



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DISEÑO DE UN PREPARADO DE LIBERACIÓN MODIFICADA Y CON  
PROMOTORES DE LA BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO PARA AVES DE  
POSTURA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LIZBETH YESENIA CARRILLO GONZÁLEZ**

**TUTOR:**

**LILIA GUTIÉRREZ OLVERA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMITÉ TUTOR:**

**CARLOS LÓPEZ COELLO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CDMX.**

**ENERO 2021**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM por brindarme una digna formación académica.

Al Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria por todo su apoyo para la realización de este proyecto.

Al jefe del Departamento de Fisiología y Farmacología, Dr. Luis Ocampo Camberos por su confianza.

A la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera por ser la mejor Tutora que pueda existir ya que sin su ayuda no podría concluir esta maravillosa etapa académica; por ser tan amable, por escucharme siempre y darme un consejo justo en el momento adecuado.

Al Dr. Héctor Sumano López por confiar en mí, por toda su paciencia y sobre todo por ser un excelente docente.

Al Dr. Carlos López Coello por toda su ayuda y conocimiento en el área, además siempre estuvo al pendiente de mis avances.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad ya que siempre me oriento y se preocupó por que aprendiera.

A mis jurados por su tiempo y dedicación en la revisión de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del departamento que me apoyaron siempre sobre todo en la toma de muestras nocturna, sin ustedes no podría lograrlo, Agustín Nieto, Melisa Aranda, Adrian Sánchez y Jesús Mendoza.

A mis amigas por ser una fuente de inspiración y fuerza, Heidi Zozaya Doering, Alma Carrascosa Orozco y Gloria Morales Luna.

A CONACYT por el apoyo económico que me otorgó para realizar mis estudios de posgrado.

A PAPIIT, UNAM IT200419, por el apoyo económico que me proporcionó para la culminación de este proyecto.

Al mismo tiempo, deseo expresar mis más sinceras gratitudes a todas las personas que han contribuido con la realización de esta tesis.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por permitirme vivir la agradable experiencia de terminar el doctorado.

A mi hija Isis, por adaptarse a los horarios de trabajo y siempre estar dispuesta ayudarme en todo. Sabes hija siempre se puede lograr todo lo que uno se propone con disciplina y esfuerzo.

Al Departamento de Fisiología y Farmacología Veterinaria y a todo su personal docente y administrativo.

A mi tutora, comité tutor y jurados.

## CONTENIDO

	Página
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	VIII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	IX
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1 Fisiología del calcio en las aves	5
1.2 Absorción de calcio en aves	7
1.3 Fisiología de la formación del huevo	13
1.4 Ciclos de producción en gallina de postura	15
1.5 Calidad del huevo y su clasificación	16
1.6 Fuentes de calcio utilizadas en la nutrición animal	19
1.7 Velocidad de absorción de nutrientes en aves	20
1.8 Promotores de la absorción y biodisponibilidad de calcio	21
1.8.1 Extracto acuoso de palo azul ( <i>Eysenhardtia polystachya</i> )	21
1.8.2 Extracto acuoso de jugo de toronja ( <i>Citrus paradisi</i> )	22
1.8.3 Extracto de oleorresina de capsicum	22
1.9 Vehículos gastroretentivos	24
<b>2. JUSTIFICACION</b>	25
<b>3. HIPÓTESIS</b>	26
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	26
<b>4. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	26

<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	27
5.1 Fase I. Evaluación de la biodisponibilidad de diversas fuentes de calcio en gallina de postura	27
5.2 Ubicación	27
5.3 Animales e instalaciones	27
5.4. Fase II. Evaluación de diversos promotores de la absorción de calcio en gallina de postura	31
5.5 Análisis estadístico	32
6. Evaluación <i>in vitro</i> de tres segmentos del tracto gastrointestinal con preparados de calcio para determinar el mayor sitio de absorción	33
7. Evaluación por preferencia en el color en sistema FOLA mediante el consumo	35
8. Fase III. Evaluación del sistema FOLA en aves de postura de segundo ciclo de los preparados de carbonato de calcio de liberación modificada más capsaicina como promotor de la biodisponibilidad	37
9. Fase IV. Evaluación de biodisponibilidad de calcio en gallinas de postura de segundo ciclo con preparados tipo FOLA más capsaicina	39
10. Fase V. Efecto del preparado tipo fola más capsaicina sobre el grosor de cascarón y % de huevo en farfara en gallinas de segundo ciclo.	41
<b>11. RESULTADOS</b>	42
<b>12. DISCUSIÓN</b>	53
<b>13. CONCLUSIÓN</b>	55

<b>14. BIBLIOGRAFÍA</b>	56
<b>15. ARTICULOS PUBLICADOS</b>	65
1. Mayor Biodisponibilidad de calcio en pollos con una nueva formulación farmacéutica en el alimento. Doi: <a href="https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00343">https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00343</a> Frontiers in VeterinaryScience, 2020, vol.7, p.343.	66
2. Biodisponibilidad de cuatro Fuentes de calcio en el segundo ciclo de gallinas productoras de huevo. Doi: <a href="https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.10.005">https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.10.005</a> Journal of Applied Poultry Research, 2020	73

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Semanas de uno y dos ciclos productivos.	15
<b>Cuadro 2.</b> Gravedad específica ligada a la calidad del huevo.	18
<b>Cuadro 3.</b> Grado de picor o pungencia de diferentes pimientos, según la escala Scoville.	23
<b>Cuadro 4.</b> Composición y contenido de nutrientes calculado de la dieta.	28
<b>Cuadro 5.</b> Composición y contenido de nutrientes calculado de la dieta.	29
<b>Cuadro 6.</b> Dosificación de tres diferentes fuentes de calcio	30
<b>Cuadro 8.</b> Parámetros cinéticos de tres diferentes fuentes de calcio administrado vía oral en gallinas Bovans White Fase II.	44
<b>Cuadro 9.</b> Parámetros cinéticos de tres diferentes fuentes de calcio administrado vía oral en gallinas Bovans White Fase II.	46
<b>Cuadro 10.</b> Administración de 30g de FOLA sin excipiente en el alimento utilizando cinco colores distintos en las aves.	48
<b>Cuadro 11.</b> Variables cinéticas logradas por tres grupos, administrando Fola´s vía oral en el alimento en gallinas <i>Bovans-White</i> y un grupo control sin FOLA.	50
<b>Cuadro 12.</b> Porcentaje de huevos registrados durante 6 días con cuatro fuentes de calcio administradas por vía oral en gallinas Bovans-White de 85 semanas de edad.	52



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la regulación de calcio en suero sanguíneo en aves.	6
<b>Figura 2.</b> Esquema de la regulación de calcio en suero sanguíneo en aves.	7
<b>Figura 3.</b> Esquema del Sistema digestivo y glándulas anexas en aves.	8
<b>Figura 4.</b> Esquema de la síntesis de la Proteína Transportadora de Calcio, Calbindin-D28k (CaBP).	10
<b>Figura 5.</b> Esquema del metabolismo del calcio en aves.	11
<b>Figura 6.</b> Esquema del sistema reproductor de la gallina.	13
<b>Figura 7.</b> Esquema del oviducto de la gallina con el tiempo de estancia del ovulo en cada sitio.	13
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la resistencia o ruptura de la cascara según la edad de la gallina.	17
<b>Figura 9.</b> Estructura química de la capsaicina y dihidrocapsaicina.	23
<b>Figura 10.</b> Administración de 1g de cada fuente de calcio.	30
<b>Figura 11.</b> Analizador químico Semi-automático Easy Vet®.	30
<b>Figura 12.</b> Pellet FOLA 1g en cada órgano.	34
<b>Figura 13.</b> FOLA dentro de cada órgano.	34
<b>Figura 14.</b> Segmento duodeno-páncreas.	34
<b>Figura 15.</b> Cámara de órganos aislados	34
<b>Figura 16.</b> Cámara de órganos aislados con un segmento de buche, molleja y duodeno.	34
<b>Figura 17.</b> FOLA'S de diferentes colores administradas vía oral en el alimento.	35
<b>Figura 18.</b> FOLAS color rojo en el comedero.	36
<b>Figura 19.</b> Huevos en fáfara vs huevo normal.	41

<b>Figura 20.</b> Concentraciones de calcio en suero sanguíneo después de administrar 1g de calcio por ave en una sola dosis vía oral, en la Fase I.	42
<b>Figura 21.</b> Concentraciones de calcio en suero administrando 1g de calcio por ave en una sola dosis por vía oral en aves, alimentadas con dieta modificada, libre de calcio fino y grueso.	43
<b>Figura 22.</b> Concentraciones séricas de calcio administrando 1g de calcio más un promotor de la biodisponibilidad.	45
<b>Figura 23.</b> Perfiles séricos de calcio logrados con cuatro fuentes de calcio administradas vía oral en sistema FOLA en gallinas Bovans-White durante 24 horas y un grupo control sin suplementación.	46
<b>Figura 24.</b> Concentraciones de calcio obtenidas en cámara de órganos aislados de tres diferentes órganos (buche, molleja y duodeno) Administrando 1g de pellet FOLA en cada uno.	47
<b>Figura 25</b> Perfiles séricos de calcio obtenidos después de administrar tres diferentes tratamientos más capsaicina.	49
<b>Figura 26</b> .Las concentraciones séricas de calcio a los cinco días se lograron con cuatro fuentes de calcio administradas por vía oral en gallinas Bovans-White de 85 semanas de edad.	51

## RESUMEN

### **CARRILLO GONZÁLEZ LIZBETH YESENIA. DISEÑO DE UN PREPARADO DE LIBERACIÓN MODIFICADA Y CON PROMOTORES DE LA BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO PARA AVES DE POSTURA.**

La producción de huevo es una de las industrias pecuarias con mayor exigencia productiva dado que se consume alrededor de 73.8 millones de toneladas de huevo mundialmente (FAO, 2018), y la producción a nivel nacional corresponde a 28.2% (UNA, 2019). Los ciclos productivos de las aves pueden llegar a ser hasta dos, sin embargo la segunda producción es inferior a la primera, se plantea que esto se debe a una disminución en la absorción de nutrientes en las aves, principalmente en el calcio. El calcio es básico para la formación del huevo, uno de los principales parámetros para evaluar la calidad de éste es precisamente el cascarón, el cual está formado básicamente por carbonato de calcio. A pesar de la importancia del mineral de calcio en las funciones vitales de las aves, se describe que su biodisponibilidad es muy variable ya que depende de la fuente de calcio que se proporcione, de la edad de las aves o de la integridad del epitelio intestinal, por ejemplo el lactato gluconato de calcio se encuentran entre las más biodisponibles, sin embargo, a la mayoría de las aves se les proporciona carbonato de calcio, siendo el más económico, pero al mismo tiempo el menos biodisponible. El objetivo de este trabajo, basándonos en las características del tracto digestivo de las aves, consistió en comparar la biodisponibilidad relativa de tres diferentes fuentes de calcio administradas vía oral en aves de postura y posteriormente diseñar un preparado farmacéutico de liberación modificada para aumentar la biodisponibilidad de calcio y mejorar la calidad del cascarón. Los resultados demuestran la diferencia entre tratamientos ( $P > 0.05$ ); siendo el lactato gluconato de calcio el que logra concentraciones séricas más altas seguido del fosfato tricalcico y en concentraciones inferiores el carbonato de calcio, además se concluye que los requerimientos de calcio se pueden alcanzar con la administración de FOLA en el alimento y con la adición de capsaicina como promotor de la biodisponibilidad en siete días después de comenzar el tratamiento.

**Palabras Clave:** biodisponibilidad, suero, carbonato de calcio, gallinas de postura, capsaicina.

## **ABSTRAC**

Egg production is one of the livestock industries with the highest productive demand since around 73.8 million tons of eggs are consumed worldwide (FAO, 2018), and production at the national level corresponds to 28.2% (UNA, 2019). The productive cycles of birds can be up to two, however the second production is lower than the first, it is suggested that this is due to a decrease in the absorption of nutrients in the birds, mainly calcium. Calcium is basic for the formation of the egg, one of the main parameters to evaluate the quality of it is precisely the shell, which is basically formed by calcium carbonate. Despite the importance of the mineral calcium in the vital functions of birds, it is described that its bioavailability is highly variable since it depends on the source of calcium provided, the age of the birds or the integrity of the intestinal epithelium. , for example calcium lactate gluconate are among the most bioavailable, however, most birds are provided with calcium carbonate, being the most economical, but at the same time the least bioavailable. The objective of this work, based on the characteristics of the digestive tract of the birds, consisted in comparing the relative bioavailability of three different sources of calcium administered orally in laying birds and later to design a modified-release pharmaceutical preparation to increase the bioavailability of calcium and improve the quality of the shell. The results show the difference between treatments ( $P > 0.05$ ); being calcium lactate gluconate the one that achieves higher serum concentrations followed by tricalcium phosphate and in lower concentrations calcium carbonate, it is also concluded that calcium requirements can be achieved with the administration of FOLA in food and with the addition of capsaicin as a promoter of bioavailability in seven days after starting treatment.

**Key Words:** bioavailability, serum, calcium carbonate, laying hens, capsicum.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector avícola constituye el 63,3% de la producción pecuaria nacional; de ella el 28.2% corresponde a producción de huevo. Se ha estimado una producción de 2, 886,736 toneladas de huevo, con un consumo *per cápita* promedio de 23,30 kg/año según datos de la Unión Nacional de Avicultores (UNA, 2019) esperando llegar a un consumo de 30 kg/año en menos de una década, lo que se traduce en una ganancia neta anual de por lo menos \$56,792 millones de pesos para la industria avícola.

El huevo representa una de las proteínas de origen animal de mayor calidad y bajo costo de producción, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que la demanda de huevo aumentará en los siguientes años hasta en un 30%, lo cual va a requerir que los expertos en la materia procedan en lo requerido para hacer cada vez más eficiente dicha producción y poder satisfacer la demanda nacional y mundial (FAO, 2018 y UNA, 2019).

Sin embargo, la mayor demanda de producción debe ir acompañada de costos de producción que permitan que el huevo siga siendo la proteína de origen animal más económica del sector pecuario en México y el mundo, las investigaciones en nutrición, bioseguridad y farmacología se han centrado en hacer más eficientes los insumos ya existentes para poder mejorar la calidad del huevo sin menoscabo de la producción y bienestar de los animales, así como protección de la ecología y medio ambiente (Akbari *et al.*, 2019).

También es necesario contar con una normatividad internacional que establezca la calidad del huevo (Rodríguez y Bravo, 2019 y Villanueva-Sánchez *et al.*, 2020), en la actualidad la calidad del huevo puede ser evaluada con base a muchos aspectos y diversas metodologías basadas en normas internacionales, todas ellas encaminadas a mantener una calidad nutricional, microbiológico y los aspectos de salud pública (Hafeez *et al.*, 2015).

A nivel de producción, existen muchos factores fisiológicos, nutricionales y metabólicos que intervienen en la calidad del cascarón, considerando al calcio uno de los principales protagonistas, cuya respuesta esta a su vez relacionada con otros factores como son la calidad de las materias primas y edad de las aves (Windhorst, 2008).

Las gallinas pueden ser sometidas a uno o dos ciclos de producción, teniendo en cuenta que a mayor edad de la gallina, la calidad del cascarón es menor; a nivel nacional solo un 40% de los avicultores mantiene un segundo ciclo (Hernández *et al.*, 2006).

Con base a que uno de los principales factores que inducen una mala calidad en el cascarón de aves sometidas a un segundo ciclo, se debe a una disminución en la biodisponibilidad de calcio, se crea la posibilidad de aumentarla para hacer redituable este sistema de producción. Dicho lo anterior se decidió evaluar la respuesta del carbonato de calcio, incluido en la presentación FOLA, que es una patente de la UNAM (UNAM: MX/a/2012/013222 (Carrillo *et al.*, 2020), que ya ha sido evaluado como una fuente alternativa eficiente y económica de dosificación en aves.

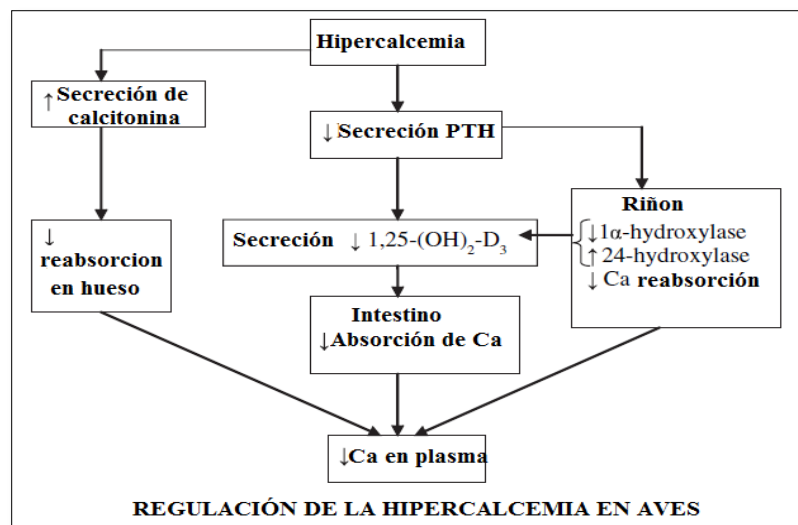
## 1.1 FISIOLOGÍA DEL CALCIO EN LAS AVES

Los minerales son esenciales para muchos procesos fisiológicos en las aves, su deficiencia repercute en el estado de salud y productividad. El calcio es uno de los minerales con mayor importancia, además de sus funciones como componente principal de la estructura ósea, participación en el equilibrio ácido-base y el sistema enzimático. El calcio es el componente principal de la cáscara del huevo, durante su formación ocurren diversos procesos metabólicos con la participación de hormonas y mediadores que se ajustan conforme las aves alcanzan su madurez sexual y durante las distintas fases del ciclo de producción.

En las primeras etapas de crecimiento de las pollas, el calcio se encuentra regulado por la acción sinérgica de los estrógenos y los andrógenos producidos por los folículos ováricos (González y Barbeito, 2014); durante la madurez sexual como fase inicial de la regulación del calcio los estrógenos aumentan, estimulando la diferenciación de los osteoblastos de las células osteoprogenitoras, posteriormente la calcitonina, la vitamina D<sub>3</sub> y la prostaglandina E, regularan los procesos de calcificación de la matriz ósea del hueso. Durante la postura no existe remodelación al tejido óseo cortical, en consecuencia el calcio se mantendrá en constante movimiento en el torrente sanguíneo y el tejido óseo trabecular y medular, debido a la estrecha cercanía del hueso medular al cortical y al hueso trabecular, los osteoblastos pueden movilizar el calcio de cualquiera de estos tres lugares; por ejemplo, después del primer huevo, la única manera en donde el ave puede remodelar la estructura del hueso cortical es durante los periodos donde los niveles de estrógeno sean bajos, tales como los periodos de descanso en postura o en la muda o pelecha (Dacke, 2000).

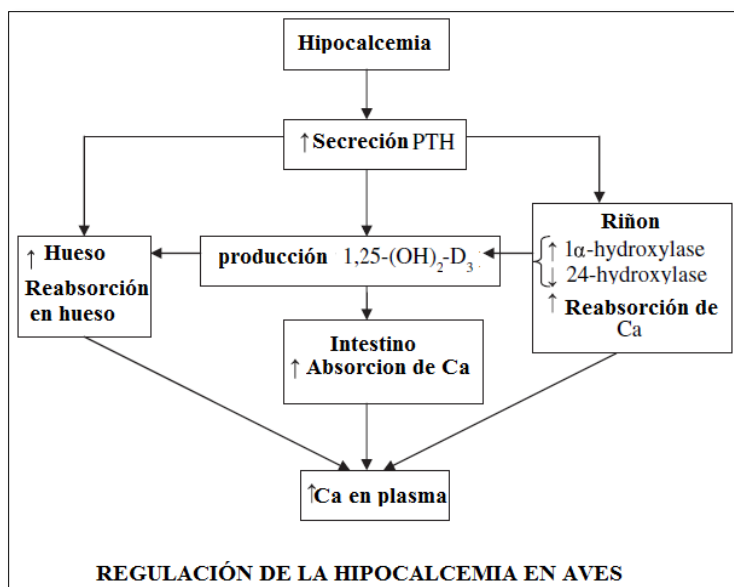
Durante la formación del huevo en el útero se da el proceso de biomineralización del cascarón, evento que requiere la movilización de grandes cantidades de iones de calcio que se obtienen del torrente sanguíneo y son transportados a través del epitelio uterino por las células de las glándulas cascarógenas, este evento induce una hipocalcemia en las aves. Dicha hipocalcemia estimula la liberación de paratohormona (PTH) y la consecuente

activación osteoclástica que lleva a la resorción del tejido óseo medular y el incremento en la calcemia. El tejido óseo medular, por su amplia superficie y su gran vascularización, es más sensible a los pequeños cambios en la concentración de PTH, por lo que actúa como fuente de calcio antes que el tejido óseo compacto de la corteza de los huesos largos. El tejido óseo de las aves es muy sensible a la acción de la PTH, por lo que estimulan directamente a los osteoblastos que poseen receptores para esta hormona y se activan por mecanismos paracrinos en consecuencia los osteoclastos generan el desarrollo de un borde en cepillo y activan sistemas enzimáticos que intervienen en procesos como: resorción ósea, síntesis de vitamina D<sub>3</sub> y activación osteoclástica (De Matos, 2008); se han identificado cinco diferentes proteínas que participan en la formación del cascarón: la ovocleidina, osteopentina, ovoalbúmina la lisozima y la ovotransferrina (Escorcía y Moreno, 2016). En contraste, la calcitonina es liberada cuando se detectan niveles altos de calcio séricos, disminuyendo la actividad de los osteoclastos y permitiendo que los osteoblastos inicien la parte reconstructiva, reduciendo los niveles de calcio séricos (Taylor y Dacke, 1984). La calcitonina y la PTH colaboran para mantener los niveles adecuados de calcio sérico. Así mismo, la PTH es la responsable de llevar a cabo la absorción de calcio en el intestino y disminuir la cantidad de calcio que posteriormente será excretada por medio de las heces y la orina (De Matos, 2008). Véase **Figura 1 y 2**



**Figura 1.** Esquema de la regulación de calcio en suero sanguíneo en aves.  
[Adaptado de Matos, R., 2008]





**Figura 2.** Esquema de la regulación de calcio en suero sanguíneo en aves.  
[Adaptado de Matos, R., 2008]

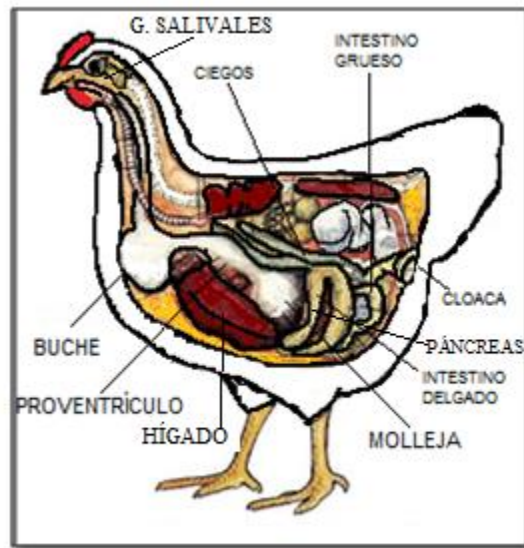
## 1.2 ABSORCIÓN DE CALCIO EN AVES

El tracto gastrointestinal (TGI) en la gallina de postura en comparación a otras aves no adaptadas a una producción tan intensiva de huevo, tiene una variedad de adaptaciones anatómicas y fisiológicas para que la absorción de calcio sea altamente eficiente (Dacke, 2000).

Los procesos para utilizar el calcio y otros nutrientes inician en el pico, las aves pueden distinguir básicamente los mismos sabores que los mamíferos, sin embargo, es posible que no los diferencien con la misma capacidad, debido a la baja cantidad de receptores gustativos. La lengua de las aves presenta un estrato córneo que tapiza la superficie del órgano, por lo tanto las papilas gustativas se encuentran principalmente en la raíz, en el piso de la bucofaringe u orofaringe y en el paladar, es en este sitio en la cavidad bucofaríngea, donde el alimento es deglutido y permanece intacto, en esta parte la absorción de calcio es nula. Con ayuda de la secreción salivales, el alimento continúa hacia el esófago, el cual se dilata y forma el buche o ingluvis, sitio de almacenamiento transitorio del alimento, la estancia de las partículas en este sitio depende de su diámetro geométrico medio y peso así

como de la edad del ave, siendo generalmente granos de no más de 1 a 3 mm que se pueden llegar a quedar hasta por 40 min. Al terminar el esófago se encuentra el aparato gástrico o estómago, compuesto por dos segmentos morfofuncionalmente diferentes: el estómago glandular o proventrículo que cumple funciones secretoras, relacionadas con la digestión química, y el estómago muscular (también conocidos como ventrículo o molleja) en el que se realiza la digestión mecánica, este organo da paso directamente al intestino delgado y es ahí donde se da en mayor proporción el proceso de absorción de nutrientes y fármacos, finalmente se encuentra el intestino grueso formado por el yeyuno, ileo, dos ciegos y el recto, que culmina junto a los sistemas urinario y genital en un órgano común denominado cloaca. Las glándulas anexas del sistema digestivo incluyen a las glándulas salivales, hígado y páncreas que participan también en funciones inmunológicas (Verduzco *et al.*, 2010). El tránsito gastrointestinal de la gallina se da aproximadamente en 4 - 5 h, siendo uno de los más rápidos en las especies de producción pecuaria (Cook, 2017).

Véase **Figura 3**



**Figura 3.** Esquema del Sistema digestivo y glándulas anexas en aves.

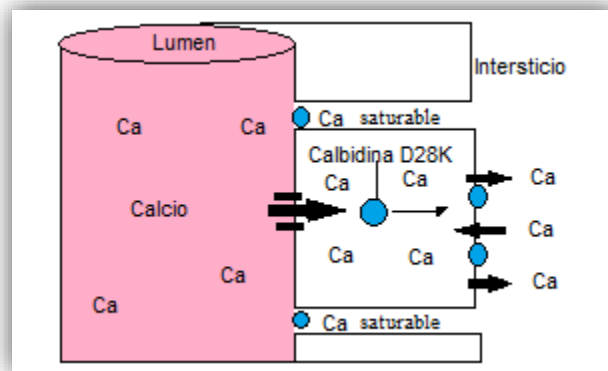
El mayor porcentaje de absorción de calcio ocurre en el duodeno y la porción anterior del yeyuno, principalmente por dos vías, la transepitelial que es la de mayor proporción y la paracelular en la cual se requiere de transportadores específicos y su porcentaje de saturación es mayor ya que necesitan energía para mover el calcio en contra de un gradiente electroquímico a nivel intestinal (Fernández, 1995 y Dunn *et al.*, 1995), el primero es considerado como un mecanismo poco saturable, dado que depende de la concentración del calcio a nivel luminal y se presenta a lo largo del intestino delgado. Estos procesos de absorción están regulados por la hormona 1,25-dihidroxicolecalciferol mediante dos mecanismos:

- el primero es no dependiente de la expresión genómica y síntesis de proteínas
- el segundo es no dependiente de la activación genómica, este genera una respuesta más rápida.

El primero esta ejemplificado por la síntesis de la Proteína Transportadora de Calcio (CaBP) (Bronner, 1987) denominada también Calbidin-D28k (Fernández, 1995) y un oligómero de 400-kDa (Dunn *et al.*, 1995). Se trata de un proceso complejo que involucra el movimiento luminal del calcio a través de las microvellosidades membranales del interior de los enterocitos, la traslocación del calcio desde el punto de entrada hasta la membrana basolateral y la extracción activa desde el enterocito al sistema circulatorio (Wasserman y Fullmer, 1995). El segundo, esta ejemplificado por el incremento rápido en la concentración intracelular de calcio por la apertura y cierre de canales (Norman y Hurwitz, 1993).

Las dos vías descritas en el proceso de absorción del calcio, dependerán principalmente de dos factores: 1) la cantidad de calcio presente en el lumen intestinal y 2) la concentración de 1,25-dihidroxicolecalciferol en el plasma. Si se modifica la cantidad de calcio consumido se tendrán efectos contrarios sobre las dos rutas de absorción del calcio (Bronner, 1987), es decir, un incremento en el consumo de calcio reducirá la regulación de los procesos saturables, mientras que la cantidad de calcio movido por la ruta no saturable se incrementará en proporción directa al incremento en el consumo. Por el contrario, una

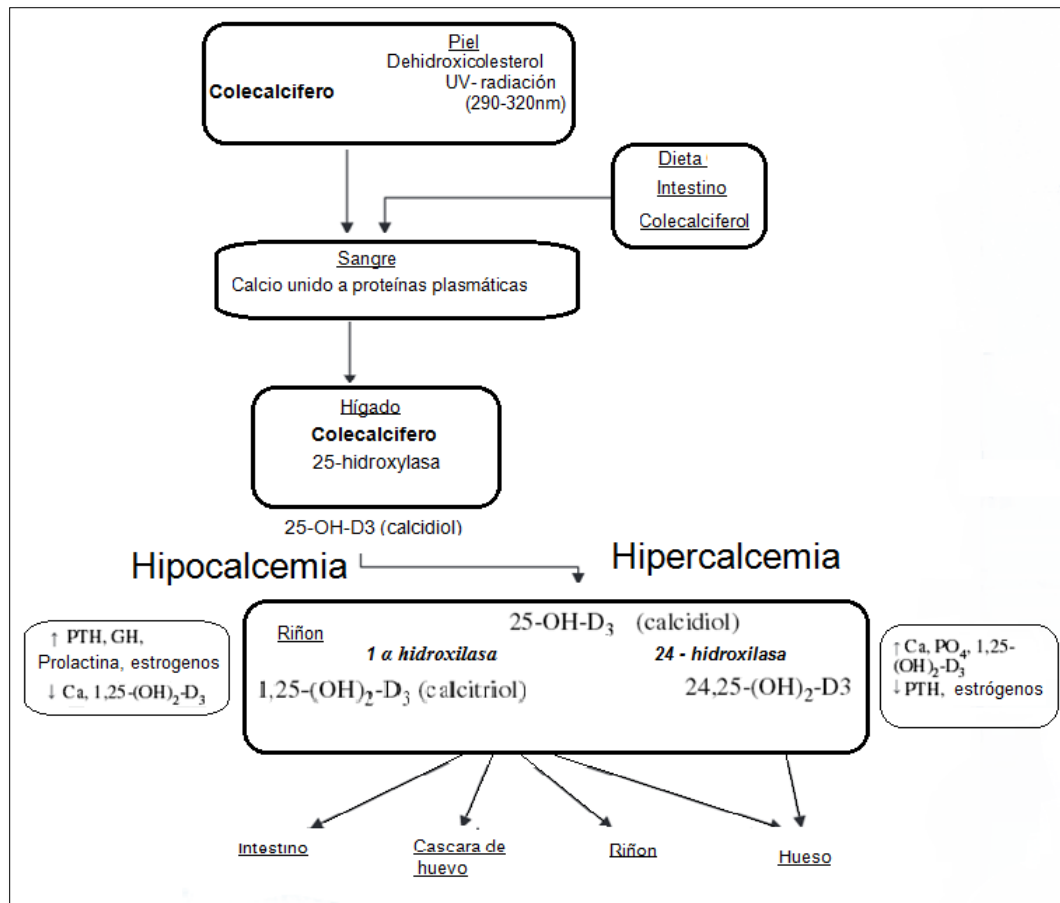
disminución en el consumo de calcio conducirá al resultado opuesto. Por lo que la concentración de calcio a nivel intestinal estará determinada por la tasa de consumo la cual se va a ver regulada por el estado de formación del huevo y la presentación de calcio en el alimento. (Soares, 1984 y Wideman, 1987). Véase **Figura 4**



**Figura 4.** Esquema de la síntesis de la Proteína Transportadora de Calcio, Calbindin-D28k (CaBP)

Las concentraciones plasmáticas de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) disminuyen a medida que el calcio es bombeado desde la sangre hacia la glándula cascarígena para formar el cascarón de modo que la concentración más baja se alcanza alrededor de las 14 horas post-ovoposición. Esa reducción se ve reflejada en un estado de hipocalcemia, la cual estimula la actividad de la enzima 25-hidroxicolecalciferol 1- $\alpha$  hidroxilasa a nivel renal la cual induce la transformación de la 25-hidroxicolecalciferol en 1,25-dihidroxicolecalciferol o calcitrol (Soares, 1984; Frost y Roland, 1991) lo que provoca una reabsorción de calcio y por consecuencia produce una reducción en su excreción renal. Así mismo, una baja concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en plasma estimula la secreción de la PTH u hormona paratiroidea encargada de la regulación de la concentración de iones calcio en el líquido extracelular, aumentando la resorción ósea al estimular a los osteoclastos, lo que libera más calcio al torrente sanguíneo. En el caso de requerir un mayor número de iones de calcio el organismo del ave aumenta la reabsorción en el túbulo proximal renal, calcio procedente del hueso, principalmente, para así aumentar los niveles de calcio en sangre. Esta actividad endocrina se encuentra relacionada a la activación de la enzima 1,25-

dihidroxicolecalciferol, metabolito de la vitamina D<sub>3</sub> (Elaroussi *et al.*, 1994; Soares, 1984). Véase **Figura 5**.



**Figura 5.** Esquema del metabolismo del calcio en aves.

[Adaptado de Matos, R., 2008]

Se ha encontrado que conforme avanza la edad de las aves la absorción de calcio a nivel intestinal se ve reducida (Al-Batshan *et al.*, 1994), lo cual ha sido relacionado a una disminución en la actividad de la enzima 25-hidroxicolecalciferol 1- $\alpha$  hidroxilasa a nivel renal y la consecuente disminución de la concentración plasmática de la 1,25-dihidroxicolecalciferol estimulada por la baja concentración de estrógenos, según Frost y Roland (1991), describen que las aves de 48 semanas de edad tienen concentraciones no mayores a 646 mol/L de 1,25-dihidroxicolecalciferol 1- $\alpha$  hidroxilasa y que en aves de 75

semanas de edad se encontrarían niveles por debajo de la mitad de dicha enzima (300 mol/L).

Se sabe que en las aves, tanto en el ciclo ovulatorio como en el ciclo de formación del cascarón se encuentran activas tanto la resorción ósea (actividad osteoclástica) como la acreencia ósea (actividad osteoblástica) y pueden actuar simultáneamente (Etches en 1987), sin embargo la actividad osteoblástica es la predominante durante el proceso de biomineralización del huevo.

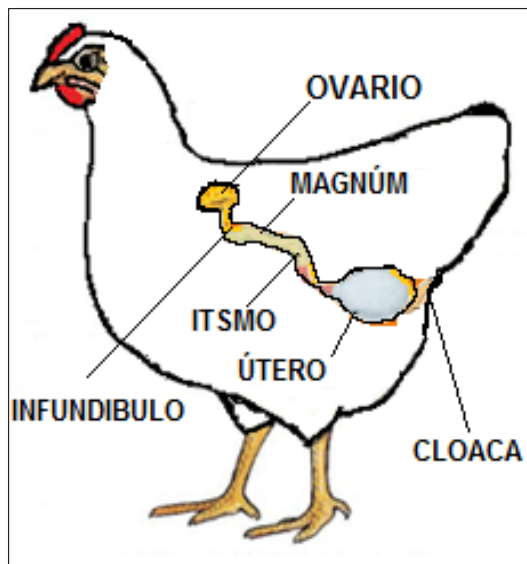
En estudios realizados durante periodos de privación de calcio en aves (Cardona, 1999, Rodríguez y Bravo, 2019.) se ha visto que la corteza ósea es la encargada de suministrar los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo, cuando la demanda es de tipo crónica, la movilización de éste mineral es a nivel del hueso medular.

Con lo anterior en mente es posible argumentar que cuando el ave consume una gran cantidad de calcio durante las primeras horas post-ovoposición, la calcificación del cascarón será baja, ya que este ion será destinado principalmente a la acreencia ósea en tanto que el consumo durante las horas intermedias en las que corresponde la formación del cascarón donde existe una alta demanda de calcio, se destinará principalmente para la actividad osteoclástica la encargada de suministrar el calcio al torrente sanguíneo dado que durante esas horas el consumo de calcio total normalmente es menor. Esto estaría reforzado por los datos reportados por Clunies *et al.*, 1992 los cuales muestran que el calcio consumido durante las horas de máxima deposición del cascarón fue más bajo que durante los otros periodos lo que indica que se está depositando más calcio en el cascarón que el que es aportado desde el tracto digestivo y esto es debido a que los bajos consumos que se presentan durante esos períodos no logran compensar la cantidad de calcio que es bombeado hacia el cascarón por lo que el calcio será removido de la parte medular de los huesos. Esto concuerda con las variaciones en la concentración de fósforo (P) plasmático reportadas por Frost y Roland (1991) que muestran su máxima concentración durante las horas de mayor requerimiento de calcio para la formación del cascarón y las cuales son un indicador de la actividad osteoclástica. Dado que durante la resorción ósea se libera Ca y P

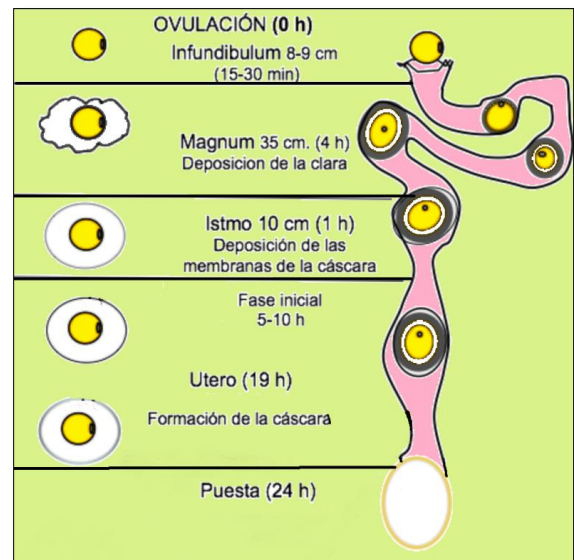
simultáneamente y debido a que éste último no es empleado en la formación del cascarón, el exceso es expresado como un incremento en las concentraciones plasmáticas.

### 1.3 FISIOLÓGÍA DE LA FORMACIÓN DEL HUEVO

Entre la semana 17 a 19 de edad la gallina alcanza la madurez sexual y comienza a poner huevos, a este suceso se le conoce comúnmente como romper postura. La formación del huevo tiene una duración aproximada de 24 horas. El sistema reproductor de la gallina está formado por un ovario que contiene un conjunto de folículos en diferentes grados de maduración y un oviducto funcional (el izquierdo) que es un órgano tubular dividido en cuatro segmentos: infundíbulo, magnum, istmo y útero o glándula cascarígena y se extiende desde el ovario hasta la cloaca, tiene una longitud aproximada de 60 a 80 cm (Fernández y Arias, 2000). Véase **Figura 6 y 7**



**Figura 6.** Esquema del sistema reproductor de la gallina.



**Figura 7.** Esquema del oviducto de la gallina con el tiempo de estancia del ovulo en cada sitio. [Adaptado de Yves Nys]

El cascarón está compuesto de aproximadamente un 95% de carbonato de calcio, principalmente en forma de cristales de calcita (iones de calcio con iones bicarbonato:  $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$ ) (Arias y Fernández, 2001; Arias y Fernández, 2008), y 5% de material orgánico que se localiza dentro y entre los cristales de carbonato cálcico, en forma de membranas y con una matriz orgánica (Nys *et al.*, 2004 y Chien *et al.*, 2009).

El calcio no se almacena en las células del oviducto, tiene que ser transportado de la sangre al útero, principalmente por mecanismos activos que representa una alta demanda de energía durante la producción del cascarón del huevo y en menor proporción por mecanismos pasivos durante la formación del cascarón (Nys *et al.*, 2004).

Cuando se origina el proceso de absorción de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , el tracto digestivo no puede soportar los enormes requerimientos de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que demanda la glándula coquiliaria esto ocurre durante las horas nocturnas cuando el tracto digestivo está vacío, los niveles sanguíneos de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyen (Wideman, 1987, Frost y Roland, 1991 y Cardona, 1999). La disminución en los niveles plasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la glándula paratiroides para secretar PTH, lo que resulta en un incremento en la movilización de minerales del hueso (Wideman, 1987). Debido a que durante la resorción ósea se libera el Ca y el P con una relación de 2.5 a 1 y la relación de Ca a P en el cascarón es de 20 a 1 (Wideman, 1987), el P liberado en exceso se acumula en la sangre (Frost y Roland, 1991; Wideman, 1987) esta acumulación de P en la sangre es atenuada por una estimulación en la excreción de P urinario por la PTH (Wideman, 1987). Simultáneamente, como resultado de la reducción en la tasa de filtración y/o como resultado de la acción sostenida de la PTH sobre los riñones, la excreción urinaria de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye (Wideman, 1987).



#### 1.4 CICLOS DE PRODUCCIÓN EN GALLINA DE POSTURA

Existen diversas maneras de comenzar la producción de un ciclo de postura, algunos productores compran pollitas de un día de edad; otros comienzan el ciclo con pollas (pollonas) próximas a empezar la producción (de 15 a 16 semanas de edad), o adquieren gallinas de fin de primer ciclo para realizar la pelecha forzada con el propósito de mantenerlas en su segundo ciclo. (Hernández *et al.*, 2006). Las gallinas productoras de huevo para plato se mantienen en un primer ciclo de hasta 75-80 semanas de edad; sin embargo existe evidencia que el periodo con la mayor producción de huevo solo dura 55 a 60 semanas, como resultado se obtiene en promedio que una gallina puede producir 360 huevos en un solo ciclo. (Berry, 2003). Para que esto suceda la gallina tiene que desarrollar todo su potencial genético por lo que se vuelve indispensable que la crianza se realice en condiciones óptimas esto incluye: manejo, bioseguridad, alojamiento, alimentación y obtener los parámetros establecidos por la línea genética; además de planificar los replazos. (Quintana, 2008).

Una práctica común que ayuda a disminuir costos de producción, es la de someter a las aves a un segundo ciclo de postura, esto se logra por medio de la pelecha forzada, fenómeno natural que se observa en gallinas, pavas y otras aves, proceso que se caracteriza por que todas ellas dejan de poner huevos, mudan o se les caen las plumas y experimentan una serie de cambios fisiológicos que las preparan para volver a iniciar un ciclo de postura (Quintana, 1999). Véase **Cuadro 1**.

**Cuadro 1.** Semanas de uno y dos ciclos productivos

<b>CICLO PRODUCTIVO DE UNA GALLINA</b>	
<b>ETAPA</b>	<b>EDAD (semanas)</b>
<b>CRIANZA</b>	0-19
<b>PRIMER CICLO</b>	20-80
<b>PELECHA</b>	81-85
<b>SEGUNDO CICLO</b>	85-123

Sin embargo se sabe que este segundo ciclo es menos eficiente disminuyendo la calidad del huevo, lo cual se puede evaluar mediante la calidad del cascarón (Wistedt *et al.*, 2019). Durante este segundo ciclo se ha demostrado que los procesos de absorción intestinal en las aves “viejas” disminuyen para una gran cantidad de nutrientes, incluido el calcio (Mutucumarana *et al.*, 2014). Se sabe que la calidad de huevo en un segundo ciclo puede disminuir hasta en un 40%, observándose un mayor porcentaje de cascarones rotos, incompletos, malformados o con fisuras; sin embargo, en algunos casos las pérdidas económicas por este segundo ciclo son menores al cambio de iniciar una nueva parvada (Wistedt *et al.*, 2019).

## **1.5 CALIDAD DEL HUEVO Y SU CLASIFICACIÓN**

La clasificación de la calidad del huevo se hace por grados, establecidos en las normas nacionales e internacionales. La Norma Mexicana NMX-FF-127-SCFI-2016 que reconoce seis tamaños de huevo fresco de gallina, que están determinados por su peso; incluye factores externos e internos que contienen medidas cuantitativas y otras subjetivas; en general, las características exteriores incluyen factores como la limpieza, solidez, dureza, textura y forma del cascarón.

Existen varios métodos para medir la calidad externa del huevo, como son la resistencia de la cascara; mediante la aplicación de presión y peso sobre el huevo (medida en Newton) hasta que este se fisure o se rompa, la medición del color usando espectrofotometría; la gravedad específica a través de soluciones salinas con diferentes concentraciones entre otros métodos (De Ketelaere *et al.*, 2002).

Durante los últimos años se han desarrollado varios tipos de sensores para garantizar la calidad de la cascara de huevo y se cree que estos sensores pronto reemplazarán la típica operación a trasluz que hasta ahora se lleva a cabo en varias granjas. Estos sensores garantizan la inspección visual de la cascara detectando grietas, fisuras y resistencia de la misma, todo esto utilizando la tecnología llamada visión por computadoras. Además algunos otros sensores basan sus principios en operaciones ultrasónicas, de resonancia magnética y de punta electrónica. (De Ketelaere *et al.*, 2004).

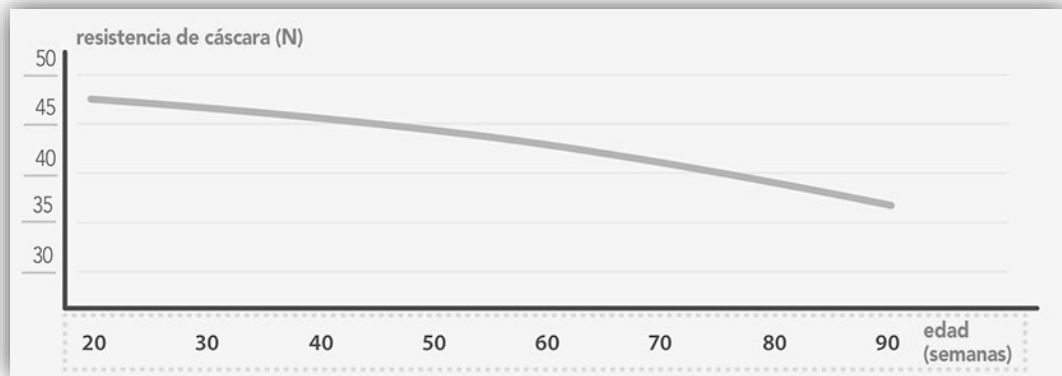
La resistencia de la cascara se determina al aplicar una fuerza progresiva hasta que el cascarón se rompe o se fisura.

El grosor es medido generalmente con un vernier digital de precisión realizando las lecturas de la cascara en el polo medio, superior e inferior. Véase **Figura 8**

$$\text{Área} = 3.9782W \times 0.7056$$

Donde W= peso el huevo (g)

0.7056 = es una constante



**Figura 8.** Evaluación de la resistencia o ruptura de la cascara según la edad de la gallina.  
[Avicultura.info]

La gravedad específica tiene una estrecha correlación con la calidad del cascaron como se puede observar en la siguiente fórmula:  $K_{dyn} = m \cdot cte \cdot RF^2$

Donde:

m= masa de huevo

cte= es una constante

RF= es la frecuencia de resonancia de la vibración en Hz captada por el micrófono

Los resultados se pueden interpretar con el **Cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Gravedad específica ligada a la calidad del huevo

<b>Gravedad específica</b>	<b>Calidad</b>
+1.090	Muy buena
1,090-1,081	Buena
1.080-1,079	Neutra
1,079-1,077	Regular -Mala
-1,077	Muy Mala

Los huevos con cáscara dañada son es un riesgo importante para la salud pública, ya que los huevos con una cáscara deteriorada se contaminan más fácilmente con bacterias (Henzler *et al.*, 1994) y como resultado disminuye la calidad de éste alimento; por lo que se considera que el cascarón del huevo es un factor fundamental en la aceptación o rechazo para su comercialización; también pierden valor comercial, lo que provoca pérdidas económicas sustanciales para la industria (Hamilton *et al.* 1979; otros aspectos a considerar son: el peso, forma, color, grosor, densidad y textura del cascarón. Todos estos factores influyen directamente en el precio y preferencia del consumidor, por lo que es necesario estandarizar las características ideales que se buscan para una buena producción (Rodríguez y Bravo, 2019). ); al existir multiples factores involucrados, la incidencia no es precisa; sin embargo hay reportes que indican entre 8 y 10 % de la producción total (Washburn, 1982).

## 1.6 FUENTES DE CALCIO UTILIZADAS EN LA NUTRICIÓN ANIMAL

Entre las fuentes de calcio disponibles para la alimentación de las gallinas, existen diferencias en su calidad y biodisponibilidad; siendo esta última en ocasiones incierta debido a la variación en su composición química, solubilidad *in vitro*, diámetro geométrico, y la presencia de otros minerales ( Fassani *et al.*, 2004 y Lichovnikova, 2007) una de las más utilizadas es el carbonato de calcio como piedra caliza (Rostagno *et al.*, 2005), sin embargo, las fuentes de calcio utilizadas en la dieta de las aves varían en su composición y biodisponibilidad relativa de calcio en un intervalo de entre 5.7% hasta 14.8% de carbonato de calcio disponible y su biodisponibilidad no siempre es la ideal (Ueda y Taira, 2013 y Hamdi *et al.*, 2015). El carbonato de calcio es la fuente de calcio más utilizada debido a su bajo costo y fácil adquisición, tiene un contenido aproximado de 36% de carbonato de calcio pero no se puede administrar a través del agua potable, ya que su solubilidad en agua es muy baja (0.0013%), (Purgstaller *et al.*, 2019). Esta fuente de calcio también contiene otros iones bivalentes, como magnesio, manganeso, zinc, cobre y hierro, se ha postulado que puede haber interacciones nutricionales entre ellos, debido a la competencia por los sitios de absorción (Hafeez *et al.*, 2015).

Otros factores a considerar es la interacción con los componentes dietéticos, como la quelación por la presencia de fitatos, (Novak y Scheideler, 2001) y en particular, por el rápido tiempo de tránsito gastrointestinal (TGI) de la gallina. (Herrera *et al.*, 2018), que limita el tiempo de absorción de este mineral a una media de 4.5 h (Cook, 2017).

A pesar de lo anterior, los valores de Biodisponibilidad (F) reportados hasta ahora en las gallinas incluyen lactato de calcio (34%), gluconato de calcio (27%), fosfato de calcio (26%), (Yenice *et al.*, 2015), citrato de calcio (21%) y carbonato de calcio (20%) (Dahiya *et al.*, 2016 y Li *et al.*, 2017).

El tamaño de partícula de la fuente de calcio también tiene una relación directa con el tiempo de tránsito y, en consecuencia, con el tiempo de absorción. Las partículas

relativamente grandes ( $> 0.5$  mm) muestran una estancia más prolongada en el tracto gastrointestinal (TGI) y permanecen disponibles para la absorción hasta por 12 h, lo que permite la degradación de la partícula y la posterior liberación de iones calcio (Rennie *et al.*, 1997). El carbonato de calcio es una de las fuentes más utilizadas y se agrega habitualmente a la dieta de las gallinas en gránulos de 2 a 4 mm, o incluso más pequeños (Rodríguez y Bravo, 2019).

### **1.7 VELOCIDAD DE ABSORCIÓN DE NUTRIENTES EN AVES**

Entre las múltiples funciones del TGI se encuentra los procesos de absorción de nutrientes y medicamentos, cuando éstos son administrados vía oral en el alimento o en el agua de bebida, los procesos que actualmente describen estos eventos consideran una serie de sucesos de repulsión y/o atracción de cargas electromagnéticas que dependen en gran medida de su hidro o lipofobicidad, utilizando apertura o cierre de canales, además de algún tipo de acarreador, consiguiendo atravesar membranas celulares por gradientes de concentración o ser introducidos a las células y al intersticio por algún sistema de bombas de eflujo sin olvidar que experimentan un metabolismo de primer paso a nivel hepático (Sumano *et al.*, 2015).

Si se compara con el sistema digestivo de otras especies animales (rumiantes, fermentadores, monogástricos, herbívoros, carnívoros, etc.) se consideraría uno de los más cortos y con menor tiempo de retención (4-6 horas), esta característica fisiológica da como resultado una baja absorción de nutrientes y fármacos (Cook, 2017). Cabe destacar que su velocidad de absorción puede verse modificada por muchos otros factores como por ejemplo, cambios en el pH de los diferentes segmentos, la presencia de altas concentraciones de iones de distinto origen químico, la presencia y degradación enzimática, resistencia de la permeabilidad de la mucosa, movimientos antiperistálticos y la presencia de alimento solo por mencionar algunas (Sumano *et al.*, 2015).

Por otra parte algunos estudios demuestran que los procesos de absorción intestinal disminuyen para una gran cantidad de nutrientes incluyendo los minerales cuando las aves comienzan a tener mayor edad es decir en gallinas “viejas” (Mutucumarana, 2014).

## 1.8 PROMOTORES DE LA ABSORCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO

Se le llama promotor de la absorción al desarrollo y uso de moléculas que potencialicen el ingreso de sustancias al interior del organismo cuya función es la de inducir un aumento en la permeabilidad por uno o más mecanismos por ejemplo, alterando las cargas de la membrana, haciendo más fluida la bicapa lipídica, inactivando o disminuyendo las reacciones enzimáticas o simplemente influenciando la entrada del fármaco por cualquier otra vía. Todo esto a través de elementos que se acoplen, vehículos estratégicos, transportadores específicos o simplemente impidiendo ser expulsados por las bombas de eflujo muchas veces presentes en el lumen intestinal con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad de todos ellos (Sumano *et al.*, 2015). Los promotores de la biodisponibilidad que se utilizaron en este trabajo son los siguientes:

### 1.8.1 EXTRACTO ACUOSO DE PALO AZUL (*Eysenhardtia polystachya*)

Actualmente el uso de extractos naturales como promotores de la absorción se ha vuelto una tendencia debido a las reformas regulatorias que en este momento rigen nuestro país (SAGARPA, 2019) y organismos regulatorios internacionales como Food and Drug Administration (FDA) y European Medicines Agency (EMA) lo que da como resultado la búsqueda de nuevas opciones en la mejora de la terapéutica veterinaria. Una alternativa es el uso de plantas, hierbas y raíces medicinales dada la variedad de principios activos potenciales y al mismo tiempo aprovechar su naturaleza biodegradable (Alcalá *et al.*, 2015).

La *Eysenhardtia polystachya* es una planta originaria de América, es conocida como palo azul o palo dulce. En el tallo se han identificado los flavonoides dimetoxi-metilendioxi-pterocarpan y dehidrorotenona, el esteroil beta-sitosterol y un componente de estructura no determinada el agustlegorretoside, en la corteza del tallo se ha detectado la presencia del triterpeno beta-amirina. En el duramen el flavonoide hidrox-trimetoxi-isoflavona y en la madera del tronco, los flavonoides coatlina A y B además de cumarina flemichaparín C (Martínez, 1991 y Argueta *et al.*, 1994). Su uso se remonta a los aztecas y existe evidencia de ello en el Códice Florentino (Ortega, 1892) es ahí donde se da a conocer “que el agua

bebida de la madera reposada era adecuada para curar la tos, problemas de orina y riñón” expresó Martínez en 1991, a pesar de su extenso uso en humanos, existe muy poca información en el ámbito veterinario; sin embargo la Sociedad Mexicana de Historia Natural en el siglo XIX describió su uso como diurético y para las epizootias de las gallinas (Argueta *et al.*, 1994). Existe evidencia científica que al administrar el extracto acuoso en el agua de bebida a las aves de producción se obtienen excelentes resultados al mejorar la salud de la parvada (Carrillo, 2013 y Gutiérrez *et al.*, 2015). Desafortunadamente no se han realizado estudios suficientes farmacológicos y fitoquímicos que demuestren cuál de las moléculas presentes en el extracto acuoso es el responsable de generar dichos beneficios.

### **1.8.2 EXTRACTO ACUOSO DE JUGO DE TORONJA (*Citrus paradisi*)**

La toronja pertenece a la familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideae género “citrus”, su origen es atribuido al norte de Asia principalmente en China, sin embargo este cítrico puede crecer en condiciones ambientales muy diversas, siendo Estados Unidos, Sudáfrica, China, Israel y México los mayores productores a nivel mundial (Cruz-Fernández, 2007). Se le ha identificado compuestos como: protopectinas, pectinas, azúcares, minerales, flavonoides, aminoácidos, vitamina C entre otros (Rojas *et al.*, 2007). En el jugo se han identificado azúcares como glucosa, fructuosa y sacarosa además de ácido cítrico, málico, tartárico y vitaminas C y B así como licopenos (carotenoides) que son los responsables de dar la pigmentación al jugo (Villa-Londono, 1996). Por su actividad farmacológica se han desarrollado numerosas investigaciones que le han atribuido propiedades antibacterianas (Barrion *et al.*, 2014), antifúngicas (Ortuño *et al.*, 2006), antivirales (Buitrago *et al.*, 2011), antioxidantes (Nijveldt *et al.*, 2001) y promotoras de la absorción de algunas sustancias (De la Rosa-Hernandez *et al.*, 2016).

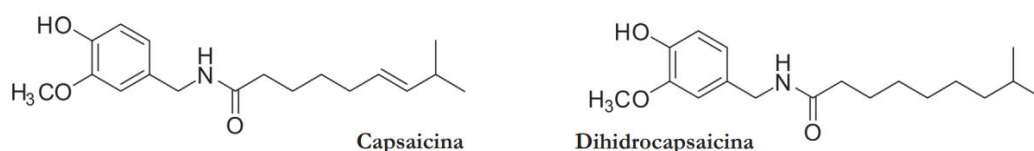
### **1.8.3 EXTRACTO DE OLEORRESINA DE CAPSICUM**

Existen diferentes productos para promover la absorción de los fármacos y minerales; sin embargo, no todos cumplen con los requisitos fundamentales para poder ser útiles en la industria avícola, considerando que uno de los principales es el costo. Una opción que se puede considerar importante por sus múltiples beneficios y de bajo costo es la oleorresina



de capsaicina ya que aparte de mostrar actividad antibacteriana y disminuir la liberación fecal de *Salmonella* sp, este material es un pigmento natural de la yema y se considera un promotor del crecimiento no antibiótico que se incluye en las dietas de las gallinas en todo el mundo normalmente de 3 a 5 ppm (Huang, 2012).

La capsaicina es un alcaloide de fórmula  $C_{18}H_{27}O_3 N$  es sólido a temperatura ambiente (punto de fusión  $64^{\circ}C$ ). Su nombre es (E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilnon-6-enamida. Conjuntamente con la dihidrocapsaicina (capsaicina que ha perdido el doble enlace por hidrogenación), forman el 90% de todos los compuestos responsables del picor del ají y los pimientos (Reyes-Escogido *et al.*, 2011). Véase **Figura 9**



**Figura 9.** Estructura química de la capsaicina y dihidrocapsaicina.

En 1912, el químico Wilbur Scoville desarrolló la escala Scoville que mide el grado de picor de un pimiento. Scoville asignó un valor de cero a los pimientos dulces, que no pican (Scoville, 1912). En el otro extremo de la escala ubicó a la capsaicina a la que le dio un valor de dieciséis millones como la sustancia más picante (Caterina *et al.*, 1997). Como se muestra en el **Cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Grado de picor o pungencia de diferentes pimientos, según la escala Scoville.

Fruto	Grado de picor
Pimiento común/dulce	< 100
Pimiento mexicano	100-500
Pimiento de cayena	30 000-50 000
Pimiento habanero	100 000-350 000
Capsaicina	16 000 000

## **1.9 VEHÍCULOS GASTRORETENTIVOS**

Existen promotores de la biodisponibilidad y retención gástrica, comúnmente utilizados en medicina veterinaria con distintas funciones; pueden actuar como agentes de revestimiento, desintegrantes, agentes formadores de películas, mucoadhesivos, y como agentes que incrementen la viscosidad. Algunos ejemplos son: chitosan, ciclodextrinas, carbopol, metocel y los poloxámeros ya que actúan como sistemas de liberación modificada. Siendo los mucoadhesivos una opción significativamente importante ya que generan una adherencia a la pared gástrica aumentando el tiempo de contacto y esto a su vez incrementa la biodisponibilidad de los minerales (Aulton, 2004).

De todo lo anterior se desprende la necesidad de diseñar una forma farmacéutica de calcio que aumente la absorción y por ende su biodisponibilidad sea mayor a nivel intestinal, así como crear un preparado de liberación modificada que promueva la estancia de este mineral en el organismo del ave durante mayor tiempo.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El huevo es una de las principales fuentes de proteína de origen animal en el mundo y posiblemente la más económica de todas, México se encuentra entre los principales productores de huevo y es el principal consumidor a nivel mundial. A pesar de que la producción de huevo sea tan eficiente, la fase de mayor producción de huevo solo dura 55 a 60 semanas de vida, posteriormente la calidad de la producción se ve disminuida, reflejándose esto en la calidad del cascarón. Entre las principales causas de esta caída en la calidad del huevo se ha encontrado que en gallinas “viejas” (mayores de 70 semanas) la absorción del calcio a nivel intestinal es menor. Debido a ello es importante considerar fuentes de calcio de mayor biodisponibilidad (lo cual puede aumentar los costos de producción) o utilizar vehículos promotores de la absorción que no aumenten significativamente estos costos. Por otro lado, es importante considerar que el vaciamiento del TGI de las aves es más rápida que la mayoría de las especies domésticas, siendo en promedio de 4-6 horas, lo que da poco tiempo de absorción al calcio. Si se considera todo lo anterior, el uso de vehículos promotores de la biodisponibilidad conjuntamente con vehículos que modifiquen el tiempo de estancia del mineral, podrían aumentar la absorción de calcio a nivel del TGI, proporcionando a las aves el calcio sérico suficiente para mantener la calidad de la producción de huevo en gallinas “viejas” o de segundo ciclo además de disminuyen finalmente los costos de producción dado que no se va a tener que invertir en la compra de pollito de reemplazo y se va a poder mantener un ciclo más a las gallinas con una eficiente producción de huevo. Se puede eliminar o mejorar la redacción.

### **3. HIPÓTESIS**

El uso de vehículos promotores de la biodisponibilidad de calcio aunados a vehículos de liberación modificada diseñados a los pH's del TGI de las aves puede mejorar la absorción de calcio intestinal, proporcionando una mayor cantidad de calcio para la producción de huevo de buena calidad en gallina de segundo ciclo.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Diseñar mediante el sistema FOLA (patente UNAM: MX/a/2012/013222) un preparado de liberación modificada de calcio con promotores de la biodisponibilidad para gallina de postura de segundo ciclo.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar la biodisponibilidad de diversas fuentes de calcio en aves de postura
- Evaluar *in vitro* diversos vehículos de liberación modificada para carbonato de calcio
- Evaluar *in vivo* diversos vehículos promotores de la biodisponibilidad de carbonato de calcio en aves de postura
- Diseño y evaluación *in vivo*, en unidades experimentales con pocas aves, de los preparados de carbonato de calcio con liberación modificada y con promotores de la biodisponibilidad utilizando el sistema FOLA.
- Evaluación en condiciones de producción comercial intensiva la calidad del cascarón de huevo administrando en el alimento el preparado de carbonato de calcio con liberación modificada y con promotores de la biodisponibilidad., utilizando el sistema FOLA.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 FASE I. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE DIVERSAS FUENTES DE CALCIO EN GALLINA DE POSTURA**

#### **5.2 UBICACIÓN**

El presente estudio se llevó a cabo en una unidad experimental de la FMVZ, UNAM, en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) y en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ, UNAM con autorización del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (SICUAE) de la FMVZ de la UNAM con número de autorización DC-2018/2-1

#### **5.3 ANIMALES E INSTALACIONES**

El presente estudio, se llevó a cabo en el Departamento de Fisiología y Farmacología y en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), de la FMVZ, UNAM, cumpliendo con las regulaciones mexicanas para el uso de animales de experimentación según lo establecido por la Universidad Nacional de Autonomía de México (UNAM) con base en las prescripciones mexicanas de la NOM-062-ZOO-1999 y con la autorización del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la FMVZ con número de autorización DC-2018/2-1. Se utilizó un total de 300 gallinas Bovans White de 24 semanas de edad y 6 semanas de producción con peso promedio de  $1620 \pm 30.2$  g a las cuales se les dividió aleatoriamente en 4 grupos de 75 aves cada uno con tres repeticiones por grupo de 25 gallinas cada una. Las aves se alojaron en jaulas tipo california de 40 cm de ancho, 45 cm de profundidad y 45 cm de altura, con una densidad de tres gallinas por jaula ( $600\text{cm}^2/\text{ave}$ ). Se le proporciono un bebedero de copa por cada jaula (3 aves/jaula) y un espacio del comedero de canal de 13.3 cm/ave, de acuerdo a lo que menciona el manual de la estirpe para el manejo de las aves en jaula (Bovans White, 2020). Se ofreció el agua potable (NOM-127-SSA1-1994) *ad libitum*, se le proporcionó en promedio 100 g de alimento/ave/día, así como un fotoperiodos de 16 horas diarias de luz.

La evaluación consto de dos fases, con los mismos grupos de aves, lo que se modificó fue la adición de calcio en la dieta, en la primera fase la dieta fue balanceada conforme a los lineamientos de la estirpe y en la segunda fase se retiró el total de calcio fino y grueso que se añade normalmente como carbonato de calcio en la dieta; únicamente se mantuvo el calcio contenido en el ortofosfato de calcio. **Cuadro 4 y 5**

**Cuadro 4.** Composición y contenido de nutrientes calculado de la dieta.

<b>Ingredientes (Kg)</b>	<b>Fase I</b>
Maíz	595
Harina de soya 48%	267
Aceite de soya	13.00
Sal	4.00
Carbonato de calcio	101.00
Ortofosfato 1820	11.00
Vitamina-E	3.00
DL-metionina 99	1.98
L-lisina 2.75	2.75
Vitamina B2	0.200
Vitamina B12	0.200
Fitasa Ronozyme (GT)	0.100
Total	1000
Analisis Calculado (g/kg)	
Energia Metabolizable (Kcal/kg)	2859
Proteina cruda%	18.792
Calcio Total	4.100
Fosforo (Disp)3.80	0.450
Metionina + Cisteina 4.50	0.800
Lisina%	0.980
Triptofano%	0.220
Sodio%	0.180
Colina (mg/kg)	1022.63
Cloro%	0.275
Ácido linoleico %	1.867

<sup>1</sup>Cantidad/kg: Retinol 0.9 g, colecalciferol 0.019 g, d-alfa tocoferol 10.004 g, filloquinona 1.0 g, riboflavina 4.0 g, cianocobalamina 0.060 g, piridoxina 3.0 g, pantotenato de calcio 13.0 g, niacina 25 g, biotina 0.063 g, cloruro de colina 250 g. <sup>2</sup>Cantidad / kg: 0,2 g de selenio, 0,1 g de cobalto, 0,3 g de yodo, 10 g de cobre, 50 g de zinc, 100 g de hierro, 100 g de manganeso.

**Cuadro 5.** Composición y contenido de nutrientes calculado de la dieta.

<b>Ingredientes (Kg)</b>	<b>Fase II</b>
Maíz	595
Harina de soya 48%	267
Aceite de soya	13.00
Sal	4.00
Carbonato de calcio	0
Ortofosfato 1820	11.00
Vitamina-E	3.00
DL-metionina 99	1.98
L-lisina 2.75	2.75
Vitamina B2	0.200
Vitamina B12	0.200
Fitasa Ronozyme (GT)	0.100
Total	1000
Análisis Calculado (g/kg)	
Energía Metabolizable (Kcal/kg)	2859
Proteína cruda%	18.792
Calcio Total	0
Fosforo (Disp)3.80	0.450
Metionina + Cisteína 4.50	0.800
Lisina%	0.980
Triptofano%	0.220
Sodio%	0.180
Colina (mg/kg)	1022.63
Cloro%	0.275
Ácido linoleico %	1.867

<sup>1</sup>Cantidad/kg: Retinol 0.9 g, colecalciferol 0.019 g, d-alfa tocoferol 10.004 g, filloquinona 1.0 g, riboflavina 4.0 g, cianocobalamina 0.060 g, piridoxina 3.0 g, pantotenato de calcio 13.0 g, niacina 25 g, biotina 0.063 g, cloruro de colina 250 g. <sup>2</sup>Cantidad / kg: 0,2 g de selenio, 0,1 g de cobalto, 0,3 g de yodo, 10 g de cobre, 50 g de zinc, 100 g de hierro, 100 g de manganeso.

Los grupos experimentales se identificaron como: 1.- Carbonato de calcio (GCc): proveniente de reactivos químicos Meyer; 2.- Fosfato tricálcico (GFtc) de Calcigenol®; 3.- Lactato gluconato de calcio (GLgc) de Sandoz®; 4.- Grupo control (GC) únicamente consumió el calcio de la dieta. Todos los grupos fueron dosificados con una fuente de calcio a razón de 1 g de calcio/ave/día a excepción del GC. Las presentaciones farmacéuticas comerciales contienen diferentes concentraciones de calcio lo que conllevó a un ajuste en la dosis para obtener 1 g de calcio/ave/día por presentación farmacéutica. **Ver Figura 10 y Cuadro 6**

**Cuadro 6.** Dosificación de tres diferentes fuentes de calcio: GC= grupo control, GLgc=grupo lactato gluconato de calcio, GFtc= grupo fosfato tricalcico, Gcc= grupo carbonato de calcio. Todos ajustados a dar 1 g/calcio/ave.

Grupo	Dosis (g/ave)	Volumen dosis final (mL)	Fórmula química	Calcio total/mL de producto
GC	0	-	-	-
GCc	1	3.06	CaCO <sub>3</sub>	0.9757±0.2
GFtc	1	2.80	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.071±0.2
GLgc	1	3	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub>	1.000±0.1

Previo a la administración de calcio se tomó una muestra sanguínea basal a todas las aves, posteriormente se tomaron muestras de sangre de al menos 0.5 ml por ave de la vena radial a 8 animales por tiempo y por grupo/repetición, los tiempos de muestreo fueron: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 240 y 1440 minutos. Las muestras se colocaron en tubos sin anticoagulante, manteniéndolas a temperatura de 2°C a 4°C; se centrifugaron a 5000 g durante 15 min para la separación del suero, posteriormente se realizaron las lecturas de concentraciones de calcio en el analizador químico semi-automático Easy Vet®. Ver **Figura 11.** El cual basa sus lecturas en una técnica analítica en la detección y cuantificación de una reacción altamente específica de calcio con o-cresoltaleína-complexona y 8-hidroxiquinolina a pH 8,2 que mide a una longitud de onda de 570 nm. Posteriormente se realizaron las curvas farmacocinéticas de concentración sérica de calcio vs tiempo, con ayuda del programa PkAnalist.



**Figura 10.** Administración de 1g de cada fuente de calcio.



**Figura 11.** Analizador químico Semi-automático Easy Vet®.



## **5.4. FASE II. EVALUACIÓN DE DIVERSOS PROMOTORES DE LA ABSORCIÓN DE CALCIO EN GALLINA DE POSTURA**

En la segunda fase se utilizaron las aves de la fase I con las mismas condiciones y número de animales para determinar los niveles de calcio séricos utilizando como promotor de la biodisponibilidad un extracto acuoso de toronja, capsaicina y palo azul.

### **5.4.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE PALO AZUL (*Eysenhardtia polystachya*)**

Para la elaboración del extracto se adicionó en un litro de agua potable 100 g de tronco de *Eysenhardtia polystachya* previamente identificada por un etnobotánico para confirmar su identidad. Se dejó por un lapso de dos horas a reposar.

Una vez que fue preparado el extracto se tomó con una probeta graduada 0.5 L del mismo y posteriormente fue diluido en 4 L del agua. Esta dilución se agregó al agua de bebida de las aves durante 24 horas 75 gallinas \* 250 ml/día= 19 litros. La toma de muestras de sangre fue al día siguiente a las 6:00 am para imitar los patrones de consumo de calcio de las gallinas en condiciones productivas.

### **5.4.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE TORONJA**

Para la elaboración del extracto de toronja se utilizó el jugo de 1 kg de toronja recién exprimida y tamizada, se quitaron las impurezas. Una vez que fue preparado el extracto se tomó con una probeta graduada 0.5 L del mismo y posteriormente fue diluido en 4 L del agua. Esta dilución se agregó al agua de bebida de las aves durante 24 horas. 75 gallinas \* 250 ml/día= 19 litros. La toma de muestras de sangre fue al día siguiente a las 6:00 am para imitar los patrones de consumo de calcio de las gallinas en condiciones productivas.

### **5.4.3 PREPARACIÓN DE LA OLEORRESINA DE CAPSAICINA**

Para la elaboración del extracto de capsaicina se adicionó una concentración de 20 ppm de extracto oleoso de capsaicina con una pureza de 1,000,000 de unidades Scolville proporcionado por VEPINSA de C.V., Sinaloa, México, al agua de bebida de las aves

durante 24 horas. La toma de muestras de sangre para determinar las concentraciones séricas de calcio, se realizó al día siguiente a las 6:00 am para imitar los patrones de consumo de calcio de las gallinas en condiciones productivas.

## **5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

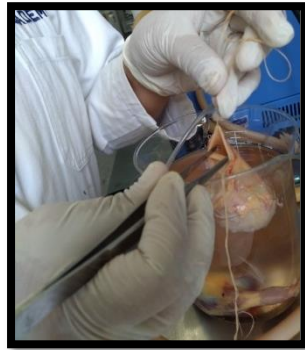
Los resultados de las concentraciones de calcio en suero en ambas fases fueron procesados por el software PKanalyst (MicroMath, Salt Lake City, Utha), utilizando el modelo 5 ( $r^2 = 0.923$ ). La información recopilada fue: área bajo la curva de concentración sérica de calcio en función del tiempo en 24 h ( $AUC_{0-24}$ ), concentración sérica máxima de calcio ( $C_{max}$ ) y tiempo para alcanzar la  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ). Además, los datos obtenidos se analizaron con pruebas de Kruskal-Wallis para muestras independientes donde los parámetros se consideraron significativamente diferentes si  $P < 0.05$ . Además, se utilizaron las pruebas Dunnett "t" para determinar el valor de significación entre las variables  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  y  $AUC_{0-24}$ .

## **6. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE TRES SEGMENTOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL CON PREPARADOS DE CALCIO PARA DETERMINAR EL MAYOR SITIO DE ABSORCIÓN**

En esta fase se utilizaron una muestra de 20 aves en las cuales se procedió a la eutanasia para posteriormente extraer el tracto digestivo y evaluar la concentración de calcio absorbido en buche, molleja y duodeno administrando 1 g de pellet FOLA con carbonato de calcio utilizando el sistema de montaje en cámara de órganos aislados que consiste en mantener vivo al órgano durante un periodo de por lo menos 8 horas, utilizando cámaras de vidrio con recirculación de agua a temperatura de 39 - 40 C° suspendido dentro de la cámara con solución Tyrode que contiene: Na Cl =8.0 g CaCl<sub>2</sub>= 0.2 g Mg Cl<sub>2</sub>= 0.1g KCl = 0.2 g NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>= 0.05 g Dextrosa = 1.0 g NaHCO<sub>3</sub> = 1.0 g H<sub>2</sub>O = cbp 1 L. Solución que mantiene vivo al órgano y a los tejidos proporcionándole energía y nutrientes necesarios, además se conecta una manguera con oxígeno dentro de la solución. **Ver Figura 12, 13, 14, 15 y 16.**



**Figura 12.** Pellet FOLA 1g en cada órgano.



**Figura 13.** FOLA dentro de cada órgano.



**Figura 14.** Segmento duodeno-páncreas.



**Figura 15.** Cámara de órganos aislados.



**Figura 16.** Cámara de órganos aislados con un segmento de buche, molleja y duodeno.

La evaluación consistió en agregar 1 g del preparado FOLA dentro de cada órgano y tomar una muestra de la solución de la cámara de órganos aislados durante 3 horas cada 20 minutos utilizando una pipeta de 1 ml para la toma de muestras. Se obtuvo una muestra de 0.5 ml que se depositó en viales de plástico Eppendorf™ para su posterior lectura en el analizador químico semi-automático Easy Vet®. Es importante señalar que la cantidad de solución recolectada se sustituía con nueva solución Tyrode para mantener constante la cantidad inicial de 250. mL en la cámara.

## **7. EVALUACIÓN POR PREFERENCIA EN EL COLOR EN SISTEMA FOLA MEDIANTE EL CONSUMO**

Para la evaluación sobre la predilección por algún color del pellet prototipo FOLA sin vehículos de liberación modificada, se utilizaron en la granja del CEIEPAv 300 gallinas Bovans white divididas en 5 grupos con 60 aves c/u durante 5 días; los colores utilizados fueron: rojo, verde, anaranjado, amarillo y azul **Véase Figura 17.**

La evaluación consistió en depositar los pellets en el alimento, a las 6:00 am esperar 20 min y recolectar el pellet para pesar cuanto había quedado en el comedero. **Véase Figura 18.**



**Figura 17.** FOLA'S de diferentes colores administradas vía oral en el alimento.



**Figura 18.** FOLAS color rojo en el comedero.



## **8. FASE III. EVALUACION DEL SISTEMA FOLA EN AVES DE POSTURA DE SEGUNDO CICLO DE LOS PREPARADOS DE CARBONATO DE CALCIO DE LIBERACIÓN MODIFICADA MÁS CAPSAICINA COMO PROMOTOR DE LA BIODISPONIBILIDAD**

Se desarrollo un preparado farmacéutico de liberación modificada que cumpla los requisitos de mantenerse en el TGI de las aves por 24 horas a partir de la patente FOLA (F= Biodisponibilidad; O= Optima; LA= Larga acción) registrada por la UNAM con el No de patente MX/a/2012/013222 y que ha sido evaluada con antibacterianos en aves comerciales (Gutiérrez *et al*, 2017). Su principio farmacológico se basa en formas, colores y tamaños ideales para estimular su consumo, más vehículos que proporcionen liberaciones prolongadas en el TGI de las aves con respecto a los pH's de diversos segmentos del intestino (Gutiérrez *et al*, 2018). Así mismo se sabe que la capsaicina (la cual es un insumo común en la avicultura) ha funcionado como promotor de la biodisponibilidad de algunos fármacos en aves (Gutiérrez *et al*, 2002) por lo cual se decidió utilizarla dado el costo que representa su inclusión en la dieta (Gutiérrez *et al*, 2002 y Pelicia *et al.*, 2007).

La evaluación consistió en administrar los 5 productos FOLA de diferente color a un total de 180 gallinas Bovans-White de 80 semanas de edad, con una pelecha de 10 días y un peso promedio de  $1,570 \pm 20$  g; se alojaron tres aves en cada jaula tipo California, de 40 cm de ancho, 45 cm de profundidad y 45 cm de altura (600 cm<sup>2</sup>/gallina). Se les proporcionó agua *ad libitum* por medio de bebedores de taza (uno por cada jaula) y se estableció un programa de iluminación de 16 horas de luz /8 de oscuridad.

El alimento se suministró en un comedero de canaleta (13.3 cm/gallina), conteniendo 4.1% de carbonato de calcio para cumplir ambas recomendaciones para la edad de esta línea genética (Bovans Write 2020). El estudio estableció el tiempo 0 como las 6:00 a.m. con la finalidad de mantener los tiempos de consumo de calcio de los animales en condiciones productivas. Los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos de 45 animales con 3 repeticiones de 15 aves por grupo. Un grupo control (GC) se estableció como testigo sin la inclusion de FOLA, conteniendo 4.1 % de calcio (como carbonato de calcio) se

denominó grupo control (GC) ya que no se les administro FOLA en el alimento. Los tres grupos experimentales restantes no contenían el 4.1 % de carbonato de calcio en el alimento por lo que se solicitó no agregarlo a la formulación, dado que a los grupos experimentales se les administraría en forma de FOLA y fueron identificados como : Grupo Fola Carbonato de calcio (GFCca) incluía carbonato de calcio de Meyer Chemical Reagents, México; 2.- Grupo Fola Carbonato de calcio igual al grupo anterior (Meyer Chemical Reagents, México), adicionado con 7 ppm de oleoresina de capsicum en el sistema FOLA más Capsaicina de Pungencia 500,000 unidades Scoville proporcionada por VEPINSA S.A. de C.V., Los Mochis, Sinaloa, México (GFCcaCp5 ) y 3.- Grupo (GFCcaCp10) igual al anterior pero la capsaicina tenía una pungencia de 1,000,000 de Unidades Scoville.

Se tomaron muestras de sangre (< 1 mL por ave) en los siguientes tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas a 5 aves por grupo tratando de no muestrear más de 2 veces la misma ave. Las muestras se centrifugaron a 5,000 g durante 15 min, se recuperó el suero y se leyó inmediatamente el contenido de calcio mediante un analizador químico semiautomático Easy Kem Vet® (Kontrolab, Ciudad de México), el cual tiene sus bases de detección y cuantificación en una reacción altamente específica de calcio con o-cresoltaleína-complexona y 8-hidroxiquinolina, a un pH de 8.2. Los resultados de las concentraciones de calcio en suero se procesaron mediante el programa de farmacocinética PKAnalyst (MicroMath, Salt Lake City, Utha, 1998). Los datos farmacocinético obtenidos se compararon estadísticamente mediante pruebas de Kruskal-Wallis y pruebas t de Dunnet para muestras independientes. Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando  $P \leq 0.05$ .



## **9. FASE IV. EVALUACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO EN GALLINAS DE POSTURA DE SEGUNDO CICLO CON PREPARADOS TIPO FOLA MÁS CAPSAICINA**

En esta fase se evaluaron las concentraciones de calcio sérico después de administrar el pellet FOLA en el alimento a razón de 8 g por ave que contenían 4.1% de carbonato de calcio ¿será calcio? y se le adicionó una concentración de 6 ppm de extracto oleoso de capsicum con una pureza de 1, 000,000 de unidades Scolville como promotor de la biodisponibilidad.

Se incluyeron un total de 1000 gallinas Bovans-White de 85 semanas de edad. El estudio se llevo a cabo en dos fases: la cinética de calcio (fase 1) se realizó con 400 gallinas, y para el estudio de calidad de cascarón y grosor de huevo se utilizaron 600 gallinas (fase 2). Las gallinas presentaron una muda forzada con duración de 10 días y tenían un peso promedio de  $1,520 \pm 28$  g. Se colocaron en jaulas tipo California, de 40 cm de ancho, 45 cm de profundidad y 45 cm de alto para una superficie de 600 cm / gallina. Se adaptaron a un ciclo de oscuridad / luz de 8 a 16 h, tuvieron acceso libre al agua utilizando bebederos de taza a razón de 3 gallinas / taza, y su alimento se suministró utilizando comederos de canal (13,3 cm / gallina) siguiendo los estándares establecidos por la guía de manejo Bovans-White 2020. Para evitar condiciones de deficiencia de calcio extrema / artificial, la comida incluía un mínimo de carbonato de calcio que correspondía al 2% antes del comienzo de esta prueba.

Para imitar los patrones de consumo de calcio de las gallinas en condiciones de producción, el estudio comenzó el primer día a las 6:00 am y se llevó a cabo durante 5 días. Se dividieron al azar en 4 grupos de 100 animales cada uno, y luego se subdividieron en cinco repeticiones por grupo (20 / replica). Se estableció un grupo control (GC) con 4.1% de carbonato de calcio en el alimento basado en los niveles sugeridos para la estirpe (Guía de manejo Bovans-White, 2020) Los grupos experimentales no se les proporcionó el 4.1% de carbonato de calcio en la dieta; se incorporó a los gránulos de FOLA fabricados como se describe en la patente mencionada. Al grupo GF se le adicionaron 8 g de pellet FOLA /

gallina que contenían el 4,1% de carbonato de calcio; el grupo GFc5 recibió 8 g de pellets de FOLA / gallina que también contenían 4.1% de carbonato de calcio más 6 ppm de oleorresina de capsaicina de 500,000 unidades Scoville (VEPinsa SA de CV, Sinaloa, México), y el grupo GFc10 recibió 8 g FOLA-pellets / gallina con 6 ppm de oleorresina de capsaicina de 1.000.000 unidades Scoville (VEPinsa SA de CV, Sinaloa, México). La hora de alimentación (6 am) se consideró hora 0 para todos los grupos.

Se extrajo sangre (1-2 ml) de cinco aves por repetición a las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 24 h los días 1 y 5; en los días 2, 3 y 4, las gallinas se muestrearon solo a las 2, 10 y 18 h. Por lo tanto, cada gallina se muestreó no más de ocho veces durante estos 5 días de prueba. Se tomaron 25 muestras por cada tiempo de muestreo en cada grupo. Las muestras se centrifugaron inmediatamente (5,000 g durante 15 min) y el suero se recuperó para las mediciones de concentración de calcio mediante un analizador químico semiautomático Easy Kem Vet® (Kontrolab, Ciudad de México). Esta técnica analítica se basa en la detección y cuantificación de una reacción altamente específica de calcio con o-cresoltaleína-complexona y 8-hidroxiquinolina a pH 8,2. El complejo se mide a una longitud de onda de 570 nm. Para la estandarización de la técnica analítica se estableció una curva de recuperación de cloruro cálcico agregado (Química Sigma-Aldrich) en agua estéril desmineralizada con una  $r = 0,99$ .

Se utilizó un programa computarizado de eliminación de curvas para ajustar y analizar los patrones de concentración de calcio en función del tiempo para cada grupo (PKAnalyst, MicroMath, Salt Lake City, Utah, 1998, EE. UU.). Los modelos de mejor ajuste ( $r^2 = 0,99$ ) se eligieron después del análisis mediante la suma de cuadrados residual y el criterio de información mínima de Akaike. Hubo varias métricas: calcio sérico durante 24 h (AUC0-24); la concentración máxima de calcio sérico obtenida (C<sub>MAX</sub>); tiempo en el que se alcanza C<sub>MAX</sub> (T<sub>MAX</sub>); y RT (tiempo medio de residencia). Las diferencias estadísticas en las concentraciones séricas de calcio entre los grupos se llevaron a cabo mediante una prueba U de Mann-Whitney. Los valores de probabilidad de estos datos se compararon mediante pruebas de Kruskal-Wallis y Dunnett t-pruebas para muestras

independientes. Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando  $P \leq 0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 14.0 para Windows.

#### **10. FASE V. EFECTO DEL PREPARADO TIPO FOLA MÁS CAPSAICINA SOBRE EL GROSOR DE CASCARÓN Y % DE HUEVO EN FARFARA EN GALLINAS DE SEGUNDO CICLO.**

Se utilizaron 600 gallinas para la evaluación del número de huevos producidos en fárfara se estimó una muestra de 150 gallinas por grupo con tres repeticiones, y se midió el grosor del cascarón (polos medio, superior e inferior) con un vernier digital de precisión con un error de  $\pm 0,01$  mm. La superficie de la cáscara del huevo se determinó mediante la siguiente fórmula:  $\text{área} = 3,9782 W \times 0,7056$  donde W es el peso del huevo (g). El porcentaje de producción de huevos en fárfara de gallinas suplementadas se registró durante los siguientes 6 días. Estos datos se compararon estadísticamente mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y las pruebas t de Dunnett para la independencia. Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando  $P \leq 0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 14.0 para Windows. Véase **Figura 19**



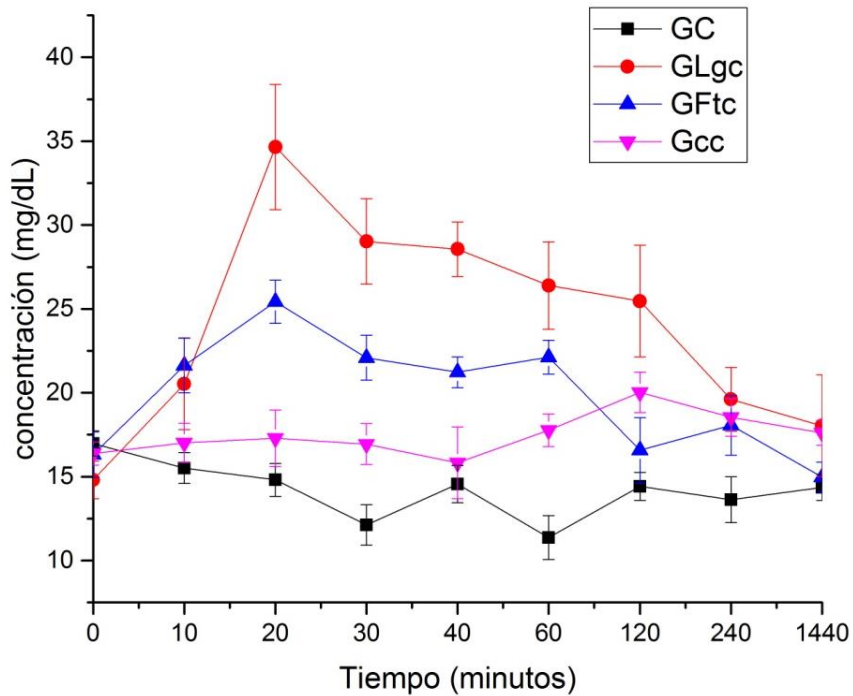
**Figura 19.** Huevos en fárfara vs huevo normal.

## 11. RESULTADOS

### 11.1 FASE I. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE DIVERSAS FUENTES DE CALCIO EN GALLINA DE POSTURA

#### Curva de calcio sérico en aves de postura

En las aves de la fase 1, las concentraciones máximas de calcio en suero ( $C_{MAX}$ ) aumentaron gradualmente desde los 10 min después de la administración de las diferentes fuentes de calcio, en comparación con el grupo control **Ver Cuadro 7** además se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), entre tratamientos, el GLgc demostró tener mayor porcentaje de biodisponibilidad (F%) y el Gcc fue el menos biodisponible. Como se muestra en la **Figura 20**.

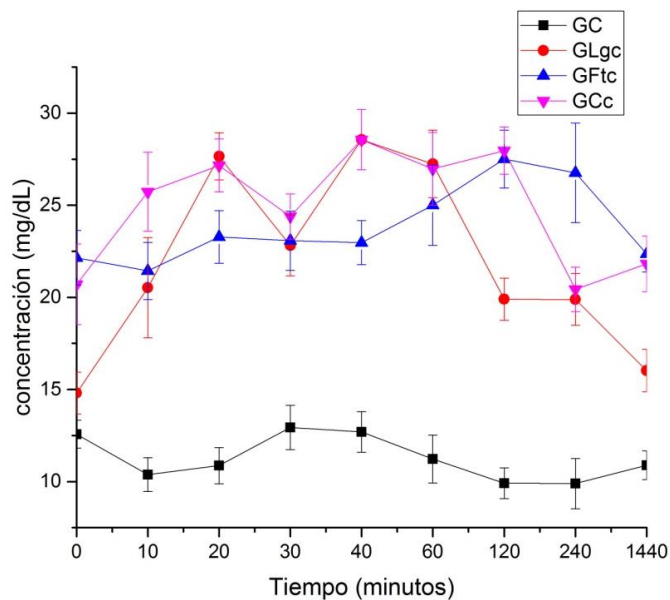


**Figura 20.** Concentraciones de calcio en suero sanguíneo después de administrar 1g de calcio por ave en una sola dosis vía oral, en la Fase I. GC= grupo control, GLgc=grupo lactato gluconato de calcio, GFtc= grupo fosfatotricalcico, Gcc= grupo carbonato de calcio.

**Cuadro 7.** Parámetros cinéticos de tres diferentes fuentes de calcio después de administrar vía oral 1g de calcio por ave en gallinas Bovans White Fase I:  $\text{CaCO}_3$ = carbonato de calcio;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ = Fosfato tricalcico;  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$ = lactato gluconato de calcio, y GC= control;  $\text{H}_2\text{O}$ . Los resultados de ambas fases se llevaron a cabo mediante el análisis de áreas bajo la curva y  $\text{C}_{\text{max}}$ .

Grupo	Sal	Dosis g/ave	Tmax min	Cmax mg/dL	AUC <sub>oral</sub> mg•min/dL
Gcc	$\text{CaCO}_3$	1	120	20.02± 1.2	26144.18± 1.5
GFtc	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1	20	25.43± 0.8	24365.405± 1.3
GLgc	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$	1	20	34.65± 1.6	28456.12± 1.2
GC	$\text{H}_2\text{O}$	0	10	15.51±1.1	20085.49±1.2

Las concentraciones séricas de calcio ( $\text{C}_{\text{MAX}}$ ) obtenidas entre los tratamientos de la fase 2 no presentan diferencia estadísticamente significativa, ( $P > 0.05$ ) entre GLgc con GFtc y Gcc, véase **Cuadro 8** sin embargo estos si mostraron diferencia estadísticamente significativa con el GC, los valores obtenidos se mantuvieron inferiores comparadas con las aves en la fase 1, como se observa en la **Figura 21**.



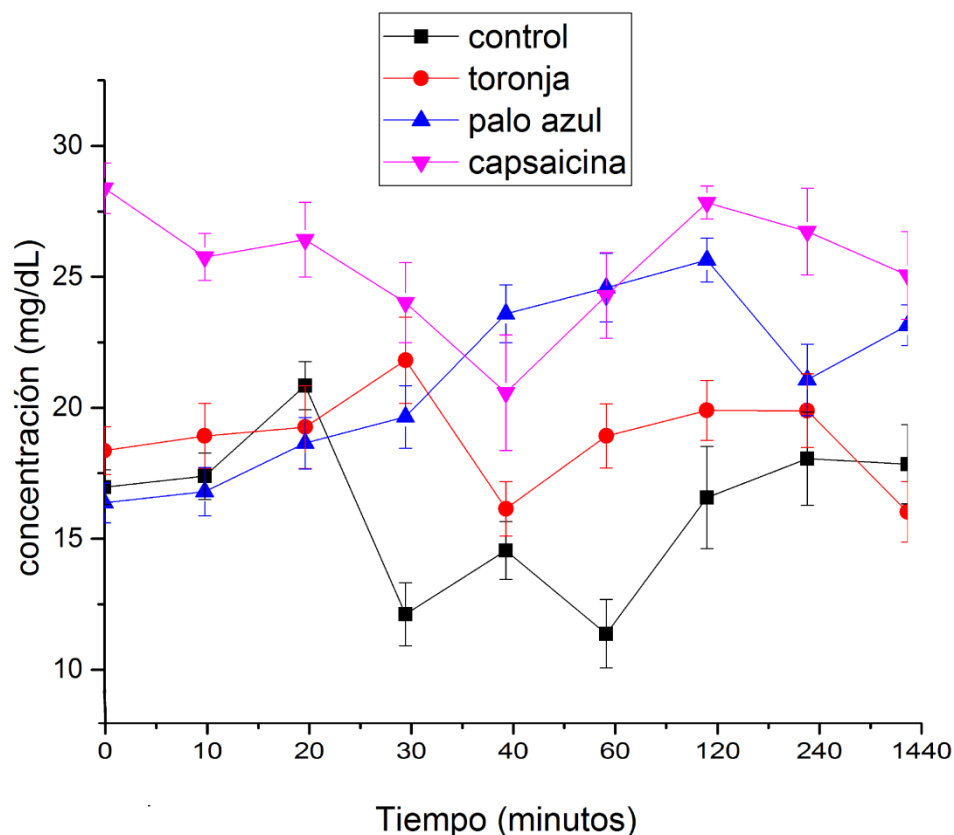
**Figura 21.** Concentraciones de calcio en suero administrando 1g de calcio por ave en una sola dosis por vía oral en aves, alimentadas con dieta modificada, libre de calcio fino y grueso. GC= grupo control, GLgc=grupo lactato gluconato de calcio, GFtc= grupo fosfato tricalcico, Gcc= grupo carbonato de calcio.

**Cuadro 8.** Parámetros cinéticos de tres diferentes fuentes de calcio administrado vía oral en gallinas Bovans White Fase II:  $\text{CaCO}_3$ = carbonato de calcio;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ = Fosfato tricalcico;  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$ = lactato gluconato de calcio, y GC= control. Los resultados de ambas fases se llevaron a cabo mediante el análisis de áreas bajo la curva y  $\text{C}_{\text{max}}$ .

Sal	Dosis g/ave	Tmax min	Cmax mg/dL	AUC <sub>oral</sub> mg•min/dL
$\text{CaCO}_3$	1	40	28.56± 1.2	31477.79± 1.5
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1	120	26.76± 0.8	35683.26± 1.3
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$	1	40	28.56± 1.6	26835.36± 1.2
$\text{H}_2\text{O}$	0	30	14.77±1.1	19789.49±1.2

## 11.2 FASE II. EVALUACIÓN DE DIVERSOS PROMOTORES DE LA ABSORCIÓN DE CALCIO EN GALLINA DE POSTURA

Las aves que fueron dosificadas con el preparado farmacéutico FOLA adicionado con los promotores de la biodisponibilidad mostraron que el extracto oleoso de capsaicina obtuvo una mayor concentración de calcio sérico en comparación con los otros tratamientos, los parámetros cinéticos indican un mayor % de biodisponibilidad relativa como se muestra en el Cuadro 9, Figura 22 y 23. Se observa una diferencia estadísticamente significativa, ( $P > 0.05$ ) entre los grupos evaluados.



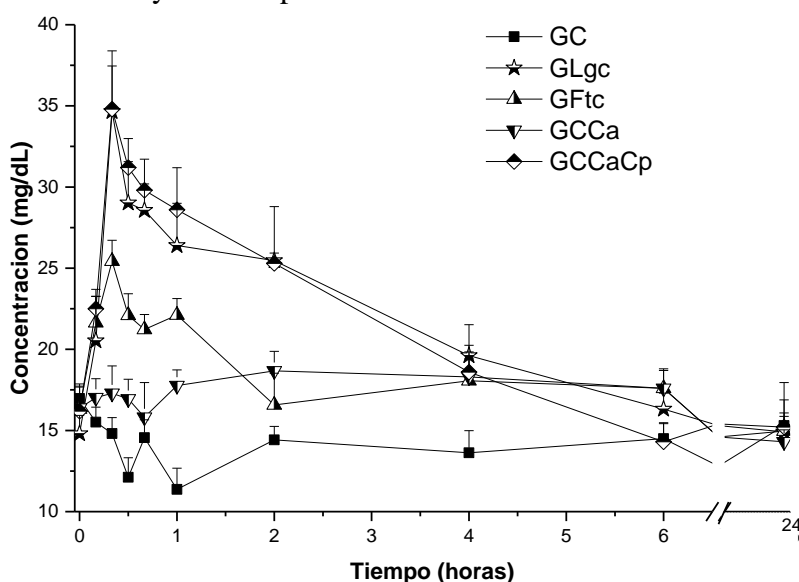
**Figura 22.** Concentraciones séricas de calcio administrando 1g de calcio más un promotor de la biodisponibilidad.

**Cuadro 9.** Parámetros cinéticos de tres diferentes fuentes de calcio administrado vía oral en gallinas Bovans White Fase II: CaCO<sub>3</sub>= carbonato de calcio; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>= Fosfato tricalcico; C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>14</sub>= lactato gluconato de calcio, y GC= control. Los resultados de ambas fases se llevaron a cabo mediante el análisis de áreas bajo la curva y Cmax.

Grupo	T <sub>max</sub> (hora)	C <sub>max</sub> (mg/dL)	AUC <sub>0-24</sub> (mg•min/dL)	F <sub>R</sub> (%) vs GC	F <sub>R</sub> (%) vs GCca
<b>GC</b>	-	-	335.2 ± 8.6 <sup>a</sup>	100	-
<b>GCca</b>	2 ± 0.3 <sup>a</sup>	20.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	371.3 ± 9.3 <sup>b</sup>	110.8	100
<b>GCcaCp</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	34.5 ± 1.8 <sup>b</sup>	406.6 ± 8.4 <sup>c</sup>	121.3	109.5
<b>GFtc</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	25.4 ± 1.4 <sup>c</sup>	380.2 ± 8.8 <sup>d</sup>	113.4	102.4
<b>GLgc</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	34.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	407.1 ± 7.9 <sup>c</sup>	121.4	109.6

<sup>a,b,c,d</sup> Diferentes literales entre columnas significan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05). C<sub>max</sub> = concentración sérica máxima de Ca; T<sub>max</sub> = tiempo para lograr C<sub>max</sub>; AUC<sub>0-24</sub> = área bajo la curva de concentración sérica de Ca vs. Tiempo; biodisponibilidad de Calcio relativa al 100% del grupo control no suplementado con calcio adicional.

En una nueva evaluación se utilizaron a las mismas aves de la fase I adicionando un grupo experimental, con oleorresina de capsicum como promotor de la absorción debido a que en el experimento anterior fue el que mostró mayores concentraciones de calcio sérico. Los resultados de la evaluación demuestran que sigue manteniendo valores superiores en las concentraciones de calcio e incluso por arriba de las mostradas por el Lactato gluconato de calcio, la sal cálcica con mayor biodisponibilidad en la fase I.

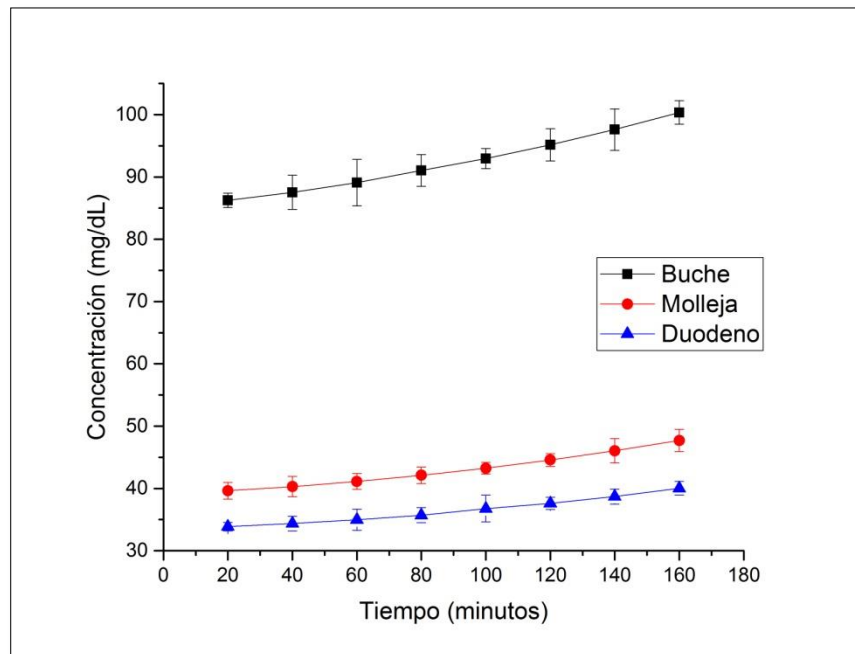


**Figura 23.** Perfiles séricos de calcio logrados con cuatro fuentes de calcio administradas vía oral en sistema FOLA en gallinas Bovans-White durante 24 horas y un grupo control sin suplementación: grupo GCca: carbonato de calcio; grupo GFtc: fosfato tricálcico; grupo 3 GLgc: gluconato-lactato de calcio; grupo GCcaCp carbonato de calcio más 100 µg/mL de oleorresina de capsicum\*. Dosis ajustada a 1 g/calcio/ave.



#### 11.4 EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SEGMENTOS INTESTINALES DE PREPARADOS CON CALCIO PARA DETERMINAR EL MAYOR SITIO DE ABSORCIÓN DE CALCIO

En la evaluación del preparado farmacéutico FOLA en las cámaras de órganos aislados se obtuvo un mayor % de absorción de calcio en el buche comparado con la molleja y el duodeno. Véase **Figura 24**



**Figura 24.** Concentraciones de calcio obtenidas en cámara de órganos aislados de tres diferentes órganos (buche, molleja y duodeno) Administrando 1g de pellet FOLA en cada uno.

## 11.5 EVALUACIÓN POR PREFERENCIA EN EL COLOR MEDIANTE CONSUMO EL EN SISTEMA FOLA

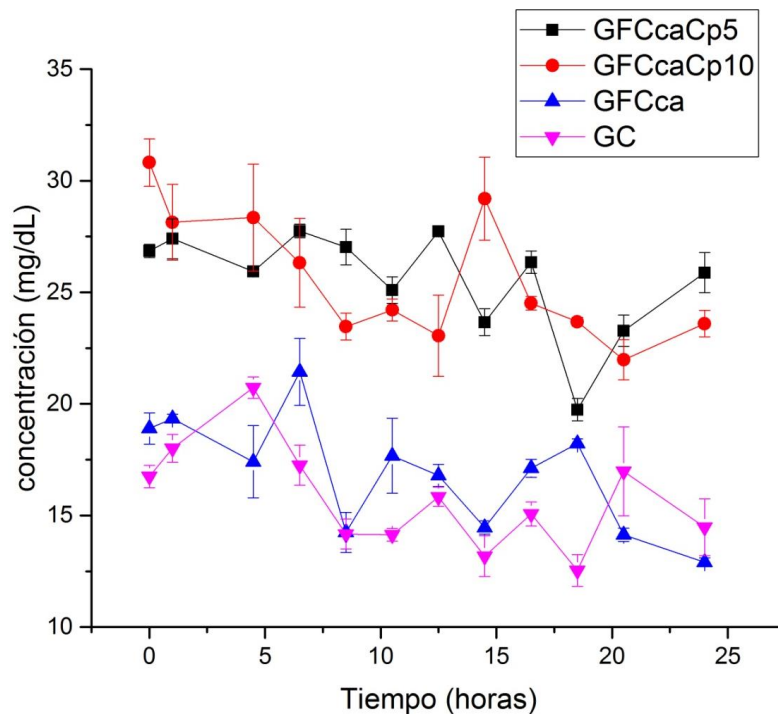
Los resultados en ésta fase demuestran que no existe una inclinación contrastada por algún color en las aves de éste estudio ya que todos los colores los consumieron casi en la misma proporción como se muestra en el **Cuadro 10**.

**Cuadro 10.** Administración de 30g de FOLA sin excipiente en el alimento utilizando cinco colores distintos en las aves

COLOR	Día 1 residuo (g)	Día 2 residuo (g)	Día 3 residuo (g)	Día 4 residuo (g)	Día 5 residuo (g)	% de consumo (g)
<b>ROJO</b>	2	2	0	0	0	86.6
<b>AZUL</b>	1	0	0	0	0	96.6
<b>NARANJA</b>	3	1	0	0	0	86.6
<b>AMARILLO</b>	0	1	0	0	0	96.6
<b>VERDE</b>	1	0	0	0	0	96.6

### 11.6 FASE III. EVALUACION DE LOS PREPARADOS DE CARBONATO DE CALCIO DE LIBERACIÓN MODIFICADA MÁS CAPSAICINA EN DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES COMO PROMOTOR DE LA BIODISPONIBILIDAD EN UNIDADES EXPERIMENTALES UTILIZANDO SISTEMA FOLA EN AVES DE POSTURA DE SEGUNDO CICLO.

Con los resultados de la fase II se demostró que el extracto oleoso de capsaicina fue el que presentó mayor % de absorción de calcio durante la evaluación por lo que se decidió contemplarlo en la fase III, los resultados muestran una mayor absorción cuando se administra la concentración de 1, 000,000 unidades Scolville comparado con los demás tratamientos. Véase **Cuadro 11 y Figura 25**



**Figura 25** Perfiles séricos de calcio obtenidos después de administrar tres diferentes tratamientos más capsicina. GC= Aves sin FOLA en el alimento, GFCca= aves adicionadas con pellet (FOLA) con carbonato de calcio, GFCcaCp5= aves administradas con FOLA en el alimento adicionada con extracto oleoso de capsicina de 500,000 unidades Scolville, GFCcaCp10= aves administradas con FOLA en el alimento adicionada con extracto oleoso de capsicina de 1, 000,000 unidades Scolville.

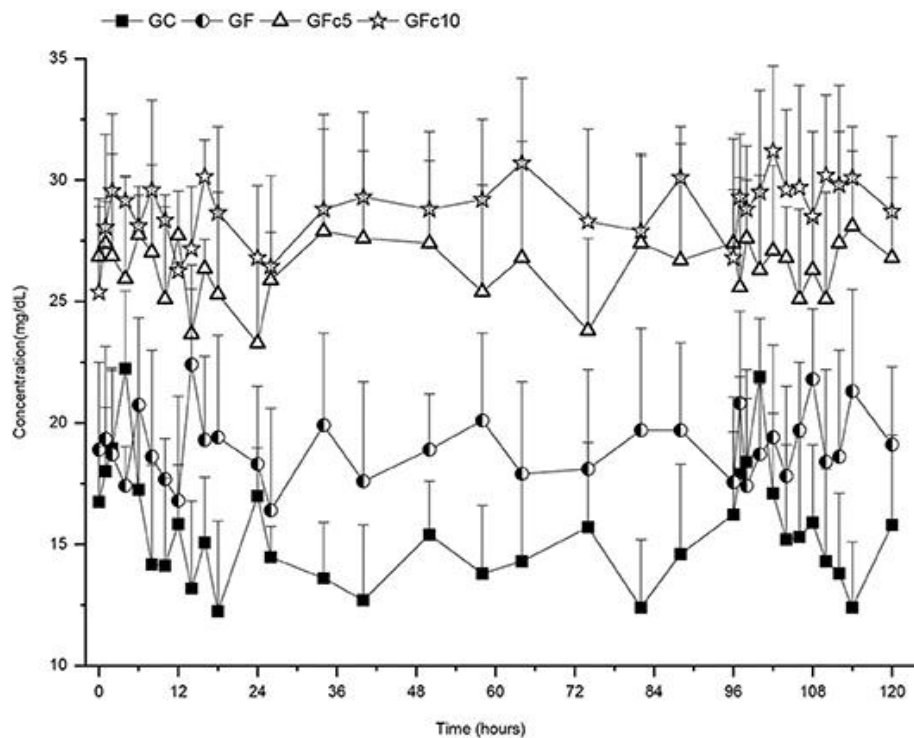
**Cuadro 11.** Variables cinéticas logradas por tres grupos, administrando Fola's vía oral en el alimento en gallinas *Bovans-White* y un grupo control sin FOLA (GC), grupo GFCca: carbonato de calcio; grupo GFCca5: carbonato de calcio + 7ppm de oleoresina de capsicum de 500,000 unidades Scoville; grupo GFCca10: carbonato de calcio + 7ppm de oleoresina de capsicum de 1,000,000 unidades Scoville. Dosis ajustada a 1 g/calcio/ave

Variable	GC	GFCca	GFCca5	GFCca10
<b>Farmacocinetica</b>				
	<b>Prom ± 1SD</b>	<b>Prom ± 1SD</b>	<b>Prom ± 1SD</b>	<b>Prom ± 1SD</b>
<b>T½β (h)</b>	51.7 ± 6.34 <sup>a</sup>	55.6 ± 5.42 <sup>a</sup>	106.8 ± 10.3 <sup>c</sup>	324.8 ± 21.7 <sup>d</sup>
<b>AUC<sub>0-24</sub> (µg /mL·h<sup>-1</sup>)</b>	1373.8 ± 98.4 <sup>d</sup>	1542.4 ± 84.3 <sup>b</sup>	4224.1 ± 112.3 <sup>c</sup>	13311.3 ± 123.7 <sup>d</sup>
<b>AUMC (mg /mL·h<sup>-2</sup>)</b>	102.525 ± 7.6 <sup>a</sup>	123.657 ± 5.2 <sup>b</sup>	650.846 ± 12.3 <sup>c</sup>	6238.025 ± 27.9 <sup>d</sup>
<b>RT (h)</b>	74.6 ± 5.8 <sup>a</sup>	80.2 ± 6.9 <sup>b</sup>	154.1 ± 15.3 <sup>c</sup>	468.6 ± 17.8 <sup>d</sup>
<b>AUC<sub>T</sub></b>	1462.8 ± 97.2 <sup>a</sup>	1433.4 ± 81.3 <sup>b</sup>	4596.9 ± 11.7 <sup>c</sup>	13059.5 ± 23.7 <sup>d</sup>
<b>F<sub>R</sub>%</b>	-	112.27	307.5	968.94

<sup>a,b,c,d</sup> Diferentes literales entre columnas significan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). AUC<sub>0-24</sub> = área bajo la curva de concentración sérica de Ca en 24h; T½β= vida media de eliminación; F<sub>R</sub>%= porcentaje de biodisponibilidad relativa; RT= tiempo de retención.

## 11.8 FASE IV. EVALUACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO SERICO DURANTE CINCO DÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE PREPARADOS TIPO FOLA MÁS CAPSAICINA EN UNA NAVE DE 1000 AVES DE POSTURA DE SEGUNDO CICLO

Se realizó una evaluación durante cinco días consecutivos administrando cada 24 horas el preparado FOLA adicionado con capsaicina con dos concentraciones diferentes (500,000 y 1,000,000 USH) y los resultados demuestran que las concentraciones más altas de iones de calcio séricos fueron por los grupos que contenían el promotor de la biodisponibilidad. Véase **Figura 26**.



**Figura 26** .Las concentraciones séricas de calcio a los cinco días se lograron con cuatro fuentes de calcio administradas por vía oral en gallinas Bovans-White de 85 semanas de edad: grupo control (GC), que recibieron una dieta que contenía niveles basales de 4,1% de carbonato de calcio; grupo GF tratado como GC, pero que incluye la misma dosis de carbonato de calcio en gránulos de FOLA; grupo GFc5 tratado como GF, pero añadiendo 6 ppm de oleoresina de pimiento 500.000

unidades de calor Scoville (SHU), y grupo GFc10 tratado como GFc5 pero con 1.000.000 SHU de oleorresina de pimienta.

### 11.10 FASE V. EVALUACION DEL % DE HUEVO EN FARFARA Y GROSOR DE CASCARÓN EN AVES CON PREPARADOS TIPO FOLA MÁS CAPSAICINA EN UNA NAVE DE 1000 AVES DE SEGUNDO CICLO

Los resultados en esta evaluación muestran que el % de huevo en fáfara disminuyó drásticamente en los grupos adicionados con extracto de oleorresina de capsicum en comparación con los otros grupos. Véase **Cuadro 12**

**Cuadro 12.** Porcentaje de huevos registrados durante 6 días con cuatro fuentes de calcio administradas por vía oral en gallinas Bovans-White de 85 semanas de edad: grupo de control (GC), recibiendo una dieta con niveles basales de 4,1% de carbonato cálcico; grupo GF tratado como GC, pero incluyendo la misma dosis de carbonato de calcio en FOLA pellets; grupo GFc5 tratado como GF, pero agregando 6 ppm de oleorresina de capsicum de 500,000 unidades Scoville (SHU) y el grupo GFc10 tratado como GFc5, pero con 1,000,000 SHU de oleorresina de capsicina.

Day	Eggshell thickness (mm)							
	GC		GF		GFc5		GFc10	
	Mean	±1 SE	Mean	±1 SE	Mean	±1 SE	Mean	±1 SE
0	0.34	0.019	0.35	0.01	0.34	0.017	0.35	0.022
1	0.35	0.012	0.37 <sup>b</sup>	0.012	0.39 <sup>c</sup>	0.013	0.4 <sup>c</sup>	0.015
2	0.34	0.024	0.37 <sup>b</sup>	0.012	0.4 <sup>c</sup>	0.015	0.42 <sup>d</sup>	0.016
3	0.35	0.025	0.39 <sup>b</sup>	0.011	0.41 <sup>c</sup>	0.01	0.45 <sup>d</sup>	0.014
4	0.34	0.017	0.4 <sup>b</sup>	0.013	0.41 <sup>c</sup>	0.012	0.43 <sup>d</sup>	0.011
5	0.34	0.019	0.4 <sup>b</sup>	0.01	0.42 <sup>c</sup>	0.011	0.46 <sup>d</sup>	0.013
6	0.35	0.013	0.41 <sup>b</sup>	0.011	0.43 <sup>c</sup>	0.012	0.46 <sup>d</sup>	0.02
SEM	0.018		0.011		0.012		0.015	

<sup>b,c,d</sup> Different letter in rows indicate statistically significant difference within a day (P < 0.05).

## 12. DISCUSIÓN

La administración de carbonato de calcio en la dieta de las aves es una práctica común, sin embargo el % de biodisponibilidad (F%) que tiene es muy bajo comparado con el de otras sales, en este estudio se administró tres diferentes fuentes de calcio vía oral para determinar sus variables cinéticas en el suero sanguíneo durante la fase 1, las concentraciones determinadas en el suero sanguíneo (C<sub>MAX</sub>) durante la evaluación fueron distintas entre sí; esto puede deberse a la capacidad que tiene cada compuesto para poder difundir y desplazarse por los compartimientos para poder llegar al torrente sanguíneo (Preda *et al.*, 2014) tomando en cuenta que las aves tienen un aporte adecuado de calcio en la dieta, observándose niveles casi tan altos como los reportados (Brugère-Picoux, 2015). Es evidente una concentración más alta para el lactato gluconato de calcio; ya que este compuesto demostró tener mayor biodisponibilidad relativa y un costo más elevado; comparando los resultados obtenidos en la fase 2, el calcio posiblemente se distribuyó inmediatamente a los tejidos y órganos con alguna deficiencia (Keshavarz, 1994). Con todo lo anterior se puede interpretar estos resultados como una oportunidad en el uso de excipientes que mejoren la biodisponibilidad y tiempo de retención del carbonato de calcio a nivel del proventrículo y duodeno para hacer más eficiente su absorción, con la finalidad de prevenir la descalcificación en gallinas altas productoras, llevándolas a padecer patologías como raquitismo y fatiga de jaula (Cabrera y Olivero, 1995), a un menor costo. Es por esta razón que en la segunda parte del experimento, se evaluaron las concentraciones de calcio en suero sanguíneo después de administrar los preparados farmacéuticos (FOLA'S) en el alimento, se observó un incremento significativo en el grupo que se adiciono con oleorresina de capsaicina, compuesto utilizado ampliamente en la industria avícola pero con otros fines como por ejemplo; la administración continua de capsaicina en la dieta aumenta la resistencia a la colonización de *Salmonella enteritidis* y la invasión de órganos en todo el periodo de crecimiento normal sin efectos perjudiciales sobre el crecimiento en pollos de engorde (Gutiérrez *et al.*, 2002 y Huang, 2012) . Así mismo se sabe que la capsaicina ha funcionado como promotor de la biodisponibilidad de algunos fármacos en aves (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Las inclusiones de la oleorresina de cápsicum en aves ha llegado a ser hasta de 200 ppm sin llegar a afectar a los animales, independientemente la función que tenga al ser adicionado a la dieta de las aves existen una gran variedad de teorías que tratan de explicar el mecanismo mediante el cual favorece la absorción de algunos compuestos, se sabe que su receptor VR1 (receptor vanilloide) favorece el ingreso celular de iones divalentes y monovalentes a nivel de epitelio intestinal, así mismo se ha encontrado un mecanismo en el cual actúa directamente en receptores del dolor iniciando una proceso de contracción a nivel de uniones intracelulares aumentándola permeabilidad intestinal. (Huang, 2012). Otra posible explicación sería que las moléculas de capsaicina activan la secreción de la sustancia P desde las terminales nerviosas cercanas, por lo que las moléculas se insertan en la doble capa lipídica de las membranas celulares modificando la permeabilidad selectiva de los canales iónicos (O'Connor *et al.*, 2004). Finalmente se habla de un bloqueo de las bombas de expulsión mediadas por la glicoproteína P a nivel de la membrana de las células epiteliales intestinales (Gutiérrez *et al.*, 2017), lo que explicaría el proceso de fijación de calcio en la formación de huevo que principalmente es nocturno, y la ingestión de la FOLA más capsaicina en el grupo experimental mantiene concentraciones de calcio superiores a los otros tratamientos durante las 24 horas de evaluación.



### 13. CONCLUSIÓN

La biodisponibilidad de la fuente de calcio está relacionada directamente con la calidad de este mineral en la alimentación de las gallinas de postura, el carbonato de calcio fuente ampliamente utilizada tiene una menor biodisponibilidad en comparación con el fosfato tricalcico y el lactato gluconato de calcio; siendo este último el más biodisponible, ya que las concentraciones séricas son muy cercanas a los valores más altos registrados en la literatura (Brugère-Picoux, 2015).

Con este estudio se puede demostrar que el calcio añadido en la dieta mantiene un equilibrio de calcio sérico adecuado en las aves y al quitarlo de la dieta y añadirlo directamente en el proventrículo no se observarán diferencias entre grupos, debido a una alta tasa de distribución del calcio, requerido para satisfacer las diferentes necesidades fisiológicas que el ave requiere a lo largo del día; por lo que se hace necesario el administrar carbonato de calcio en una forma farmacéutica que contenga un promotor de la biodisponibilidad capaz de aumentar el % de biodisponibilidad a concentraciones parecidas al de una sal más costosa como es el caso del lactato gluconato de calcio o el fosfato tricalcico pero a un menor costo.

Los preparados FOLA con oleorresina de cápsicum son una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de calcio en gallinas mayores de 60 semanas de producción, ya que pueden corregir por completo en unos pocos días los requerimientos de calcio para la producción de huevos en las gallinas se pueden si el calcio se suplementa en forma de pio que contiene FOLA (particularmente 1, 000,000 de unidades Scoville). Se necesitan pruebas comerciales a gran escala en gallinas de segundo ciclo, incluido el análisis completo de la calidad del huevo (los huevos de baja calidad pueden representar hasta el 50% de la producción).

## 14. BIBLIOGRAFÍA

Ahmadi, F., & Rahimi, F.(2011). Factors Affecting Quality and Quantity of Egg Production in Laying Hens: A Review. *World Applied Sciences Journal*. 12(3):372-384.

Akbari Moghaddam Kakhki, R., Heuthorst, T., Mills, A., Neijat, M.,and Kiarie, E. (2019). Interactive effects of calcium and top-dressed 25-hydroxy vitamin D3 on egg production, egg shell quality, and bones attributes in aged Lohmann LSL-lite layers. *Poultry Science*, 98(3):1254-1262.

Al-Batshan HA, Scheideler SE, Black BL, Garlich JD, Anderson KE. (1994). Duodenal calcium uptake, femur ash and eggshell quality decline with age and increase following molt. *Poultry Science*. (73):1590-1596.

Alcalá, Y., Rivero, F., Sumano, H. and Gutiérrez, L. (2015). Acaricidal Action of Water Extracts from *Eysenhardtia polystachya* Against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Parasitology Comparative* 82(1) 123-128.

Álvarez Orellana, L. D. (2020). Evaluación de calidad de huevo comercial en gallinas Dekalb post muda forzada suplementadas con cuatro niveles de calcio en forma de talco y granulado (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

Argueta V. A. Cano A. L. Rodarte M. E (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2:1103-1103.

Arias, J.J. & Fernandez M.S. (2001). Biomimetic processes through the study of mineralized Shell. *Worl's Poultry Science Journal*. 57:349-357.

Arias, J.J. & Fernandez M.S. (2008). Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization. *Chemical Reviews*. 108:4475-4482.

Aulton, M.E. (2004). Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmaceuticas. No. RS420 P48 2004.

Barrion A, Hurtada W, Papa, I, Zulayvar T, Yee M. (2014). Phytochemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of Pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr. against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Food Nutrition Science*. doi:10.4236/fns.2014.59085.

Bronner, F. (1987). Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *The Journal of nutrition*, 117(8): 1347-1352.

Berry, W. D. (2003). La fisiología de la muda inducida. *Ciencia avícola*, 82 (6):971-980.

Brugère P.J., J.P. Vaillancourt, M. Bouzouaia, H.L. Shivaprasad, and D. Venne. (2015). *Manual of Poultry Diseases*. AFAS. México D.F.61.

Berto(2007). Alternative calcium source effects on commercial egg production and quality. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 9: 105-109.

Buitrago D, Morales N, Méndez G, Araujo L, Sosa M. (2011). Determinación de la actividad antiviral de los polifenoles presentes en el grapefruit (*Citrus paradisi* M) contra bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Ciencia; Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences*, at the Universidad de Zulia. [Online]; 10(4). Available from:<http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/ciencia/article/viewFile/9129/9118> [Accessed 14 October 2016].

Cabrera, M. C., & Olivero, R. (1995). Efecto de un aporte de 25-(OH) D3 y fuente cálcica separada sobre el raquitismo de origen carencial en ponedoras (No. 51). Universidad de la República, Facultad de Agronomía

Cardona, H.J.C. (1999). Ritmos circadianos en el metabolismo del calcio en aves de postura. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 52(2): 643-656.

Carrillo, L., Bernad, MJ, López-Coello, C, Monroy-Barreto, M., Sumano, H. & Gutiérrez, L. (2020). Mayor biodisponibilidad de calcio en pollos con una nueva formulación farmacéutica en el pienso. *Frontiers in Veterinary Science*, 7: 343. doi: 10.3389/fvets.2020.00343

Carrillo L. (2013). Efecto de los extractos de *Eysenhardtia polystachya* (Palo azul) como promotor de crecimiento en pollo de engorda. [página de internet]. Disponible en: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/efecto-de-los-extractos-de-eysenhardtia-polystachya-palo-azul-como-promotor-de-crecimiento-en-pollo-de-engorda>

Caterina, M., Schumacher, M., Tominaga, M., Rosen, T., Le-vine, J., Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389: 816-824.

Chien Y.C, Hincke M.T., Vali H. & Mckee M.D. (2009). Ultrastructure of avian eggshell during resorption following egg fertilization. *Journal Structural Biology*. 168:527-538.

Clunies, M., D. Parks, & Leeson, S. (1992). Calcium and phosphorus metabolism and eggshell formation of hens fed different amounts of calcium. *Poultry science*, 71: 482-489.

Cook, M. E. (2017). Sturkie's Avian Physiology. *Journal of Wildlife Diseases*. 53: 703-705.

Cruz-Fernández M. Variedades de toronja para suelos arcillosos limosos de la Huasteca Potosina.México.(2007).10:22.Disponibleen:http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/737/176.pdf?sequence=1.

Dacke C. G. (2000). The parathyroids, calcitonin, and vitamin D. *Sturkie's avian physiology*. 1(1): 473-488.

Dahiya, R., R. Berwal, S. Sihag, and C. Patil. (2016). The effect of dietary supplementation of salts of organic acid on production performance of laying hens. *Veterinary World*. 9: 1478.

De Ketelaere, B., Bamelis, F., Kemps, B., Decuypere, E. y De Baerdemaeker, J. (2004). Mediciones no destructivas de la calidad del huevo. 1. *World's Poultry Science Journal*. 60: (3): 289-302, DOI: 10.1079 / WPS200417.

De la Rosa-Hernández, M., Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D. B., Carrillo-Inungaray, M. L., & Sánchez-González, J. M. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 47(2): 22-35.

De Matos, R. (2008). Calcium metabolism in birds. *Veterinary clinics of North America: exotic animal practice*, 11: 59-82.

Dunn, M.A., Too, S.L. & Ishizaki, A.S. (1995). Caracterización de una nueva proteína en el intestino del pollo que exhibe actividad de unión al calcio y regulación por el calcio, el aluminio y la vitamina D en la dieta. *The Journal of Nutrition*. 125(12): 2916-2924.

Elaroussi, M. A., L. R. Forte, S.L. Eber, and H. V. Biellier. (1994). Calcium homeostasis in the laying hen. 1. Age and dietary calcium effects. *Poultry Science*. 73:1581-1589.

Escorcía, M. y Moreno, C. A. (2016). El cascarón de huevo. Breve descripción de su formación. FMVZ. UNAM. 1 era Ed.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2018). Available online at: <http://faostat.fao.org/> (accessed December 2019).

Fassani, J.F, A.G. Bertechini, R.K. Kato e A. Geraldo. (2004). Composição e solubilidade in vitro de calcários calcínicos de Minas Gerais. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras. 28: 913-918.

Fernández, J. (1995). Calcium and phosphorus metabolism in growing pigs. II. Simultaneous radio-calcium and radio-phosphorus kinetics. *Livestock Production Science*. 41(3): 243-254.

Guide, Bovans White. (2020). de "Commercial management guide."

Fernández, M.S. & Arias, J.L. (2000). La cáscara del huevo: un modelo de biomineralización. *Monografías de medicina veterinaria*. 20(2).

Frost, T. J., and D.A. Roland. (1991). The influence of various calcium and phosphorus levels on tibia strength and eggshell quality of pullets during peak production. *Poultry Science*. 70:963-969.

González, N.V & Barbeito, C. G. (2014). Histología de las aves. D-Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Serie Libros de Catedra.

Gutierrez, O. L., Sumano, L. H., & Zamora, Q. M. (2002). Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve higher maximal serum concentrations. *Veterinary Record*. 150:350-353.

Gutierrez, L. Sumano, H., Rivero, F., & Alcalá-Canto, Y. (2015). Ixodicide activity of *Eysenhardtia polystachya* against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Animal Science*.93:1–7. doi:10.2527/jas2014-8679.

Gutiérrez, L., Zermeño, J., Alcalá, Y., & Sumano, H. (2017). Higher bioavailability of doxycycline in broiler chickens with a novel in-feed pharmaceutical formulation. *Poultry science*. 96(8): 2662-2669.

Gutierrez, L., Alcalá, Y., Bernad, M. J., & Sumano, H. (2018). Increased bioavailability of tylosin phosphate as in-feed medication formulated for long-action pellets in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 27(1):16-22.

Hafeez A, Mader A, Ruhnke I, Röhe I, Goodarzi Boroojeni F, Yousaf MS. (2015) Implication of milling methods, thermal treatment, and particle size of feed in layers on mineral digestibility and retention of minerals in egg contents. *Poult Sci* 94:240(8). doi: 10.3382/ps/peu070

Hamilton, R. M. G., K. G. Hollands, P. W. Voisey and A. A. Grunder. (1979). Relationship between egg shell quality and shell breakage and factors that affect shell breakage in the field- a review. *Worl's Poultry Science Journal*. 35 (3): 177 – 190.

Hamilton, R.M.G., and B. K. Thompson. (1980). Effects of sodium plus potassium to chloride ratio in practical-type diets on blood gas levels in three strains of White Leghorn hens and the relationship between acid-base balance and egg shell strength. *Poultry Science*. 59:1294-1303.

Hamilton, R.M.G., and B. K. Thompson. (1981). The effects of storage duration on nondestructive deformation, quasi-static compression strength, impact fracture strength, and specific gravity of eggs from White Leghorn hens. *Poultry Science*. 60:517-522.

Hamilton, R.M.G., and J. D. Ciperá. (1981). Effects of dietary calcium levels during the brooding, rearing, and early laying period on feed intake, egg production, and shell quality of White Leghorn hens. *Poultry Science*. 60:349-357.

Hamdi M, Solà-Oriol D, Davin R, Pérez JF. (2015). Calcium sources and their interaction with the different levels of non-phytate phosphorus affect performance and bone mineralization in broiler chickens. *Poultry Science* 94:2136–43. doi: 10.3382/ps/peu061

Hamilton, R. M. G., (1982). Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. *Poultry Science*. 61: 2022-2039.

Hernández-Sánchez, J., Cuca-García, M., Pró-Martínez, A., González-Alcorta, M., & Becerril-Pérez, C. (2006). Nivel óptimo biológico y económico de calcio en gallinas Leghorn blancas de segundo ciclo de postura. *Agrociencia*. 40(1): 49-57.

Henzler, D. J., Ebel, E., Sanders, J., Kradel, D., & Mason, J. (1994). Salmonella enteritidis in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks. *Avian diseases*. 37- 43.

Herrera, J., B. Saldaña, L. Cámara, J. D. Berrocoso and G. G. Mateos. (2018). Influence of grinding size of the main cereal of the diet on egg production and eggs quality of brown egg laying hens from 33 to 65 weeks of age. *Poultry Science*. 97:2506–2515.

Huang Xiao-miao. (2012). Estudio sobre actividades antimicrobianas de extractos etnóicos de frutos de Capsicum. *Revista de Ciencias Agrícolas de Anhui*. 32:9.

Ketelaere, BD, Govaerts, T., Coucke, P., Dewil, E., Visscher, J., Decuypere, E. y Baerdemaeker, JD. (2002). Medición de la fuerza del cascarón de 6 cepas genéticas diferentes de gallinas ponedoras: técnicas y comparaciones. *Ciencia avícola británica* , 43 (2): 238-244.

Keshavarz, K. (1994). Laying hens respond differently to high dietary levels of phosphorus in monobasic and dibasic calcium phosphate. *Poultry science*. 73(5): 687-703.

Lichovnikova M. (2007). The effect of dietary calcium source, concentration and particle size on calcium retention, eggshell quality and overall calcium requirement in laying hens. *British Poultry Science*. 48:71–5. doi: 10.1080/00071660601148203

Li, H., Jin, L., Wu, F., Thacker, P., Li, X., You, J. y Xu, Y. (2012). Efecto del polvo de pimienta roja (*Capsicum frutescens*) o pigmento de pimienta roja sobre el rendimiento y el color de la yema de huevo de gallinas ponedoras. *Revista asiático-australiana de ciencias animales* .25 (11): 1605.

Li, X. L., W. He, M. Yang, Y. Yan, Y. Xue and S. Zhao. (2017). Effect of dietary supplementation of *Ligustrum lucidum* on performance, egg quality and blood biochemical parameters of Hy-Line Brown hens during the late laying period. *Animal*. 11:1899-1904.

Martínez, M. (1991). Las Plantas Medicinales de México. Sexta Ed.:469-470.

Mutucumarana, R. K., Ravindran, V., Ravindran, G., & Cowieson, A.J. (2014). Influence of dietary calcium concentration on the digestion of nutrients along the intestinal tract of broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*. 51(4): 392-401.

Nijveldt RJ, Nood EN, Van Hoorn D, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am Journal Clinical Nutrition*. 74(4):418-25.

NOM-062-ZOO-1999 Mexican Official Standard. Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals. United Mexican States Department of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food (1999). Available online at: [www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO)

NOM-127-SSA1-1994. Mexicana Official Standard. Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica. (1994).



- Norman, A.W., & Hurwitz, S. (1993). The role of the vitamin D endocrine system in avian bone biology. *The Journal of nutrition*, 123 (suppl\_2): 310-316.
- Novak, C. S., & Scheideler. E. (2001). Long-term effects of feeding flaxseed-based diets. 1. Egg production parameters, components, and eggshell quality in two strains of laying hens. *Poultry science*. 80:1480-1489.
- Nys, Y., Gautron, J., García-Ruiz, J.M. & Hincke, M.T. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*. 3(6-7): 549-562.
- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. (2004) .The role of substance P in inflammatory disease. *Journal Cell Physiology*. 201:167–80. doi: 10.1002/jcp.20061
- Ortega S. (1892). *Eysenhardtia polystachya*. Publicado en: The Silva of North America 3:29.1892.[página de internet]. Disponible en:  
[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/28-legum18m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/28-legum18m.pdf)
- Ortuño A, Báidez P, Gómez M, Arcas C, Porrás I, García-Lidón A, Del Río JA. (2006). Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defense mechanism against Penicillium digitatum. *Food Chemical*. 98(2). doi 10.1016/j.foodchem.2005.06.017.
- Pelícia, K., E. A. Garcia, M. R. Scherer, C. Móri, J. A. Dalanezi, A. B. Faitarone and D. A. Berto (2007). Alternative calcium source effects on commercial egg production and quality. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 9: 105-109.
- Preda, C., Budica, C., & Dojana, N. (2014). Effect of various levels of dietary calcium on blood calcium concentration and hormonal status in white Cornish and White leghorn hens. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Veterinary Medicine*. 71(1):182-186.

Purgstaller, B., K. E Goetschl, V. Mavromatis, and M. Dietzel. (2019). Solubility investigations in the amorphous calcium magnesium carbonate system. *Crystengcomm*. 21:155-164.

Quintana, J. A. (1999). Avitecnia: Manejo de las aves domesticas más comunes. Ed. Trillas. 55(12):20-22.

Quintana López, J. A. (2008). Fatiga de jaula, prevención y control. *Industria avícola*, 55(12):20-22.

Ramírez, M. M. T. (2019). Efecto de tres tratamientos de fotoperiodo sobre la fisiología de la gallina ponedora y la calidad del huevo. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1498>

Rennie, J. S., R. H. Fleming, H. A. McCormack, C. C. McCorquodale, and C. C. Whitehead. (1997). Studies on effects of nutritional factors on bone structure and osteoporosis in laying hens. *British Poultry Science*. 38:417-424.

Reyes-Escogido, M., González-Mondragón, E., Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*. 16:1253-1270.

Rodríguez JHV & Bravo GAH. (2019). El Efecto de diferentes niveles de suministro de carbonato de calcio sobre el peso y grosor de la cascara del huevo. *Rev Colomb Cienc Anim Recia*. 11:719. doi: 10.24188/recia.v11.n2.2019.719

Rojas P, Perea A, Ortíz C. (2007). Determinación por HPLC de flavanonas en jugos cítricos de variedades cultivadas en Santander. *Scientia Et Technica* 13(33). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903380>.

Rostagno, H., Albino, L., Donzele, J., Gomes, P., Oliveira, R., Lopes, D., Ferreira, A. y Barreto, S. (2005). Tablas brasileñas para aves y cerdos. Composición de alimentos y requerimientos nutricionales. Trad. Por William Narváez y Luis Páez. 2 ed. Brasil. 186.

Scoville, WL (1912). Nota sobre los pimientos. *Revista de la Asociación Farmacéutica Estadounidense*. 1 (5):453-454.

Soares, J. H. Jr. (1984). Calcium metabolism and its control-a review. *Poultry Science*. 63:2075-2083.

Sumano López, H.S., Ocampo Camberos, L., & Gutierrez L. (2015). *Farmacología Veterinaria*. 4ta edición

Taylor, T. G. & Dacke, C. G. (1984). Calcium metabolism and its regulation. Em: Freeman BM (ed) *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. London, UK, Academic Press. (5): 125-170.

Tona, K., Bamelis, F., De Ketelaere, KB, Bruggeman, V. y Decuypere, E. (2002). Efecto de la muda inducida sobre la calidad de la albúmina, la incubabilidad y el peso corporal de los pollos de las reproductoras de pollos de engorde. *Ciencias avícolas*. 81 (3): 327-332.

UNA. Unión Nacional de Avicultores. (2017–18). Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola. Mexico. Available online at: <https://una.org.mx/compendio-de-indicadores-economicos-2018/> (accessed January 2020).

Ueda Y, Taira Z. (2013). Effect of anions or foods on absolute bioavailability of calcium from calcium salts in mice by pharmacokinetics. *Journal of experimental pharmacology*. 5:65.

Verduzco, G. G., Coello, C.L., Bernal, C.M., & González, E. A. (2010). El sistema inmune digestivo en las aves. *Investigación y ciencia*. 18(48):9-16.

Villanueva-Sanchez, O., Carrillo –Dominguez, S., Chavira –Ramirez,R.,Martínez-Marcial,M.,Miranda –de-la-Lama,G.,& Ávila-González,E. (2020). Evaluación del bienestar animal de gallinas ponedoras Bovans White alojadas en piso. *Abanico Veterinario*. 10(1).

Villa-Londoño JA. (1996). Cítricos. 1st ed. Colombia: Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

Washburn W.(1982). Incidence, Cause, and Prevention of Egg Shell Breakage in Commercial Production K. Department of Poultry Science, University of Georgia, Athens, Georgia 30602 (Received for publication January 11, 1982) *Poultry Science* 61:2005-2012.

Wasserman, R.H. & Fullmer, C.S. (1995). Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *The Journal of nutrition*, 125(suppl\_7): 1971S-1979S.

Wideman Jr. R.F (1987). Regulación renal del metabolismo aviar del calcio y fósforo. *The Journal of Nutrition*. 117(4): 808-815.

Windhorst, H.W. (2008). A projection of the regional development of egg production until 2015. *World's Poultry Science Journal*, 64(3):356-376

Wistedt A, Ridderstråle, Wall H, Holm L. (2019). Age-related changes in the shell gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen hybrids. *Acta Veterinaria Escandinavia*. 61:1–14. doi: 10.1186/s13028-019-0449-1

Yenice E.,C. Mızrak, M. Gültekin, Z. Atik, and M. Tunca. (2015). Effects of organic and inorganic forms of manganese, zinc, copper, and chromium on bioavailability of these minerals and calcium in late-phase laying hens. *Biol. Trace Elem. Res.* 1

## **15. ARTICULOS PUBLICADOS**



# Higher Bioavailability of Calcium in Chickens With a Novel In-Feed Pharmaceutical Formulation

Lizbeth Carrillo<sup>1</sup>, María-José Bernad<sup>2</sup>, Minerva Monroy-Barreto<sup>3</sup>, Carlos L. Coello<sup>4</sup>, Héctor Sumano<sup>1</sup> and Lilia Gutiérrez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, <sup>2</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, <sup>3</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, <sup>4</sup> Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Deirdre P. Champion,  
University College Dublin, Ireland

### Reviewed by:

Mohamed E. Abd El-Hack,  
Zagazig University, Egypt  
Nemat Ziaei,  
University of Jiroft, Iran

### \*Correspondence:

Lilia Gutiérrez  
liliago@unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Veterinary Pharmacology and  
Toxicology,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

**Received:** 02 April 2020

**Accepted:** 18 May 2020

**Published:** 17 June 2020

### Citation:

Carrillo L, Bernad M-J,  
Monroy-Barreto M, Coello CL,  
Sumano H and Gutiérrez L (2020)  
Higher Bioavailability of Calcium in  
Chickens With a Novel In-Feed  
Pharmaceutical Formulation.  
Front. Vet. Sci. 7:343.  
doi: 10.3389/fvets.2020.00343

Egg production and egg shell quality decrease toward the end of the first laying cycle in hens (approximately by week 80). Even so, farmers often choose to work a second cycle with them. Defective egg shell production has been mainly linked to a decrease in gastrointestinal absorption of calcium. Here we studied pharmaceutically-designed modified-release small pellets (FOLAs) containing calcium to improve calcium bioavailability (F). The influence of FOLA alone or with capsicum-oleoresin was studied in a total of 400 Bovans-White hens randomly divided into four groups of 20 laying hens each and with five replicates per group ( $n = 100$ ) as follows: (1) control group (GC) receiving a diet containing basal levels of 4.1% of calcium-carbonate; (2) group GF treated as GC but with the same dose of calcium-carbonate in FOLA; (3) group GFc5 was treated as GF but with 6 ppm of capsicum-oleoresin (500,000 Scoville Heat Units [SHU]); and (4) group GFc10 treated as GFc5 but with 1,000,000 SHU capsicum-oleoresin. Plasma concentrations of calcium were determined during 5 days at predetermined times sampling more often on days 1 and 5 for blood plasma kinetics of calcium. Relative bioavailability (Fr) values based on the area under the serum calcium concentration vs. time curve (AUC) were obtained and compared to GC. The AUC was statistically different among all groups ( $P < 0.5$ ), but the GFc10 had the greatest Fr (194%), with serum calcium concentrations ranging from 25.37 to 31.2  $\mu\text{g/dL}$ . Calcium residence time (RT) between GC and GF showed no statistical differences while GFc5 and GFc10 had statistically superior RT values. Simultaneously, the number of shell-less eggs per group and their thickness was evaluated by utilizing the same groups but with 150 hens per group on 6 days. Shell-less eggs decreased to zero in Group GFc10 and produced eggs with the greatest shell thickness from day 2 onwards. The inclusion of calcium-carbonate in the pharmaceutical form FOLA induced higher serum calcium concentrations (GF, GFc5, and GFc10) particularly during the night-phase of the hen's cycle—this coincides with the time at which egg shell formation occurs.

**Keywords:** calcium, capsicum, laying hen, relative bioavailability, metabolically-incompetent chicken

## INTRODUCTION

The global production of chicken eggs is constantly increasing, e.g., 37.4 million tons of chicken-eggs were produced in 1990, and 80 million tons in 2018. The WHO has estimated that production will have to increase four-fold to meet the global demand for chicken eggs in the next two decades (1, 2). Hence, the poultry industry must be increasingly efficient despite being one of the most efficient and technologically advanced animal production activities (3). Mexico is the first egg consumer in the world with a per-capita intake of 23 kg/year, and a national egg production in 2018 that reached 2,806,000 tons, i.e., the fourth largest egg producer globally (2). Within the national poultry production, ~45% of laying hen flocks are carried to a second production cycle; in other countries, this percentage may be higher than 70% (2). The rationale for avoiding hen replacement is mainly based on costs. While the decrease in production is mainly related to defective egg shell quality, it has been determined that maintaining a second posture cycle is more profitable than replacing the whole flock of laying hens (2, 3).

One of the most important parameters in egg production is egg shell quality. This structure is mainly made of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ), and there are hardly any egg shell flaws during the first ~35 weeks of age in most laying-hen lines. Thereafter, there is a gradual egg-production drop with decreasing thickness of the shell. This problem has been linked to a decrease in intestinal absorption of calcium of up to 50% on week 40 vs. the initial weeks of egg-production. Hens become genetically impaired to mobilize sufficient calcium when approaching 40 weeks of age—this contributes to defective egg shell formation. The metabolic demand for calcium can lead to osteoporosis when chickens are 38 weeks or older (4, 5).

Most commercial lines of laying hens exhibit a feed consumption rate of ~100 g/hen/day. Their feed is supplemented with 4% total calcium, i.e., 4 g of calcium per day. Considering some variations due to feed handling practices on the farms, most of their food is ingested during the first hours after dawn, and a smaller amount may be eaten during the rest of the day. Of the 4 g of calcium consumed by one hen, ~0.5 g is lost in the feces, about 0.4 g will be excreted in the urine, and 0.1 g will be stored as bone matrix. That leaves ~3 g of Ca available for egg formation: 2 g are deposited as egg shell and the rest is incorporated in the yolk and albumin. During the egg shell calcification process, blood flow through the shell forming-gland in the oviduct increases up to five times (mainly a nocturnal process) (6). Understandably, the calcium requirement of laying hens is 4–6 times greater than that of a non-laying one. The egg is transported into the egg shell forming region in the oviducts. During the last 15 h of egg shell-formation, calcium is incorporated at 100–150 mg/h. Blood calcium ranges from 20 to 30 mg/dL, and 30–40% is from the bone (6, 7).

The intestinal absorption of calcium in the diet is ~40% when the eggshell gland is inactive but reaches 72% when active. This increment mostly occurs at night. Hence, it is important to have higher levels of calcium in the GI tract at this time for proper absorption thus sparing calcium reabsorption from the bones. To promote this, calcium carbonate is usually increased in the

diet of hens from week 38 onwards and is usually administered as mixed form with 70% as coarse calcium carbonate (2–4 mm) and 30% as a powder (8, 9). This combination can help calcium be available along the GI tract for longer times. Additionally, the rapid transit time of the GI tract in hens limits the bioavailability (F) of calcium (10) to ~4–5 h per day (11)—this also contributes to the high variability of absorption patterns (12).

Based on these issues, various modified-release feed preparations have been designed to increase the bioavailability of drugs and nutrients (Patent No.MX/a/2012/01,3222 and PCT/MX2013/000137; National Autonomous University of Mexico), and they are collectively referred to as FOLA (F = bioavailability; O = optimum; L = long; A = action) (13, 14). They are small calcium-containing pellets and designed to remain in the GI tract for a longer time to enhance nighttime release of calcium and consequently F. In addition, capsi-cum-oleoresin can be added to FOLAs to increase the F. Capsicum-oleoresin increases in a concentration-dependant manner, and the amount of divalent and monovalent ions entering the cells containing the VRI receptor (vanilloid receptor) in intestinal epithelial cells, and there is evidence that the oral administration of capsi-cum-oleoresin promotes the F of some drugs such as enrofloxacin in poultry (15) and fexofenadine in rats (16). Consequently, we assessed the comparative bioavailability (Fr) of calcium as free calcium-carbonate and as FOLA-pellets with or without capsi-cum-oleoresin. It can also quantify the percent of shell-free eggs in hens already exhibiting this problem.

## MATERIALS AND METHODS

The study design and animal handling complied with Mexican regulations and ethical standards for the use of experimental animals as laid out by the Universidad National Autonomy de Mexico (UNAM) through the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals, and Mexican prescripts in NOM-062-ZOO-1999. It complies with the biosecurity standards of the Poultry Production Research, Extension, and Teaching Center of the Veterinary College (UNAM) (17, 18).

A total of 1,000 85-week-old Bovans-White hens were included. Hens were already into a 10-day forced molt, and had an average weight of  $1,520 \pm 28$  g. Laying hens were allocated in California-type cages, 40 cm wide, 45 cm deep, and 45 cm high for a surface area of 600 cm<sup>2</sup>/hen. They were adapted to an 8–16 h dark/light cycle, had free access to water using cup drinkers at a rate of 3 hens/cup, and their feed was supplied utilizing channel feeders (13.3 cm/hen) following established standards. To avoid extreme/artificial calcium deficiency conditions, the food included a calcium carbonate minimum, i.e., 2% before the commencement of this trial (Table 1) (19).

The study was performed in two phases: The calcium kinetics (phase 1) were performed with 400 hens, and the shell-less egg and eggshell thickness study used 600 hens in phase 2. To mimic the calcium-consumption patterns of the hens in productive conditions, the study began on the first day at 6:00 a.m. and was conducted for 5 days in phase 1. In this



**TABLE 1** | Composition and calculated nutrient content in the diet used for 85 weeks-old Bovans-White hens.

Ingredients	(kg)
Corn	596.170
Soy flour 48%	267.498
Fine calcium carbonate	40.388
Coarse calcium carbonate	60.582
Soy oil	12.506
Orthophosphate 18:20	10.605
Salt	4.072
Vitamin <sup>a</sup> and mineral <sup>b</sup> premix	3.00
Mycotoxin sequestrant	2.00
DL-methionine 99%	1.971
Larvadex	0.500
L-Lysine HCl	0.328
Antioxidants	0.150
Fitasa ronozyme (GT)	0.100
Yellow pigment	0.090
Red pigment	0.040
Total	1,000
<b>Calculated analysis (g/kg)</b>	
Metabolizable energy (Kcal/kg)	2,859
Crude protein %	18.792
Total calcium%	4.100
Available phosphorus %	0.450
Methionine + Cysteine %	0.800
Lysine %	0.980
Tryptophan %	0.220
Sodium %	0.180

<sup>a</sup>Amount/kg: Retinol 0.9 g, cholecalciferol 0.019 g, d-α-tocopherol 10.004 g, phylloquinone 1.0 g, riboflavin 4.0 g, cyanocobalamin 0.060 g, pyridoxine 3.0 g, calcium pantothenate 13.0 g, niacin 25 g, biotin 0.063 g, choline chloride 250 g.

<sup>b</sup>Amount/kg: 0.2 g selenium, 0.1 g cobalt, 0.3 g iodine, 10 g copper, 50 g zinc, 100 g iron, 100 g manganese.

phase, hens were randomly divided into 4 groups of 100 animals each, and then subdivided into five replicates per group ( $n = 20$ /replicate). A control group (group GC) was established by supplementing it with 4.1% dietary calcium-carbonate based on the proposed dose-levels for this the lineage and this phase (19). The experimental groups did not receive calcium in their diet—it was incorporated into the manufactured FOLA-pellets as described in the referred patent. Group GF was given 8 g FOLA-pellets/hen containing the 4.1% calcium-carbonate; group GFc5 was provided with 8 g FOLA-pellets/hen also containing 4.1% calcium-carbonate plus 6 ppm of capsicum oleoresin of 500,000 Scoville Heat Units (SHU) (VEPinsa S.A. de C.V., Sinaloa, Mexico), and Group GFc10 was provided with 8 g FOLA-pellets/hen as for GFc5 but with 6 ppm of capsicum oleoresin of 1,000,000 SHU. The feeding time (6 a.m.) was considered time 0 for all groups.

Blood (1–2 mL) was taken from five birds at 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, and 24 h on day 1 and 5; on days 2, 3, and 4, the hens were sampled only at 2, 10, and 18 h. Therefore, each

hen was sampled no more than eight times during these 5 days trial in each replicate. This is 25 samples per sampling time in each group. Samples were immediately centrifuged (5,000 g for 15 min), and the serum was recovered for calcium concentration measurements via an Easy Kem Vet<sup>®</sup> semi-automatic chemical analyzer (Kontrolab, Mexico City). This analytical technique is based on the detection and quantification of a highly specific reaction of calcium with o-cresolftalein-complexone and 8-hydroxyquinoline at pH 8.2. The complex is measured at a wavelength of 570 nm (20). For standardization of the analytical technique, a recovery curve of added calcium chloride (SIGMA) was established in demineralized sterile water with an  $r = 0.99$ .

A computerized curve stripping program was used to fit and analyze the calcium concentration-vs.-time patterns for each group (PKAnalyst, MicroMath, Salt Lake City, Utah, 1998, USA). Models of best fit ( $r^3 = 0.99$ ) were chosen after analysis via the residual sum of squares and the minimal Akaike information criterion. There were several metrics: serum calcium over 24 h (AUC0-24); the maximum serum calcium concentration obtained (CMAX); time in which CMAX (TMAX) is reached; and RT (mean residence time). Statistical differences in serum concentrations of calcium among groups were carried out via a Mann-Whitney *U*-test. The probability values of these data were compared using Kruskal-Wallis tests and Dunnett *t*-tests for independent samples. A statistically significant value was considered when  $P \leq 0.05$ . All statistical analyses were performed using SPSS 14.0 for Windows.

Additionally, in phase 2, the number of shell-less eggs produced by 150 hens per group was evaluated, and the thickness of the egg shell (medium, superior, and inferior poles) was measured with a precision digital Vernier calipers with an error of  $\pm 0.01$  mm. The egg shell surface was determined via the following formula  $\text{area} = 3.9782 W \times 0.7056$  where  $W$  is the egg weight (g). The percent productions of shell-less eggs from supplemented hens as in phase 1 were recorded over the following 6 days. These data were statistically compared using the Kruskal-Wallis tests and Dunnett *t*-tests for independence. A statistically significant value was considered when  $P \leq 0.05$ . All statistical analyses were performed using SPSS 14.0 for Windows.

## RESULTS

The analytical method used for the evaluation of calcium showed a linearity of 0.001 to 40.0 mg/dL ( $r^2 = 0.968$ ) with a recovery of 98.6% and a quantification limit of 0.001 mg/dL. The serum concentration of calcium vs. time data was graphed with Origin Lab-Pro-9<sup>®</sup>. Areas under the concentration vs. time curves 0–24 h, 0–144 h, and 96–120 h were calculated through the trapezoidal method and confirmed with PKAnalyst<sup>®</sup>.

Serum calcium profiles obtained for GC were regarded as basal. Hence, these data were used to calculate relative bioavailability (Fr):  $\text{AUC}_{0-24\text{GF}}/\text{AUC}_{0-24\text{GC}} \times 100$ . Likewise, Fr values were calculated for the time intervals 24–96 h, 96–120 h, and 0–120 h (Table 2). Values and statistical differences obtained ( $P < 0.5$ ) are listed in Table 2. Serum calcium vs. time profiles are presented in Figures 1, 2. No statistically

**TABLE 2 |** Kinetic variables achieved for serum calcium in Bovans-White, second-cycle laying hens, considering four groups ( $n = 20$  hens in five replicates): control group (GC), receiving a diet containing basal levels of 4.1% of calcium-carbonate; group GF treated as GC, but including the same dose of calcium-carbonate in FOLA pellets; group GFc5 treated as GF, but adding 6 ppm of capsicum-oleoresin [500,000 Scoville Heat Units (SHU)], and group GFc10 treated as GFc5 but with 1,000,000 SHU capsicum-oleoresin.

Pharmacokinetic parameter	GC	GF	GFc5	GFc10
	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM
AUC <sub>0–24</sub> ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ )	378 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	455 $\pm$ 37 <sup>b</sup>	619 $\pm$ 85 <sup>c</sup>	677 $\pm$ 91 <sup>d</sup>
Fr <sub>0–24</sub> %	–	120	164	179
AUC <sub>96–120</sub> ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ )	378 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	467 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	642 $\pm$ 92 <sup>c</sup>	676 $\pm$ 84 <sup>d</sup>
Fr <sub>96–120</sub> %	–	124	170	188
AUC <sub>0–120</sub> ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ )	1,787 $\pm$ 125 <sup>a</sup>	2,265 $\pm$ 186 <sup>b</sup>	3,171 $\pm$ 212 <sup>c</sup>	3,459 $\pm$ 237 <sup>d</sup>
Fr <sub>0–120</sub> %	–	127	177	194
AUC <sub>24–96</sub> ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^{-1}$ )	1,031 $\pm$ 90 <sup>a</sup>	1,343 $\pm$ 91 <sup>b</sup>	1,910 $\pm$ 101 <sup>c</sup>	2,072 $\pm$ 124 <sup>d</sup>
Fr <sub>24–96</sub> %	–	130	185	201
T <sub>1/2<math>\alpha</math>0–24</sub> (h)	53 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	83 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	134 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	520 $\pm$ 50 <sup>d</sup>
T <sub>1/2<math>\alpha</math>96–120</sub> (h)	52 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	8 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	134 $\pm$ 11 <sup>c</sup>	527 $\pm$ 57 <sup>d</sup>
AUC <sub>0–<math>\infty</math>0–24</sub>	1,403 $\pm$ 113 <sup>a</sup>	3,254 $\pm$ 124 <sup>b</sup>	5,287 $\pm$ 289 <sup>c</sup>	21,115 $\pm$ 990 <sup>d</sup>
AUC <sub>0–<math>\infty</math>96–120</sub>	1,363 $\pm$ 102 <sup>a</sup>	3,290 $\pm$ 121 <sup>b</sup>	5,299 $\pm$ 224 <sup>c</sup>	21,454 $\pm$ 921 <sup>d</sup>
RT <sub>0–24</sub> (h)	11 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	193 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	804 $\pm$ 69 <sup>c</sup>
RT <sub>96–120</sub> (h)	11 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	194 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	806 $\pm$ 51 <sup>c</sup>
Calcium concentrations range (mg/dl)	12 – 22	16 – 22	23 – 28	25 – 31

*a,b,c,d* Different letters within columns indicate a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). FOLA pellets: F, bioavailability; O, optimum; L, long; A, action. AUC<sub>0–24</sub>; AUC<sub>96–120</sub>; AUC<sub>0–120</sub>; AUC<sub>24–96</sub>, area under the serum calcium-concentration vs. the corresponding time-period. Fr, relative bioavailability, taking GC as basal values; T<sub>1/2 $\alpha$ 0–24</sub> and T<sub>1/2 $\alpha$ 96–120</sub>, absorption of calcium half-times; AUC<sub>0– $\infty$ 0–24</sub> and AUC<sub>0– $\infty$ 96–120</sub>, values of serum calcium-concentrations vs. time extrapolated to infinitum; RT<sub>0–24</sub> and RT<sub>96–120</sub>, mean serum residence times for the marked time periods.

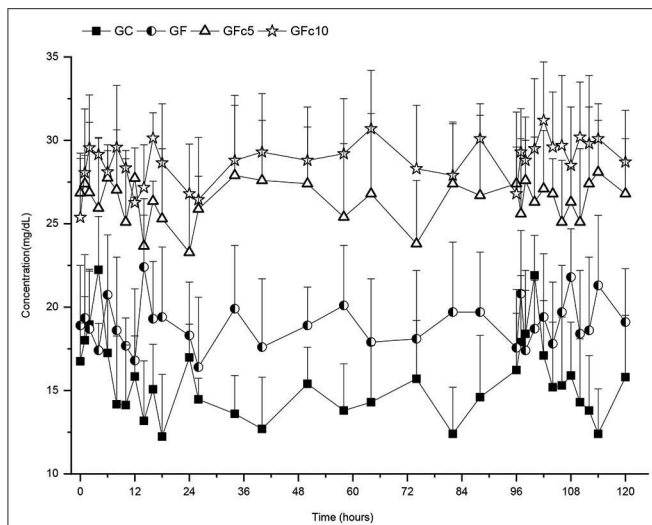
significant differences were found in any of the kinetic data for serum calcium when comparing data-sets within each group (i.e., calcium concentration ranges, AUC<sub>0–24</sub> vs. AUC<sub>96–120</sub>; T<sub>1/2 $\alpha$ 0–24</sub> vs. T<sub>1/2 $\alpha$ 96–120</sub>; RT<sub>0–24</sub> vs. RT<sub>96–120</sub>). However, all values obtained among groups were statistically different ( $P < 0.05$ ) except for RT between GC and GF. The GFc10 group had the highest Fr<sub>0–120</sub> (194%) while the GF obtained had an Fr<sub>0–120</sub> of only 127%. The addition of capsicum oleoresin in the two SHU potencies significantly increased Fr<sub>0–120</sub> of calcium ( $P < 0.05$ ) in both groups, i.e., GFc5 and GFc10 (Fr = 177 and 194, respectively). Likewise, the residence times of GFc5 and GFc10 were higher than those obtained in the GC and GF. The GFc10 showed the greatest Ca serum concentrations ( $P < 0.05$ , for all comparisons), i.e., >31.2 mg/dL while the GC was only 22.2 mg/dL. Predictably, the variables in the GC group were the lowest ( $P < 0.05$  for all comparisons). In phase 2, **Table 3** shows the percent of shell-less eggs recorded by each group per day. There were no shell-less eggs from day 3 onwards in the GFc10 group. **Table 4** shows the mean  $\pm$  1SD thickness values of egg shells in the different groups. At day 1, the GF, GFc5, and GFc10 groups showed statistically higher values than GC. From day 2 onwards, GFc10 had the thickest egg shells of all groups ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

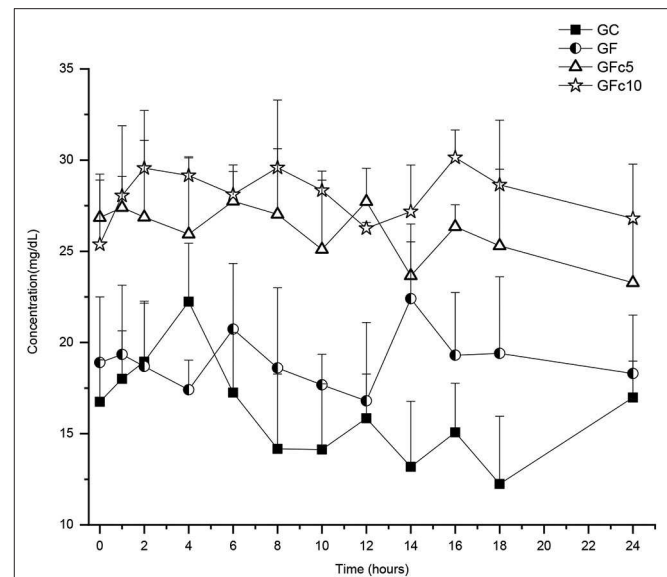
The quality of chicken eggs depends on many factors including the bioavailability of calcium. The main source of calcium in hens is calcium carbonate—an economical component utilized

in most diets worldwide. However, the absorption capability of calcium by the GI tract of hens is diminished during the second posture cycle (21). This can be overcome by adding more calcium to the hen's diet, i.e., twice the normal level utilized during the first cycle (22, 23). Nonetheless, the absorption of calcium can be low and unpredictable during this second egg-posture cycle (24, 25). This addition can fail to meet the physiological need for calcium. Consequently, defective egg shells appear affecting egg production and profitability during the second egg-laying cycle (26–28). Thus, it is critical to design sources of calcium that can remain available at the GI tract of laying hens and offer good bioavailabilities. In addition, absorption-promoters should be present and linked to the calcium source. The pharmaceutical preparation of FOLA pellets tested here incorporate these features. The composition of FOLA pellets is designed to stay longer in the GI tract for better calcium absorption—particularly at night-time (13, 14) while the addition of capsicum-oleoresin improves bioavailability. Capsicum-oleoresin contains a group of substrates known as capsaicinoids that are responsible for the pungent taste of chili peppers (*Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*). The most relevant active ingredients are capsaicin and dihydrocapsaicin, which represent 80–90% of all capsaicinoids and are found in a 1:1 ratio with small amounts of nordihydrocapsaicin, homocapsaicin, homodihydrocapsaicin, norcapsaicin, nornorcapsaicin, dihydrocapsaicin, homohydrocapsaicin, and nonivamide (29). Neither the precise substance(s) allowing for better F nor how this process occurs are known.





**FIGURE 1** | Five days calcium serum concentrations achieved with four calcium sources administered orally in 85-week-old Bovans-White hens: control group (GC), receiving a diet containing basal levels of 4.1% of calcium-carbonate; group GF treated as GC, but including the same dose of calcium-carbonate in FOLA pellets; group GFc5 treated as GF, but adding 6 ppm of capsicum-oleoresin (500,000 Scoville Heat Units [SHU]), and group GFc10 treated as GFc5 but with 1,000,000 SHU capsicum-oleoresin.



**FIGURE 2** | One day calcium serum profiles achieved with four calcium sources administered orally in 85-week-old Bovans-White hens: control group (GC), receiving a diet containing basal levels of 4.1% of calcium-carbonate; group GF treated as GC, but including the same dose of calcium-carbonate in FOLA pellets; group GFc5 treated as GF, but adding 6 ppm of capsicum-oleoresin (500,000 Scoville Heat Units [SHU]), and group GFc10 treated as GFc5 but with 1,000,000 SHU capsicum-oleoresin.

It has been postulated that capsaicin molecules activate the secretion of substance P from nearby nerve terminals, and the capsaicins are inserted into the double lipid layer of cell membranes to modify the selective permeability of the ion channels (30). The blockage of the P-glycoprotein-mediated expulsion pumps in the GI tract cells has also been proposed as a mechanism of action (13, 14); capsaicinoids are known to activate anandamide receptors at the intestinal level thus increasing glucose absorption (31). Capsicum-oleoresin has an antibacterial activity and decreases the fecal release of *Salmonella* sp.; this material is a natural yolk pigment. Thus, capsicum-oleoresin is considered a non-antibiotic growth-promoter and is included in hen diets worldwide at a rate of 0.2% (32). Despite the favorable results obtained for calcium F, the optimal dose ratio of capsicum-oleoresin remains to be determined as well as its possible adverse reactions as a function of inclusion rates. Also, considering the different sources of capsicum and capsaicinoids (33), it is advisable to determine the active chemical fraction(s) responsible for inducing an increase in calcium F.

The outstanding improvement in calcium F using the FOLA pharmaceutical preparation containing capsicum-oleoresin is particularly relevant considering that calcium carbonate absorption can only range from 10 to 14% in these hens. This is explained in terms of its low aqueous solubility because intestinal absorption only occurs with dissolved calcium. Other sources of calcium, i.e., calcium gluconate-lactate possess higher solubility, which in turn may favor absorption up to ~40% (unpublished data). However, this latter source of calcium contains only 12% calcium

**TABLE 3** | Percent of shell-less eggs recorded for 6 days with four calcium sources administered orally in 85-week-old Bovans-White hens: control group (GC), receiving a diet containing basal levels of 4.1% of calcium-carbonate; group GF treated as GC, but including the same dose of calcium-carbonate in FOLA pellets; group GFc5 treated as GF, but adding 6 ppm of capsicum-oleoresin (500,000 Scoville Heat Units [SHU]), and group GFc10 treated as GFc5 but with 1,000,000 SHU capsicum-oleoresin.

Day	Percent of shell-less eggs			
	GC	GF	GFc5	GFc10
1	6	5.3	6	6
2	5.3	5.3	4	0.7
3	6	4.7	2.7	0
4	6	3.3	0.7	0
5	5.3	2.7	0	0
6	6	2.7	0	0
±SE	0.019	0.094	0.245	0.219

per gram. Hence, large quantities would be required in the drinking water to meet the calcium demand of laying hens during a second egg-producing cycle. Considering the high costs, an adequate dose delivered through the drinking water appears unlikely.

Finally, the particle size of the calcium source has a direct relationship with its GI transit time and consequently with the dissolution/absorption ratio from this site. Relatively coarse particles (>0.5 cm) show longer transit times in

**TABLE 4 |** Eggshell thickness recorded for 6 days with four calcium sources administered orally in 85-week-old Bovans-White hens: control group (GC), receiving a diet containing basal levels of 4.1% of calcium-carbonate; group GF treated as GC, but including the same dose of calcium-carbonate in FOLA pellets; group GFc5 treated as GF, but adding 6 ppm of capsicum-oleoresin (500,000 Scoville Heat Units [SHU]), and group GFc10 treated as GFc5 but with 1,000,000 SHU capsicum-oleoresin.

Day	Eggshell thickness (mm)							
	GC		GF		GFc5		GFc10	
	Mean	±1 SE	Mean	±1 SE	Mean	±1 SE	Mean	±1 SE
0	0.34	0.019	0.35	0.01	0.34	0.017	0.35	0.022
1	0.35	0.012	0.37 <sup>b</sup>	0.012	0.39 <sup>c</sup>	0.013	0.4 <sup>c</sup>	0.015
2	0.34	0.024	0.37 <sup>b</sup>	0.012	0.4 <sup>c</sup>	0.015	0.42 <sup>d</sup>	0.016
3	0.35	0.025	0.39 <sup>b</sup>	0.011	0.41 <sup>c</sup>	0.01	0.45 <sup>d</sup>	0.014
4	0.34	0.017	0.4 <sup>b</sup>	0.013	0.41 <sup>c</sup>	0.012	0.43 <sup>d</sup>	0.011
5	0.34	0.019	0.4 <sup>b</sup>	0.01	0.42 <sup>c</sup>	0.011	0.46 <sup>d</sup>	0.013
6	0.35	0.013	0.41 <sup>b</sup>	0.011	0.43 <sup>c</sup>	0.012	0.46 <sup>d</sup>	0.02
SEM	0.018		0.011		0.012		0.015	

<sup>b,c,d</sup> Different letter in rows indicate statistically significant difference within a day ( $P < 0.05$ ).

the GI tract and remain available for absorption up to 12 h while finer grains are more easily transported distally but are more readily bioavailable for absorption after feeding (34). For these reasons, calcium carbonate is usually added to the diet of hens in a larger proportion of coarse particles (2–4 mm) and the rest as smaller particles (5, 8, 27, 35, 36). Thus, further studies are needed to define the best proportion of coarse and fine granules of calcium carbonate that should be included in the FOLA-pellets to further optimize calcium absorption in double-cycle egg-laying hens (37).

In conclusion, the calcium requirements for egg production in the second cycle hens can be completely corrected in a few days if calcium is supplemented in the form of FOLA containing capsicum (particularly 1,000,000 Scoville Heat Units). Large-scale commercial tests in second-cycle hens are needed including full egg quality analysis (low quality eggs may account for up to 50% of the production).

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets presented in this study are included in the article/supplementary material.

## REFERENCES

1. FAO. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. (2018). Available online at: <http://faostat.fao.org/> (accessed December 2019).
2. UNA. Unión Nacional de Avicultores. (2017–18). *Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola*. México. Available online at: <https://www.una.org.mx/compendio-de-indicadores-economicos-2018> (accessed January 2020).
3. Lordelo M, Fernandes E, Bessa RJ, Alves P. Quality of eggs from different laying hen production systems, from indigenous breeds and specialty eggs. *Poult Sci*. (2016) 96:1485–91. doi: 10.3382/ps/pew409
4. Roberts JR. Factors affecting egg internal quality and egg Shell quality in laying hen. *J Poult Sci*. (2004) 41:161–77. doi: 10.2141/jpsa.41.161
5. Lichovnikova M. The effect of dietary calcium source, concentration and particle size on calcium retention, eggshell quality and overall calcium requirement in laying hens. *Br Poult Sci*. (2007) 48:71–5. doi: 10.1080/00071660601148203
6. Franco-Jiménez DJ, Beck M. Intestinal calcium uptake, shell quality and reproductive hormones levels of three laying hen varieties after prolonged egg production. *Int J Poult Sci*. (2005) 4:518–22. doi: 10.3923/ijps.2005.5.18.522
7. Preda C, Budica C, Dojana N. Effect of various levels of dietary calcium on blood calcium concentration and hormonal status in white

## ETHICS STATEMENT

Study design and animal handling complied with Mexican regulations and ethical standards for the usage of experimental animals as laid out by the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) through the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals and Mexican prescripts in NOM-062-ZOO-1999. The data comply with the biosecurity standards of the Poultry Production Research, Extension and Teaching Center of the Veterinary College (UNAM) (17, 18). Written permission was granted in March, 2018.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

HS and LG conceived and designed the study. These authors together with CC and LC carried out the clinical trial. M-JB and MM-B manufactured and evaluated calcium concentrations. LG and HS carried out the pharmacokinetic and statistical analysis. All authors have read and accepted the manuscript as it is presented to the journal.

## ACKNOWLEDGMENTS

The support from the PAPIIT-UNAM IT200419 project for carrying out this research is acknowledged.

- cornish and white leghorn hens. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Vet Med.* (2014) 71:182–6.
8. Valkonen E, Venäläinen E, Rossow L, Valaja J. Effects of calcium diet supplements on egg strength in conventional and furnished cages, and effects of 2 different nest floor materials. *Poult Sci.* (2010) 89:2307–16. doi: 10.3382/ps.2010-00700
  9. Ren ZS, Wenqiang L, Yanli L, Di Zhipeng H, Xi C, Jiakun Y, et al. Dynamics of serum phosphorus, calcium, and hormones during egg laying cycle in Hy-Line Brown laying hens. *Poult Sci.* (2019) 98:2193–200. doi: 10.3382/ps/pey572
  10. Herrera J, Saldaña B, Cámara L, Berrococo JD, Mateos GG. Influence of grinding size of the main cereal of the diet on egg production and eggs quality of brown egg laying hens from 33 to 65 weeks of age. *Poult Sci.* (2018) 97:2506–15. doi: 10.3382/ps/pey098
  11. Cook ME. Sturkie's avian physiology. *J Wildl Dis.* (2017) 53:703–5. doi: 10.7589/0090-3558-53.3.703
  12. Güçlü BK, Işcan KM. Farklı düzeylerde kalsiyum içeren yumurta tavuğu rasyonuna eggshell-49 ilavesinin performans, yumurta kalitesi ve bazı kan parametrelerine etkisi. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* (2004) 51:219–24. doi: 10.1501/Vetfak\_0000000009
  13. Gutierrez L, Zermeño J, Alcalá Y, Sumano H. Higher bioavailability of doxycycline in broiler chickens with a novel in-feed pharmaceutical formulation. *Poult Sci.* (2017) 96:2662–9. doi: 10.3382/ps/pex036
  14. Gutierrez L, Alcalá Y, Bernad MJ, Sumano H. Increased bioavailability of tylosin phosphate as in-feed medication formulated for long-action pellets in broiler chickens. *J App Poult Res.* (2017) 27:16–22. doi: 10.3382/japr/pfx035
  15. Gutierrez OL, Sumano LS, Zamora QM. Administration of enrofloxacin and capsaicin to chickens to achieve higher maximal serum concentrations. *Vet Rec.* (2002) 350–3. doi: 10.1136/vr.150.11.350
  16. Bedada S, Appani KR, Boga PK. Capsaicin pretreatment enhanced the bioavailability of fexofenadine in rats by P-glycoprotein modulation: *in vitro*, *in situ* and *in vivo* evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* (2017) 43:932–8. doi: 10.1080/03639045.2017.1285310
  17. Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999. *Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals*. United Mexican States Department of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food (1999). Available online at: [www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO)
  18. Biosecurity Standards of the Poultry Production Research. *Extension Teaching Center/FMVZ-UNAM*. Available online at: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/ReglamentoCICUAE.pdf>
  19. Bovans White Guide. *Commercial Management Guide*. Available online at: [https://www.bovans.com/documents/261/HGL\\_nutrition\\_management\\_guide\\_L7121-2.pdf](https://www.bovans.com/documents/261/HGL_nutrition_management_guide_L7121-2.pdf) (accessed February, 2020).
  20. Kumar V, Gill KD. *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide*. Singapore: Springer (2018).
  21. Hernández J, Cuca-García M, Pró-Martínez A, González-Alcorta M, Becerril-Pérez C. Nivel óptimo biológico y económico de calcio en gallinas Leghorn blancas de segundo ciclo de postura. *Agrociencia.* (2006) 40:49–57.
  22. Rodríguez JHV, Pinargote MVV, Cedeño JOM. Adición de carbonato cálcico y su repercusión económica sobre el grosor del cascarón en ponedoras. *Rev Espamcienc.* (2012) 3:1–7.
  23. Li XL, He W, Yang M, Yan Y, Xue Y, Zhao S. Effect of dietary supplementation of *Ligustrum lucidum* on performance, egg quality and blood biochemical parameters of Hy-Line Brown hens during the late laying period. *Animal.* (2017) 11:1899–904. doi: 10.1017/S1751731117000532
  24. Castillo C, Cuca M, Pro A, Gonzalez M, Morales E. Biological and economic optimum level of calcium in white leghorn laying hens. *Poult Sci.* (2004) 83:868–72. doi: 10.1093/ps/83.6.868
  25. González MV, López RM, González EÁ. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. *Rev Mex Cien Pec.* (2002) 40:181–6.
  26. Taylor A, Bedford E, Pace M, Miller H. The effects of phytase and xylanase supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci.* (2018) 59:554–61. doi: 10.1080/00071668.2018.1483575
  27. Manangi MK, Maharjan P, Coon CN. Calcium particle size effects on plasma, excreta, and urinary Ca and P changes in broiler breeder hens. *Poult Sci.* (2018) 97:2798–806. doi: 10.3382/ps/pey043
  28. Brugère P, Vaillancourt JP, Bouzouaia M, Shivaprasad HL, Venne D. Manual of poultry diseases. Ed. 6th México D.F. Blood biochemistry of birds. AFAS. (2015) 11:81–5.
  29. Govindarajan VS, Sathyanarayana MN. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Crit Rev Foods Sci Nutr.* (1991) 29:435–73. doi: 10.1080/10408399109527536
  30. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Phys.* (2004) 201:167–80. doi: 10.1002/jcp.20061
  31. Troy-Fioramonti, S, Demizieux L, Gresti J, Muller T, Vergès B, Acute activation of cannabinoid receptors by anandamide reduces gastrointestinal motility and improves postprandial glycemia in mice. *Diabetes.* (2015) 64:808–18. doi: 10.2337/db14-0721
  32. Huaqiang L, Liji J, Feifei W, Thacker P, Xiaoyu L, Jiansong Y, et al. Effect of red pepper (*Capsicum frutescens*) powder or red pepper pigment on the performance and egg yolk color of laying hens. *AJAS.* (2012) 25:1605–10. doi: 10.5713/ajas.2012.12235
  33. Thiele R, Mueller-Seitz E, Petz M. Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. *J Agr Food Chem.* (2008) 56:4219–24. doi: 10.1021/jf073420h
  34. Wistedt A, Ridderstråle, Wall H, Holm L. 2019. Age-related changes in the shell gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen hybrids. *Acta Vet Scand.* (2019) 61:1–14. doi: 10.1186/s13028-019-0449-1
  35. Hamdi M, Solà-Oriol D, Davin R, Pérez JF. Calcium sources and their interaction with the different levels of non-phytate phosphorus affect performance and bone mineralization in broiler chickens. *Poult Sci.* (2015) 94:2136–43. doi: 10.3382/ps/peu061
  36. Hafeez A, Mader A, Ruhnke I, Röhe I, Goodarzi Borojini F, Yousaf MS, et al. Implication of milling methods, thermal treatment, and particle size of feed in layers on mineral digestibility and retention of minerals in egg contents. *Poult Sci.* (2015) 94:240–8. doi: 10.3382/ps/peu070
  37. Rodríguez JHV, Bravo GAH. El Efecto de diferentes niveles de suministro de carbonato de calcio sobre el peso y grosor de la cascara del huevo. *Rev Colomb Cienc Anim Recia.* (2019) 11:719. doi: 10.24188/recia.v11.n2.2019.719

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Carrillo, Bernad, Monroy-Barreto, Coello, Sumano and Gutiérrez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Journal Pre-proof

BIOAVAILABILITY OF FOUR CALCIUM SOURCES IN THE SECOND CYCLE EGG-PRODUCING HEN

Héctor Sumano López, Lizbeth Carrillo González, Minerva Monroy-Barreto, Graciela Tapia Perez, Lilia Gutiérrez Olvera



PII: S1056-6171(20)30109-4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.10.005>

Reference: JAPR 106

To appear in: *Journal of Applied Poultry Research*

Received Date: 18 February 2020

Revised Date: 21 May 2020

Accepted Date: 15 October 2020

Please cite this article as: López H.S., González L.C., Monroy-Barreto M., Perez G.T. & Olvera L.G., BIOAVAILABILITY OF FOUR CALCIUM SOURCES IN THE SECOND CYCLE EGG-PRODUCING HEN, *Journal of Applied Poultry Research* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.10.005>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© YEAR Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc.

## BIOAVAILABILITY OF FOUR CALCIUM SOURCES IN THE SECOND CYCLE EGG-PRODUCING HEN

Second cycle egg-producing hen

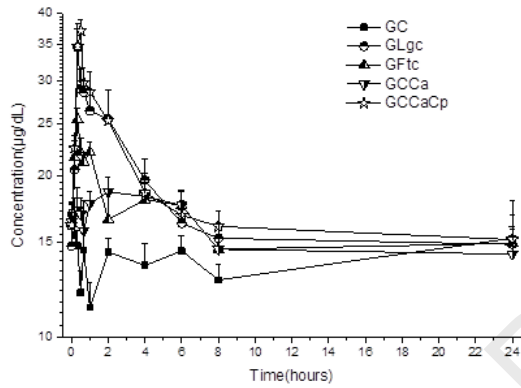


Dosage of 4 sources of calcium per group

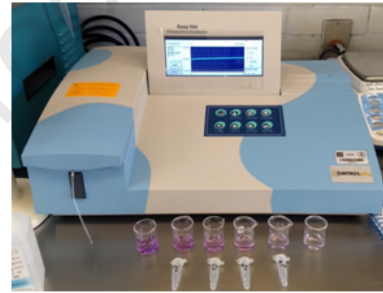


Administered by means of a semi-rigid probe directly placed in the proventriculus

Blood samples (0.5 mL per hen) were obtained at 0.16, 0.33, 0.5, 0.66, 1, 2, 4, 6 and 24 h, no hens was sampled more than 3 times.



Calcium serum profiles achieved with four calcium sources administered orally in Bovans-White hens and a control group without supplementation; GCCa group: calcium carbonate; GFtc group: tricalcium phosphate, GLgc group 3: calcium lactate-gluconate, GCCaCp group: calcium carbonate plus 100 µg/mL of capsiicum oleoresin



The serum obtained and their calcium content was immediately determined by means of an Easy Kem Vet® semi-automatic chemical analyzer

1 **BIOAVAILABILITY OF FOUR CALCIUM SOURCES IN THE SECOND CYCLE**  
2 **EGG-PRODUCING HEN**

3

4 **Short title:** Calcium bioavailability in hens

5

**Héctor Sumano López<sup>1</sup>**

6

**Lizbeth Carrillo González<sup>1</sup>**

7

**Minerva Monroy-Barreto<sup>2</sup>**

8

**Graciela Tapia Perez**

9

**Lilia Gutiérrez Olvera<sup>1\*</sup>**

10

11

12

13 <sup>1</sup>**Department of Physiology and Pharmacology. School of Veterinary Medicine; National**  
14 **Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico, 04510**

15 <sup>2</sup>**Department of Analytical Chemistry, School of Chemistry, National Autonomous**  
16 **University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico, 04510**

17

18

19

20

21

22

23 **\* Corresponding Author:** [liliago@unam.mx](mailto:liliago@unam.mx)

24

25

## 26 **Summary**

27 In the second cycle of laying hens, egg production and quality decrease. This is mainly due to  
28 decreased absorption of calcium from the gastrointestinal tract. Hence, serum concentrations  
29 of calcium tend to decrease and are compensated through bone reabsorption. There are several  
30 sources of calcium with different solubilities and absorption rates. The choice of one of them  
31 may be of importance for the referred second laying-cycle in hens. Hence, relative F (Fr) of  
32 four sources of Ca were evaluated in 300 Bovans-White 85-week-old hens. Animals were  
33 randomly assigned to five groups as follows: control-group receiving base-line doses of  
34 calcium carbonate as required by this hens' lineage (GC); GCca-group which received  
35 additional calcium carbonate; GFtc-group dosed with tricalcium phosphate; GLgc-group  
36 which received calcium lactate-gluconate, and GCcaCp-group which received calcium  
37 carbonate plus 10  $\mu\text{g}$  of capsicum oleoresin (CO<sub>r</sub>). Each hen was orally dosed with 1 g of Ca-  
38 equivalent by probe, and serum Ca was quantified at predetermined times. Ca-kinetic  
39 behavior was characterized by calculating: maximum serum concentration ( $C_{\text{MAX}}$ ); time to  
40 achieve  $C_{\text{MAX}}$  ( $T_{\text{MAX}}$ ); area under the concentration curve vs. time ( $\text{AUC}_{0-24}$ ). Fr as compared  
41 to GCca were calculated. GLgc and GCcaCp had the greatest  $C_{\text{MAX}}$  and Fr values i.e., 34.7  
42 and 37.2  $\mu\text{g}/\text{dL}$  for  $C_{\text{MAX}}$  and 109.6 and 112.9 % for  $F_{\text{R}}$ , respectively, and they were  
43 statistically indistinguishable between them ( $P < 0.05$ ). GCca showed lower AUC and  $C_{\text{MAX}}$   
44 than former groups, but greater than GC ( $P < 0.05$ ). Capsicum oleoresin is postulated as a  
45 promoter of Ca bioavailability in hens during the second cycle of egg-production. A dose-  
46 response relationship of CO<sub>r</sub> is required to determine the optimum dose of CO<sub>r</sub> to enhance Ca  
47 bioavailability.

48

49

50 **Keywords:** bioavailability; calcium; capsicum-oleoresin; egg-production; second cycle-hens.



## 51 **Description of the problem**

52 Despite a worldwide consumption of 73.8 million tons of hen eggs in 2018, the WHO (World  
53 Health Organization) has estimated that to meet the demand for this commodity, egg  
54 production will have to be increased approximately four times in the next two decades (UNA,  
55 2017; FAO, 2018). Egg production can be described as a highly technical industry in Mexico,  
56 with exceptional chicken husbandry, biosecurity, and nutritional standards. However, to meet  
57 the world's calculated demand for chicken eggs, further research is needed to improve the  
58 bioavailability of nutrients, particularly of the calcium sources. (Lordelo, et al., 2016). The  
59 present study provides a new alternative to increase the bioavailability of various sources of  
60 calcium administered to laying hens.

61 The proportion of calcium required in serum and the egg-shell production site in the oviduct  
62 is 12:4 (Franco and Beck, 2005). Calcium is usually administered in the food as calcium  
63 carbonate from limestone origin, whose calcium content is approximately 36%. A total of  
64 2.2% calcium carbonate is added to the diet during the growth of chickens. When the egg-  
65 laying begins, the added percentage increases to 3.8% (Preda *et al.*, 2014), and as the hens  
66 ages, this percentage increases up to 4 - 4.5% (Hernández *et al.*, 2006). The pharmaceutical  
67 form is important and should be tailored according to the hens' age. Initially, it is provided in  
68 50% coarse-form and then up to 70%, when the end of the posture cycle approaches. This  
69 sequence of calcium carbonate supplementation, is believed to improve bioavailability (F) of  
70 calcium (Rodríguez *et al.*, 2012). Usually, this procedure to deliver calcium to hens suffices in  
71 healthy laying-hens without steatosis. This latter condition impairs bioactivation of vitamin  
72 D3 to D4 which is necessary for calcium absorption. Under such conditions, calcium  
73 supplementation has not been defined. Due to its cost, limestone is the most popular source of  
74 calcium and it can only be administered in food, because of its almost null water solubility  
75 (Purgstaller *et al.*, 2019). Also, an adequate balance of phosphorus: calcium (1:2) must be



76 ensured to optimize calcium F from the gastrointestinal tract (Harrison and McDonald, 2006;  
77 Bohn, 2012). Limestone also contains other bivalent ions such as magnesium, manganese,  
78 zinc, copper, and iron. It has been postulated that they can compete with calcium for  
79 absorption sites (Hafeez *et al.*, 2015), and calcium ions can generate insoluble compounds  
80 with other molecules present in the intestinal content, limiting the bioavailability (Franco and  
81 Beck, 2005). Moreover, it has been recognized that there is considerable variation in the  
82 chemical composition of different commercial limestone matrices (Lichovnikova, 2007) and  
83 that calcium's F is modified by the presence of phytates in the diet elements (Novak and  
84 Scheideler, 2001). Additionally, the fast transit time of food through the gastrointestinal tract  
85 (GIT) of hens - maximum 4 to 5 h - (Cook, 2017), limits calcium's F (Herrera *et al.*, 2018),  
86 particularly when the source is limestone (Güclü and Iscan, 2004).

87 Commonly, most hen lines have a first cycle of egg production that ends at 75-80 weeks of  
88 age (Gordon and Martinez, 2009). As of this moment, laid eggs gradually show lower quality  
89 in terms of weak or even absent eggshells, which makes them economically unviable (Wistedt  
90 *et al.*, 2019). It has been postulated that 81-week-old hens have metabolic problems to  
91 maintain their egg production. They are regarded as second-cycle laying hens or simply "old"  
92 (Dibner *et al.*, 1996; Hamdi *et al.*, 2015; Akabari *et al.*, 2019). Thus, old hens are inherently  
93 deficient to absorb calcium, and most of the calcium administered through the diet is excreted  
94 (Franco and Beck, 2005). If it were not for this characteristic, these hens could continue their  
95 egg faultless production for longer periods. This is particularly true in some parts of the world  
96 where, for economic reasons, it is not feasible to replace the flock with young animals.  
97 Therefore, calcium F is a critical feature to extend the productive life of laying hens when  
98 older than 81 weeks.

99

100 Considering the above and because there are no comparative studies that estimate the F of  
101 other sources of calcium, nor the role that other compounds can possess to promote calcium  
102 absorption i.e., capsicum oleoresin (CO<sub>r</sub>), a known absorption enhancer for various substrates  
103 (Gutierrez *et al.*, 2017), a study to assess the relative bioavailability (Fr) of calcium was  
104 carried out in 85-week-old hens, already producing eggs with faulty shells.

105

## 106 **Material and methods**

107

108 The study design and animal management complied with Mexican regulations for the use of  
109 experimental animals as established by the National Autonomous University of Mexico  
110 (UNAM) and the Mexican regulations described in NOM-062-ZOO-1999. A total of 300  
111 *Bovans-White* 85-week-old hens were included in this trial. They were within a 10-day molt  
112 period, and weighed a mean of  $1,520 \pm 30$  g. Hens were housed in groups of three in  
113 California-type cages 40 cm wide x 45 cm deep and 45 cm high (600 cm<sup>2</sup>/hen). Water was  
114 supplied *ad libitum* utilizing cup drinkers (3 hens/cup), and a dark/light cycle of 8-16 h was  
115 established. Feed was made available through channel feeders (13.3 cm/hen) following  
116 established standards. To avoid extreme calcium deficiency conditions in this trial, the diet  
117 followed the standards of the *Bovans-White* (*Bovans white guide*, 2011), which includes 2%  
118 calcium carbonate (Table 1). The study initiated every morning at 6:00 a.m. to mimic the  
119 times of calcium consumption of animals in productive conditions. Hens were assigned  
120 randomly in 3 birds/cage and a group of 4 cages constituted a replicate with a total of 5  
121 replicates/treatment (i.e., 60 hens per group). The study initiated every morning at 6:00 a.m.  
122 to mimic the times of feed and calcium consumption of animals in productive conditions. To  
123 avoid variations in the dose of calcium due to different feed-intake patterns, each one of the  
124 calcium sources was administered employing a semi-rigid probe directly placed in the

125 proventriculus and considering a total calcium equivalent-dose of 1 g/bird, either suspended  
126 or diluted in water, depending on the source of calcium, as shown in table 1. A control group  
127 was also established which received only the same volume of plain water without any added  
128 source of calcium (GC group). The groups were set as follows: GCca group, which received  
129 calcium carbonate (Meyer Chemical Reagents, Mexico); GFtc group, which was administered  
130 with tricalcium phosphate (Calcigenol®, Sanofi Aventis, Mexico); GLgc group 3, based on  
131 calcium lactate-gluconate (Sandoz®, Mexico); and the GCcaCp group, which received  
132 calcium carbonate (Meyer Chemical Reagents, Mexico) plus 10 µg of calcium-oleoresin  
133 (pungence 1,000,000 Scoville units, <2% of humidity, density 0.95 g/cm<sup>3</sup>; VEPINSA SA de  
134 CV Industries, Los Mochis, Sinaloa, Mexico).

135 Basal samples before calcium administration were obtained from all hens. Then, blood  
136 samples (0.5 mL per hen) were obtained at 0.16, 0.33, 0.5, 0.66, 1, 2, 4, 6 and 24 h, no hen  
137 was sampled more than 3 times. Samples were centrifuged (5,000 g for 15 min), serum  
138 recovered and their calcium content immediately determined using an Easy Kem Vet® semi-  
139 automatic chemical analyzer (Kontrolab, Mexico City). This analytical technique is based on  
140 the detection and quantification of the ion through a highly specific reaction of calcium o-  
141 cresoltalein-complexone and 8-hydroxyquinoline, at a pH of 8.2, forming a complex that was  
142 measured at a wavelength of 570 nm (Vijay and Kiran, 2018). For standardization of the  
143 analytical technique, a standard curve for added calcium (calcium chloride: SIGMA) was  
144 established in both, demineralized sterile water and chicken serum. All kinetics of serum  
145 calcium concentrations were processed using the PKAnalyst software (MicroMath, Salt Lake  
146 City, Utha, 1998), which establishes the best fit for the serum calcium concentration vs. area  
147 under the curve and provides values of area under the serum calcium concentration vs. time in  
148 24 hours (AUC<sub>0-24</sub>); the maximum serum calcium concentration (C<sub>MAX</sub>), and the time in  
149 which C<sub>MAX</sub> (T<sub>MAX</sub>) is reached. These data were statistically compared using the Kruskal-

150 Wallis and the Dunnet *t*-tests for independent samples, as collected data was not normally  
151 distributed. A statistically significant value was considered when  $P \leq 0.05$ . In order to obtain  
152 Fr values serum concentrations of calcium in GCa were taken as baseline. Hence, for the  
153 relative bioavailability (Fr), the following formula was utilized:  $Fr_{GLgc} = AUC_{0-24GLgc}/AUC_{0-}$   
154  $_{24GCa} \times 100$ .

155

## 156 Results

157

158 The analytical method used for calcium evaluation showed a linearity of 0.001 to 40.0 mg/dL  
159 with  $r^2 = 0.968$  and  $r^2 = 0.975$ , for demineralized water and serum, respectively. A recovery of  
160 98.6% was obtained with a quantification limit of 0.001 mg/dL. Therefore, it is feasible to  
161 assume that the observed results are highly repeatable and reliable. Fr values are presented in  
162 Table 3 and mean + 1 SD serum calcium profiles obtained are depicted in Figure 1. Results  
163 show that Fr for GCcaCp was the greatest (112.9 %), and was statistically superior to all other  
164 groups except GLgc, who exhibited values that were statistically indistinguishable from those  
165 found in the former group ( $P < 0.05$ ). Likewise, a comparison of mean  $C_{MAX}$  values achieved  
166 by GLgc and GCcaCp were statistically indistinguishable ( $P < 0.05$ ). Fr and  $C_{MAX}$  values for  
167 GFtC were greater than GCa ( $P < 0.05$  in both cases). Consequently  $AUC_{0-24}$  obtained for  
168 GFtc was statistically superior to GCa and both values were statistically higher than GC ( $P <$   
169  $0.05$  in all cases).

170

## 171 Discussion

172

173 Poultry farming is the leading livestock activity providing animal protein at affordable costs  
174 worldwide (UNA, 2018). Mexico has the largest per capita egg consumption with an annual

175 intake of 23 kg and the country is ranked as the fourth largest egg-producer with an overall  
176 egg-production of more than 2.8 million tons in 2018 (UNA, 2018). Approximately 45% of  
177 egg producing farmers use a second production cycle in Mexico. In other countries this  
178 percentage is often greater i.e., 70% or more (Hernández *et al.*, 2006). The reason to obviate  
179 replacement of the flock is the costs that this entails. Yet, maintaining a second posture cycle  
180 is only marginally viable due to a decrease in good quality egg-production; that is, due to  
181 defective egg-shell quality, a fact that constrains its commercialization (Keshavarz *et al.*,  
182 1994; Rodríguez *et al.*, 2012). To diminish egg-production losses during this second cycle, it  
183 usually necessary to increase the calcium added to their feed. Calcium carbonate is the chosen  
184 source. In this study, calcium carbonate was in-feed supplemented at a rate of 2.25%, based  
185 on the minimum recommended concentration for the hen-lineage here utilized (Rodríguez and  
186 Bravo, 2019). Nevertheless, the level of calcium recommended by the N.A.S.-N.R.C (1966) is  
187 at least 2.75% and many authors choose to add proportions of calcium carbonate equal to or  
188 greater than 3.4% (Li *et al.*, 2017). But even with this latter supplementation defective egg-  
189 shell persists. The concentration of calcium carbonate here utilized, was clearly insufficient,  
190 but was utilized as a baseline to test calcium bioavailability under real conditions of second  
191 cycle egg-production, with high percentage production of defective egg-shells. The added  
192 bolus dose of calcium administered orally in all groups (1 g equivalent of Ca/hen) was based  
193 on previous studies carried out by Vera-Rodríguez *et al.* (2012), who found that after adding  
194 that amount, the quality of the shell could be improved.

195 In many instances and despite calcium supplementation, demands of Ca in second-cycle egg-  
196 producing hens are not resolved, and egg production remains faulty. Producers know that this  
197 maneuver is insufficient and egg production remains unpredictable at best (Clunies *et al.*,  
198 1992 and Castillo *et al.*, 2004). In this sense, our study confirms that F of calcium carbonate  
199 in birds supplemented with 2.2% calcium carbonate is insufficient to meet the demands for

200 calcium (F = 110.1 %). Other sources of calcium show greater F, i.e., calcium phosphate  
201 113.4 %; calcium lactate-gluconate 121.4 %, and calcium carbonate + CO<sub>r</sub> 121.3 %. In  
202 conditions of greater metabolic challenge, such as caloric stress, the presence of hard water or  
203 phytates in the elements of the diet or due to the physiological peculiarities of some hen  
204 lineages (González *et al.*, 2002), calcium F will decrease and with it, the shell quality (Taylor  
205 *et al.*, 2018, Manangi *et al.*, 2018 and Brugère *et al.*, 2015). Therefore, it is clear that it is  
206 necessary to study ways to improve the F of calcium. For example by adapting specific  
207 pharmaceutical designs. In this sense, capsaicinoids found in CO<sub>r</sub> are a group of compounds  
208 responsible for the pungent taste of *Capsicum* species (*Capsicum annuum* and *Capsicum*  
209 *frutescens*). The most relevant active substances are capsaicin and dihydrocapsaicin, which  
210 represent 80 to 90% of the CO<sub>r</sub>. The ratio of capsaicin to dihydrocapsaicin is generally around  
211 1:1 and contains small amounts of nordihydrocapsaicin, homocapsaicin,  
212 homodihydrocapsaicin, norcapsaicin, normoncapsaicin, dihydrocapsaicin,  
213 homohydrocapsaicin, and nonivamide (Govindarajan and Sathyanarayana, 1991). *Capsicum*  
214 oleoresin has been shown to increase, depending on the concentration, the amount of divalent  
215 and monovalent ions entering cells containing the VR1 receptor (vanilloid receptor), such as  
216 the ones from the intestinal epithelium. Also, when administered orally, it promotes the F of  
217 some drugs, such as enrofloxacin in birds (Gutierrez *et al.*, 2017) and fexofenadine in rats  
218 (Bedada *et al.*, 2017). However, the precise molecular mechanism to achieve this is still  
219 unknown. It has been postulated that capsaicin molecules activate the secretion of substance P  
220 from nearby nerve terminals, so the molecules are inserted into the double lipid layer of cell  
221 membranes by modifying the selective permeability of ion channels (O'Connor *et al.*, 2004);  
222 also, there is a blockage of the P-glycoprotein-mediated expulsion pumps at the membrane  
223 level of intestinal epithelial cells (Gutierrez *et al.*, 2017a). Likewise, it is known that it  
224 activates anandamide receptors at the intestinal level by increasing blood glucose F (Troy-

225 Fioramonti *et al.*, 2015). On the other hand, it has been found that CO<sub>r</sub> has antibacterial  
226 activity and decreases the fecal release of salmonella, so it is considered a non-antibiotic  
227 growth-promoter, when it is included in the diet at a rate of 0.2%. The impact of this study  
228 can be immediate if the fact that CO<sub>r</sub> is already used regularly as a pigment for the yolk in the  
229 poultry industry (Huaqiang, 2012). However, the dose-response relationship to enhance  
230 calcium F remains to be determined, as it does the pharmaceutical form in which its effect  
231 may be greater, since there are different pharmaceutical forms of capsicum and capsaicinoids  
232 (Thiele, 2008).

233 As in other species (rats and humans), F obtained in hens for calcium carbonate was only <20  
234 %. Such a low F can be explained in terms of the low aqueous solubility of this source of  
235 calcium as only a dissolved fraction of calcium is available for absorption. In contrast,  
236 calcium lactate-gluconate is the source of calcium with the highest solubility, favoring its F  
237 which becomes greater than 60 %. However, this calcium source contains only 12% calcium  
238 and consequently large amounts would be required to meet the calcium demand of hens  
239 during the second cycle of egg-production. If administered through drinking water, an  
240 adequate dose would be not only economically unviable, but unachievable. In contrast, this  
241 study shows that the addition of CO<sub>r</sub> (approximately at a rate of 10 ppm or 10 µg/bird),  
242 generates an important increase in calcium F (121.3 %).

243  
244 The fact that the particle size of the calcium source also has a direct relationship with the GI  
245 transit time and, consequently, with the dissolution/absorption time of this site should not be  
246 omitted. Relatively large particles (> 0.5 cm) show the longest permanence in the GI and  
247 remain available for absorption up to 12 h (Rennie *et al.*, 1997). Therefore, calcium carbonate  
248 is usually added to the hen's diet in a proportion of coarse granules with a diameter of 2 to 4  
249 mm, mixed with finer ones (Valkonen *et al.*, 2010 and Ren *et al.*, 2019). Considering that a

250 better F has already been achieved for doxycycline (Gutiérrez *et al.*, 2017) and tylosin  
251 (Gutiérrez *et al.*, 2017a) in poultry with pellet-type pharmaceutical forms of controlled  
252 dissolution, it is postulated here that similar prototypes containing calcium carbonate and CO<sub>2</sub>  
253 can be formulated to improve calcium F and thus satisfy the demand for this ion in second  
254 cycle egg-producing hens.

255

### 256 **Conclusions and application.**

257 The improvement of calcium bioavailability induced by capsicum oleoresin on calcium  
258 carbonate, can contribute to improve the quality of the egg-shells produced by second laying  
259 cycle hens.

260

### 261 **Conflict of interest**

262 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or  
263 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

264

### 265 **Acknowledgments**

266 The authors are grateful for the support given to the PAPIIT-UNAM IT200419 project to  
267 carry out this research.

268

### 269 **References**

270 Akbari M, K.R, T. Heuthorst A. Mills, and M. E. Neijatkiarie. 2019. Interactive effects of  
271 calcium and top-dressed 25-hydroxy vitamin D<sub>3</sub> on egg production, egg shell quality, and  
272 bones attributes in aged Lohmann LSL-lite layers1. *Poult. Sci.* 98:1254-1262. doi:  
273 10.3382/ps/pey446.



- 274 Bedada, S., P. K, Appani K. R and P.K. Boga. 2017. Capsaicin pretreatment enhanced the  
275 bioavailability of fexofenadine in rats by P-glycoprotein modulation: *in vitro*, *in situ* and *in*  
276 *vivo* evaluation. Drug Dev. Ind. Pharm. 43:932-938.  
277 <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1285310>
- 278 Bovans white guide. Commercial management. Accessed January 2020,  
279 [www.bovans.com/en/product/bovans-white/](http://www.bovans.com/en/product/bovans-white/)
- 280 Bohn, A. Laboratory evaluation of electrolytes. In: Thrall MA, Weiser G, Allison R,  
281 Campbell TW, editors. Veterinary hematology and clinical chemistry. 2nd Ed. Ames (IA):  
282 Wiley.2012 p. 378–392.
- 283 Brugère, P., J.P. Vaillancourt, M. Bouzouaia, H.L. Shivaprasad, and D.Venne. 2015 Manual  
284 of Poultry Diseases. Ed. 6<sup>th</sup> México D.F. Blood biochemistry of birds. AFAS. 11:81-85.
- 285 Castillo, C., M. Cuca, A. Pro, M. González, and E. Morales. 2004. Biological and Economic  
286 Optimum Level of Calcium in White Leghorn Laying Hens. Poult. Sci. 83:868–872.  
287 DOI:10.1093/ps/83.6.868
- 288 Clunies, M., D. Parks, S, and Leeso N.1992. Calcium and phosphorus metabolism and  
289 eggshell formation of hens fed different amounts of calcium. Poult. Sci. 71:482-489.  
290 DOI:10.3382/ps.0710482
- 291 Cook, M.E. 2017. Sturkie's Avian Physiology. J. Wildl. Dis. 53:703-705. DOI:  
292 10.7589/0090-3558.53.3.703
- 293 Dibner, J., M. Kitchell, C. Atwell, and F. Ivey. 1996. The effect of dietary ingredients and age  
294 on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. JAPAR. 5:70-77. DOI:  
295 10.1093/japr/5.1.70

- 296 El-Deek, A. A., M. A. Al-Harhi, M. Osman, F. Al-Jassas, and R Nassar. 2012. Hot pepper  
297 (*Capsicum Annum*) as an alternative to oxytetracycline in broiler diets and effects on  
298 productive traits, meat quality, immunological responses and plasma lipids. Eur. Poultry Sci.  
299 76:73-80.
- 300 FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) 2018.  
301 Accessed December, 2019, <http://faostat.fao.org/>
- 302 Franco-Jiménez, D. J., and M. Beck. 2005. Intestinal calcium uptake, shell quality and  
303 reproductive hormones levels of three laying hen varieties after prolonged egg production.  
304 International J. Poul. Sci. 4:518-522. DOI:10.3923/ijps.2005.518.522
- 305 González, M. V., R. M. López, and E. Á González. 2002. Efecto de la adición de fitasa como  
306 fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. Rev. Mex. Cienc. Pecu.  
307 40:181-186.
- 308 Gordon, A. L. C., B. F. Martínez, A. C. Cuevas, and E. González. 2009. Nivel óptimo de  
309 lisina digestible en dietas para gallinas de postura de primer ciclo. Tec. Pecu. Mex. 47:215-  
310 222.
- 311 Govindarajan, V.S., and M. N. Sathyanarayana. 1991. Capsicum-production, technology,  
312 chemistry, and quality. Part V. Impact on Physiology, Pharmacology, Nutrition, and  
313 Metabolism; Structure, Pungency, Pain, and Desensitization Sequences. Crit. Rev. Food Sci.  
314 Nutr. 29:435-473. DOI: 10.1080/10408399109527536
- 315 Güçlü, K. B., M. K. İşcan. 2004. Farklı düzeylerde kalsiyum içeren yumurta tavuğu  
316 rasyonuna eggshell-49 ilavesinin performans, yumurta kalitesi ve bazı kan parametrelerine  
317 etkisi. Ankara Univ. Vet. Fak. 50:219-224. DOI:10.150/Vetfak\_0000000009

- 318 Gutiérrez, L., J. Zermeño, Y. Alcalá, and H. Sumano. 2017. Higher bioavailability of  
319 doxycycline in broiler chickens with a novel in-feed pharmaceutical formulation. *Poult. Sci.*  
320 96:2662-2669. DOI:10.3382/ps/pex036
- 321 Gutiérrez, L., Y. Alcalá, M. J. Bernad, and H. Sumano. 2017<sup>a</sup>. Increased bioavailability of  
322 tylosin phosphate as in-feed medication formulated for long-action pellets in broiler chickens.  
323 *JAPR*. 27:16-22. DOI: 10.3382/japr/pfx035
- 324 Hafeez, A., A. Mader, I. Ruhnke, I. Röhe, F. Goodarzi BoroojenI, M. S. Yousaf, K. Männer,  
325 and J. Zentek. 2015. Implication of milling methods, thermal treatment, and particle size of  
326 feed in layers on mineral digestibility and retention of minerals in egg contents. *Poult. Sci.*  
327 94:240–248. DOI: 10.3382/ps/peu070
- 328 Hamdi, M., D. Solà-Oriol, R. Davin, and J. F. Pérez. 2015. Calcium sources and their  
329 interaction with the different levels of non-phytate phosphorus affect performance and bone  
330 mineralization in broiler chickens. *Poult. Sci.* 94:2136–2143. DOI: 10.3382/ps/peu061
- 331 Harrison, G. J., and D. Mc Donald. 2006. Nutritional considerations section II. *Clinical avian*  
332 *medicine*. 1: 108-140.
- 333 Hernández, J., M. Cuca-García, A. Pró-Martínez, M. González-Alcorta, and C. Becerril-  
334 Pérez. 2006 Nivel óptimo biológico y económico de calcio en gallinas Leghorn blancas de  
335 segundo ciclo de postura. *Agrociencia*. 40:49-57.
- 336 Herrera, J., B. Saldaña, L. Cámara, J. D. Berrocoso G. and G. Mateos. 2018. Influence of  
337 grinding size of the main cereal of the diet on egg production and eggs quality of brown egg  
338 laying hens from 33 to 65 weeks of age. *Poult. Sci.* 97:2506–2515. DOI: 10.3382/ps/pey098
- 339 Huaqiang L, J, Liji, W, Feifei, P, Thacker, L, Xiaoyu, Y, Jiansong W, Xiaoyan. L, Sizhao,  
340 L, Shuying, and X, Yongping. 2012. Effect of Red Pepper (*Capsicum frutescens*) Powder or

- 341 Red Pepper Pigment on the Performance and Egg Yolk Color of Laying Hens. *AJAS*.  
342 25:1605–1610. DOI: 10.5713/ajas.2012.12235
- 343 Keshavarz, K. 1994. Laying Hens Respond Differently to High Dietary Levels of Phosphorus  
344 in Monobasic and Dibasic Calcium Phosphate. *Poult. Sci.* 73:687–703.  
345 DOI:10.3382/ps.0730687
- 346 Li, X. L., W. He, M. Yang, Y. Yan, Y. Xue, and S. Zhao. 2017 “Effect of dietary  
347 supplementation of *Ligustrum lucidum* on performance, egg quality and blood biochemical  
348 parameters of Hy-Line Brown hens during the late laying period”. *Animal*. 11:1899-1904.  
349 DOI: 10.1017/S1751731117000532
- 350 Lichovnikova, M. 2007 The effect of dietary calcium source, concentration and particle size  
351 on calcium retention, eggshell quality and overall calcium requirement in laying hens. *Br.*  
352 *Poult. Sci.* 48:71-75. DOI: 10.1080/00071660601148203
- 353 Lordelo, M., E. Fernandes, R. J. Bessa, and Alves S. P. 2016. Quality of eggs from different  
354 laying hen production systems, from indigenous breeds and specialty eggs. *Poult. Sci.*  
355 96:1485-1491. DOI: 10.3382/ps/pew409
- 356 Manangi, M. K., P. Maharjan, and C.N, Coon. 2018 Calcium particle size effects on plasma,  
357 excreta, and urinary Ca and P changes in broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 97:2798-2806. DOI:  
358 10.3382/ps/pey043
- 359 NOM-062-ZOO-1999 Mexican Official Standard. Technical Specifications for the  
360 Production, Care and Use of Laboratory Animals. United Mexican States Department of  
361 Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food (1999). Available online at:  
362 [www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO)

- 363 Novak, C. S., and E. Scheideler. 2001. Long-term effects of feeding flaxseed-based diets. 1.  
364 Egg production parameters, components, and eggshell quality in two strains of laying hens.  
365 Poul. Sci. 80:1480-1489. DOI: 10.1093/ps/80.10.1480
- 366 O'Connor, T. M., J. O'Connell, D. I. O'Brien, T. Goode, C. P. Bredin, and F. Shanahan. 2004.  
367 The role of substance P in inflammatory disease J. Cell. Physiol. 201:167-180. DOI:  
368 10.1002/jcp20061.
- 369 Preda, C., C. Budica, and N. Dojana. 2014. Effect of Various Levels of Dietary Calcium on  
370 Blood Calcium Concentration and Hormonal Status in White Cornish and White Leghorn  
371 Hens. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca.  
372 Vet. Med. 71:182-186. DOI: 10.158357buasvmcn-vm:71:1:9232
- 373 Purgstaller, B., K.E. Goetsch, V. Mavromatis and M. Dietze. 2019. Solubility investigations  
374 in the amorphous calcium magnesium carbonate system. Crystengcomm. 21:155-164. DOI:  
375 10.1039/C8CE01596A
- 376 Ren, Z.S., L. Wenqiang, L. Yanli, H. Di Zhipeng, C. Xi, Y. Jiakun and Y. Xiaojun. 2019.  
377 Dynamics of serum phosphorus, calcium, and hormones during egg laying cycle in Hy-Line  
378 Brown laying hens. Poul. Sci. 98:2195-2200. DOI: 10.3382/ps/pey572
- 379 Rennie, J.S., R.H. Fleming, H.A. McCormack, C.C. McCorquodale. 1997. Whitehead.  
380 Studies on effects of nutritional factors on bone structure and osteoporosis in laying hens. Br.  
381 Poul. Sci. 38:417-424. DOI: 10.1080/00071669708418012.
- 382 Rodríguez, J.H.V., M.V.V. Pinargote, and J.O.M Cedeño. 2012. Adición de carbonato cálcico  
383 y su repercusión económica sobre el grosor del cascarón en ponedoras. Rev. Espamciencia.  
384 3:1-7.

- 385 Rodríguez, J.H.V., G.A.H Bravo. 2019. El Efecto de diferentes niveles de suministro de  
386 carbonato de calcio sobre el peso y grosor de la cascara del huevo. *Rev. Colombiana Cienc.*  
387 *Anim. Recia.* 11:719. DOI: 10.24188/recia.v11.n2.2019.719
- 388 Taylor, A., E. Bedford, M. Pace, and H Miller. 2018. The effects of phytase and xylanase  
389 supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br. Poult. Sci.* 59:554-561.  
390 DOI: 10.1080/00071668.2018.1483575
- 391 Thiele, R., E.Mueller-Seitz, M. Petz. 2008 Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty  
392 acids characteristic for capsaicinoids. *J.Agric. Food Chem.* 56:4219–4224. DOI:  
393 10.1021/jf73420h
- 394 Troy-Fioramonti, S., L. Demizieux, J. Gresti, T. Muller, B.Vergès, and P. Degrace. Acute  
395 activation of cannabinoid receptors by anandamide reduces gastrointestinal motility and  
396 improves postprandial glycemia in mice. *Diabetes.* 64:808-818. DOI: 10.2337/db14-0721
- 397 UNA (Unión Nacional de Avicultores).Compendio de indicadores económicos del sector  
398 avícola. México. 2017-18. UNA (Unión Nacional de Avicultores). 2017-18. Compendio de  
399 indicadores económicos del sector avícola. México. [https://www.una.org.mx/compendio-de-](https://www.una.org.mx/compendio-de-indicadores-economicos-2018/)  
400 [indicadores-economicos-2018/](https://www.una.org.mx/compendio-de-indicadores-economicos-2018/) Accessed on January 2020
- 401 Vera-Rodríguez JH, and BGA Hidalgo. 2019. Efecto de diferentes niveles de suministro de  
402 carbonato de calcio sobre el peso y grosor de la cascara de huevo. *Rev. Colombiana Cienc.*  
403 *Anim.* 11:12 DOI: 1.24188/recia.v11n2.2019.719
- 404 Valkonen, E., E.Venäläinen, L. Rossow, J. Valaja. 2010 Effects of calcium diet supplements  
405 on egg strength in conventional and furnished cages, and effects of 2 different nest floor  
406 materials. *Poult. Sci.* 89:2307–2316. DOI: 10.3382/ps.2010-00700

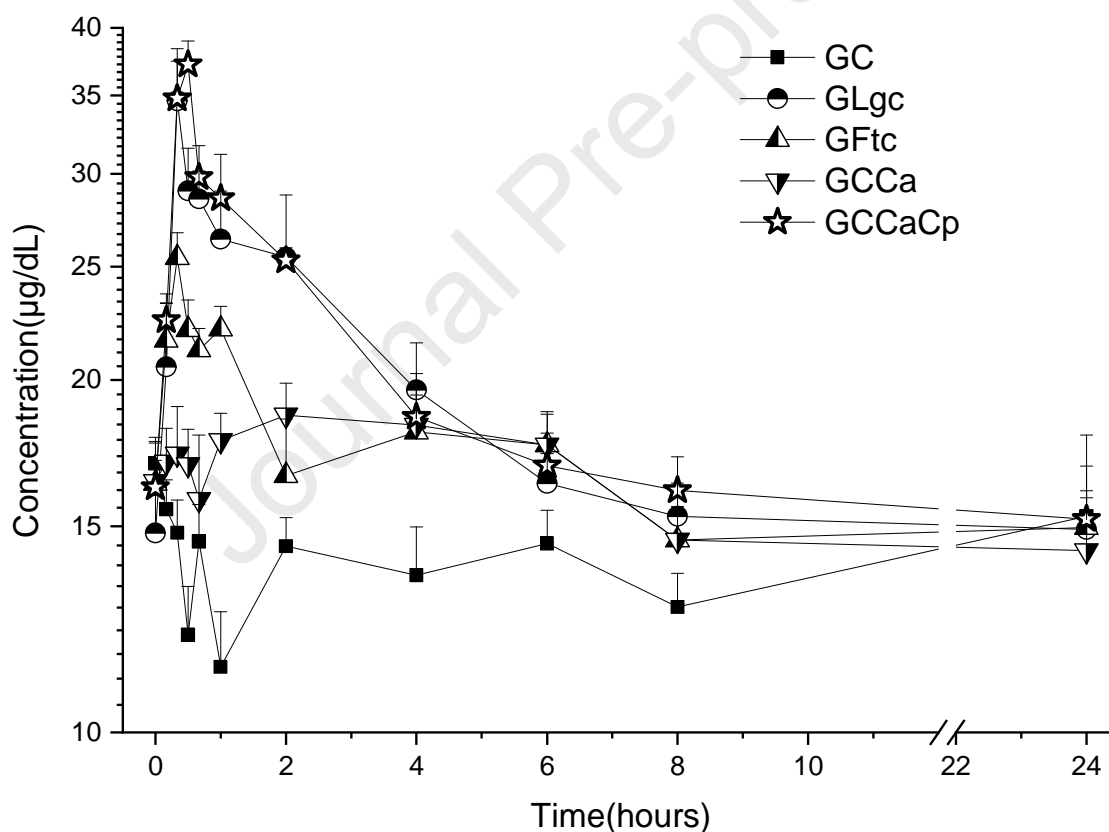
407 Vijay, K., and D. Kiran. Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide Springe.  
 408 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8186-6>

409 Wistedt, A., Y. Ridderstråle, H. Wall, and L. Holm. 2019. Age-related changes in the shell  
 410 gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen  
 411 hybrids. Acta Vet. Scand. 61(1):1-14. DOI: 10.1186/s13028-019-0449-1

412

413 **Figures**

414



415

416 Figure 1. Calcium serum profiles achieved with four calcium sources administered orally in  
 417 Bovans-White hens and a control group without supplementation: GCca group: calcium  
 418 carbonate; GFtc group: tricalcium phosphate; GLgc group 3: calcium lactate-gluconate;  
 419 GCcaCp group: calcium carbonate plus 100 µg/mL of capsicum oleorresin \*. Dose adjusted to  
 420 1 g/calcium/bird.

421

422 **Tables**423 **Table 1. Calculated composition and nutrient content of the diet**

<b>Ingredients (kg)</b>	
Corn	596.170
Soy flour 48%	267.498
Small-grained calcium carbonate	40.388
Large-grained calcium carbonate	60.582
Soy oil	12.506
Orthophosphate 18:20	10.605
Salt	4.072
Vitamin and mineral premix	3.00
Mycotoxin Sequestrant	2.00
DL-methionine 99%	1.971
Larvadex	0.500
L-lysine HCl	0.328
Antioxidants	0.150
Ronozyme phytase (GT)	0.100
Yellow pigment	0.090
Red pigment	0.040
Total	1000
Calculated Analysis (g/kg)	
Metabolizable Energy (Kcal/kg)	2859
Crude protein %	18.792
Total Calcium %	4.100
Available phosphorus %	0.450
Methionine + Cysteine %	0.800
Lysine %	0.980
Tryptophan %	0.220
Sodium %	0.180

424 <sup>1</sup>Amount/kg: Retinol 0.9 g, cholecalciferol 0.019 g, d-alphatocopherol 10.004 g, phylloquinone 1.0  
425 g, riboflavin 4.0 g, cyanocobalamin 0.060 g, pyridoxine 3.0 g, calcium pantothenate 13.0 g, niacin 25  
426 g, biotin 0.063 g, choline chloride 250 g. <sup>2</sup>Quantity / kg: 0.2 g of selenium, 0.1 g of cobalt, 0.3 g of  
427 iodine, 10 g of copper, 50 g of zinc, 100 g of iron, 100 g of manganese.

428

429

430

431



432  
433  
434  
435  
436  
437  
438

**Table 2**

**Dosage of three different sources of calcium in four experimental groups: GCca Group: calcium carbonate; GFtc Group: tricalcium phosphate; GLgc Group 3: calcium lactate-gluconate; GCcaCp group: calcium carbonate plus 10 µg of capsicum oleoresin. All adjusted to administer 1 g/calcium/bird**

Calcium source	Chemical formula	Calcium amount / g of Ca source	Amount of Ca source added to the suspension (g/mL)	Calcium concentration g/mL
<b>GCca</b>	CaCO <sub>3</sub>	1.16 ± 0.2	3.00	0.386
<b>GFtc</b>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.07 ± 0.2	143.00	0.007
<b>GLgc</b>	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> CaO <sub>10</sub>	1.00 ± 0.1	3.00	0.333
<b>GCcaCp</b>	CaCO <sub>3</sub>	1.05 ± 0.1	3.06	0.350

439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461

**Table 3**

462 **Kinetic variables achieved for Calcium from four different sources, administered orally in**  
 463 **Bovans-White hens and a control group without supplementation: GCca Group: calcium**  
 464 **carbonate; GFtc Group: tricalcium phosphate; GLgc Group 3: calcium lactate-gluconate;**  
 465 **GCcaCp group: calcium carbonate plus 10 µg of capsicum oleoresin. All adjusted to administer**  
 466 **1 g/calcium/bird**  
 467  
 468

<b>Group</b>	<b>T<sub>MAX</sub> (h)</b>	<b>C<sub>MAX</sub> (µg/dL)</b>	<b>AUC<sub>0-24</sub> (µg/dL/h<sup>-1</sup>)</b>	<b>F<sub>R</sub> (%) vs GCca</b>
<b>GC</b>	-	-	335.2 ± 8.6 <sup>c</sup>	-
<b>GCca</b>	2 ± 0.3 <sup>a</sup>	20.0 ± 1.6 <sup>c</sup>	371.3 ± 9.3 <sup>b</sup>	100
<b>GCcaCp</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	37.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	419.1 ± 8.4 <sup>a</sup>	112.9
<b>GFtc</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	25.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	380.2 ± 8.8 <sup>d</sup>	102.4
<b>GLgc</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	34.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	407.1 ± 7.9 <sup>a</sup>	109.6

469 <sup>a,b,c,d</sup> Different literals between columns correspond to statistically significant differences (P < 0.05).

470 C<sub>MAX</sub> = maximum serum concentration; T<sub>MAX</sub> = time to achieve C<sub>MAX</sub>; AUC<sub>0-24</sub> = area under the  
 471 serum concentration curve of Ca vs. time; 100% relative calcium bioavailability of the control group  
 472 not supplemented with additional calcium.

473

474

475

476

1 **Tables**2 **Table 1. Calculated composition and nutrient content of the diet**

<b>Ingredients (kg)</b>	
Corn	596.170
Soy flour 48%	267.498
Small-grained calcium carbonate	40.388
Large-grained calcium carbonate	60.582
Soy oil	12.506
Orthophosphate 18:20	10.605
Salt	4.072
Vitamin and mineral premix	3.00
Mycotoxin Sequestrant	2.00
DL-methionine 99%	1.971
Larvadex	0.500
L-lysine HCl	0.328
Antioxidants	0.150
Ronozyme phytase (GT)	0.100
Yellow pigment	0.090
Red pigment	0.040
Total	1000
Calculated Analysis (g/kg)	
Metabolizable Energy (Kcal/kg)	2859
Crude protein %	18.792
Total Calcium %	4.100
Available phosphorus %	0.450
Methionine + Cysteine %	0.800
Lysine %	0.980
Tryptophan %	0.220
Sodium %	0.180

3 <sup>1</sup>Amount/kg: Retinol 0.9 g, cholecalciferol 0.019 g, d-alphatocopherol 10.004 g, phylloquinone 1.0  
4 g, riboflavin 4.0 g, cyanocobalamin 0.060 g, pyridoxine 3.0 g, calcium pantothenate 13.0 g, niacin 25  
5 g, biotin 0.063 g, choline chloride 250 g. <sup>2</sup>Quantity / kg: 0.2 g of selenium, 0.1 g of cobalt, 0.3 g of  
6 iodine, 10 g of copper, 50 g of zinc, 100 g of iron, 100 g of manganese.

7  
8  
9  
10

11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

**Table 2**

**Dosage of three different sources of calcium in four experimental groups: GCca Group: calcium carbonate; GFtc Group: tricalcium phosphate; GLgc Group 3: calcium lactate-gluconate; GCcaCp group: calcium carbonate plus 10 µg of capsicum oleoresin. All adjusted to administer 1 g/calcium/bird**

Calcium source	Chemical formula	Calcium amount / g of Ca source	Amount of Ca source added to the suspension (g/mL)	Calcium concentration g/mL
<b>GCca</b>	CaCO <sub>3</sub>	1.16 ± 0.2	3.00	0.386
<b>GFtc</b>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.07 ± 0.2	143.00	0.007
<b>GLgc</b>	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> CaO <sub>10</sub>	1.00 ± 0.1	3.00	0.333
<b>GCcaCp</b>	CaCO <sub>3</sub>	1.05 ± 0.1	3.06	0.350

41 **Table 3**  
 42 **Kinetic variables achieved for Calcium from four different sources, administered orally in**  
 43 **Bovans-White hens and a control group without supplementation: GCca Group: calcium**  
 44 **carbonate; GFtc Group: tricalcium phosphate; GLgc Group 3: calcium lactate-gluconate;**  
 45 **GCcaCp group: calcium carbonate plus 10 µg of capsicum oleoresin. All adjusted to administer**  
 46 **1 g/calcium/bird**

Group	T <sub>MAX</sub> (h)	C <sub>MAX</sub> (µg/dL)	AUC <sub>0-24</sub> (µg/dL/h <sup>-1</sup> )	F <sub>R</sub> (%) vs GCca
<b>GC</b>	-	-	335.2 ± 8.6 <sup>c</sup>	-
<b>GCca</b>	2 ± 0.3 <sup>a</sup>	20.0 ± 1.6 <sup>c</sup>	371.3 ± 9.3 <sup>b</sup>	100
<b>GCcaCp</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	37.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	419.1 ± 8.4 <sup>a</sup>	112.9
<b>GFtc</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	25.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	380.2 ± 8.8 <sup>d</sup>	102.4
<b>GLgc</b>	0.33 ± 0.1 <sup>b</sup>	34.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	407.1 ± 7.9 <sup>a</sup>	109.6

49 <sup>a,b,c,d</sup> Different literals between columns correspond to statistically significant differences (P< 0.05).  
 50 C<sub>MAX</sub> = maximum serum concentration; T<sub>MAX</sub> = time to achieve C<sub>MAX</sub>; AUC0-24 = area under the  
 51 serum concentration curve of Ca vs. time; 100% relative calcium bioavailability of the control group  
 52 not supplemented with additional calcium.

53  
 54  
 55  
 56  
 57

Figure

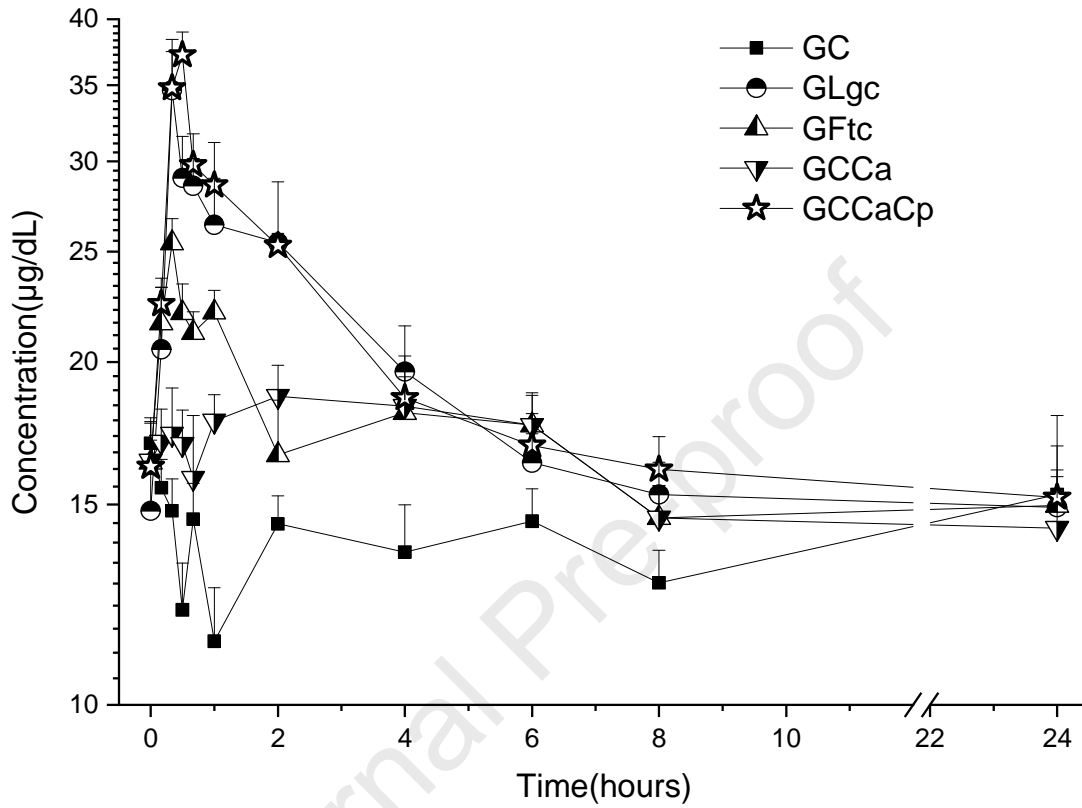


Figure 1. Calcium serum profiles achieved with four calcium sources administered orally in Bovans-White hens and a control group without supplementation: GCca group: calcium carbonate; GFtc group: tricalcium phosphate; GLgc group 3: calcium lactate-gluconate; GCcaCp group: calcium carbonate plus 100 µg/mL of capsicum oleoresin \*. Dose adjusted to 1 g/calcium/bird.