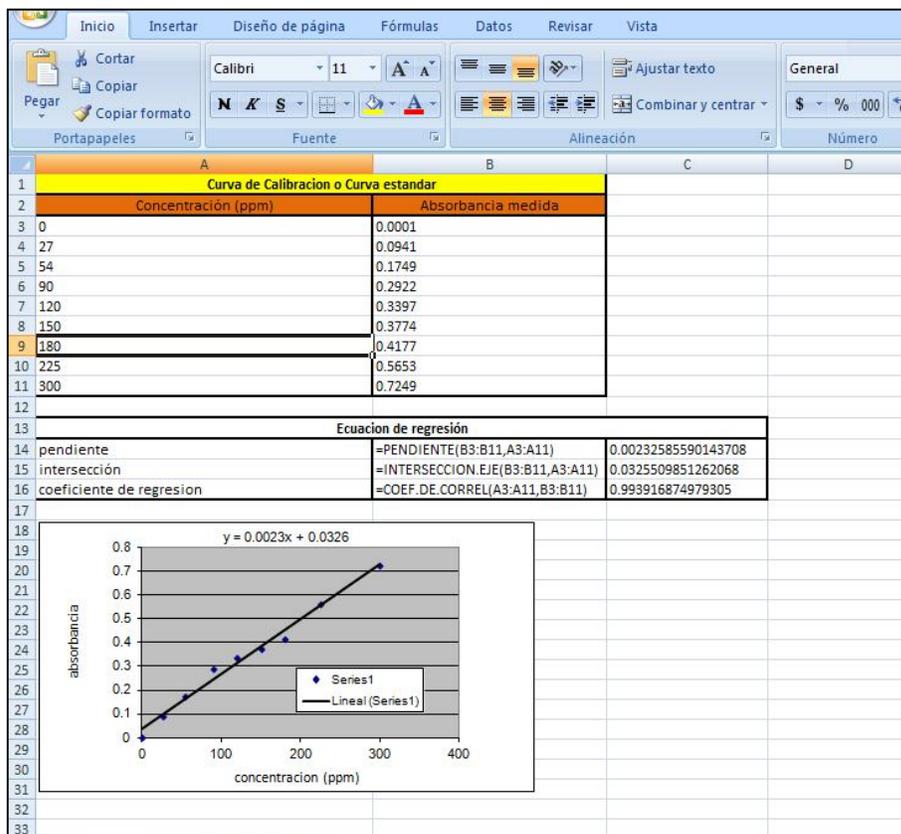
Donde: A= pendiente

B= intercepto

Se debe calcular también el coeficiente de correlación (r) ya que es un parámetro estadístico que evalúa la calidad de la curva de calibración, para un análisis cuantitativo se considera adecuado un coeficiente mayor a 0.99%.(A.O.A.C)

7. Factores a considerar al realizar una curva estándar

- Verificar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, asegurando la concentración adecuada del elemento a determinar.
- La concentración del elemento a determinar no debe exceder la necesaria para evitar saturar la reacción.
- Estudiar la estabilidad del color (algunas veces con el paso del tiempo es inestable).
- La temperatura de las muestras es importante, temperaturas altas afectan la lectura de las muestras, por lo que se recomienda tener las muestras a temperatura ambiente para su lectura con el espectrofotómetro.
- La naturaleza del solvente puede generar interferencias iónicas y alterar la reacción, es importante el uso de una muestra conocida como “blanco” para poder corregir las lecturas. (Brunatti *et al.*)



8. Técnicas de digestibilidad

Métodos directos

Métodos “*In vivo*”; este método es el que da la mejor estimación de la digestibilidad de un alimento, denominado también digestibilidad aparente por colección total de heces, los animales deben confinarse para facilitar la colección de heces en rumiantes y orina. (Toba, I 1999, Mc Donald, 1999).

La digestibilidad determinada por este método se expresa como digestibilidad aparente, se calcula empleando la siguiente fórmula (Toba I 1999):

$$\text{Digestibilidad aparente de MS} = \left(\frac{\text{Cantidad de MS ingerida} - \text{cantidad de MS excretada}}{\text{cantidad de MS ingerida}} \right) \times 100$$

Métodos indirectos:

Digestibilidad de un nutriente; este método se utiliza cuando desea evaluarse la digestibilidad de una sustancia alimenticia administrada con otras sustancias. Se asume que la digestibilidad de una dieta con varios componentes es igual a la proporción en que se administró cada ingrediente. (Khan *et al.*, 2003).

La digestibilidad estimada se expresa como digestibilidad de un nutriente, y se calcula de la siguiente forma (Khan *et al.*, 2003):

$$\text{Digestibilidad de un nutriente en el alimento}(\%) = \frac{(A) - (B)(C) \times 100}{D}$$

Donde:

A= digestibilidad del nutriente en la dieta total.

B= digestibilidad del nutriente en la dieta basal (determinado cuando se administra de manera separada)

C= proporción del total de nutrientes en la dieta suministrada (dieta basal)

D= proporción del total de nutrientes en la dieta suministrada (alimento testigo)

Método de indicadores o marcadores de la digestibilidad: la técnica que utiliza indicadores fue desarrollada debido a las dificultades al realizar la colección total de heces. Es empleada cuando no se puede restringir el alimento o cuando es difícil calcular la cantidad de alimento consumida por cada animal, en estos casos, la digestibilidad puede calcularse si el alimento contiene una sustancia que no sea digestible, se debe añadir al alimento a una concentración conocida y posteriormente determinar la cantidad encontrada en las heces. (Rodríguez, 2007, Tobal, 1999, Khan, 2003, Scott, 1982).

El uso de marcadores precisa de su cuantificación en las heces, cuando el alimento avanza por el tracto gastrointestinal, su concentración aumenta debido a la remoción de otros constituyentes del alimento por digestión y absorción. El aumento en la concentración del marcador es proporcional a la digestibilidad, y esta última puede ser calculada conociendo la concentración del indicador en la dieta y en las heces a partir de la siguiente ecuación (Tobal, 1990, Khan, 2003):

$$\text{digestibilidad}(\%) = 100 - \left[100 \times \frac{(\text{ID})}{(\text{IF})} \right]$$

Donde:

ID= Indicador en la dieta

IF= Indicador en las heces

Digestibilidad aparente

$$= 100 - \left(100 \times \frac{\% \text{ indicador en el alimento}}{\% \text{ indicador en heces}} \times \frac{\% \text{ nutriente en el alimento}}{\% \text{ nutriente en heces}} \right)$$

Sin necesidad de conocer el consumo total del alimento ni la producción total de excremento.