PREMEZCLA DE PIGMENTOS NATURALES A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra en el campo de la agroindustria, específicamente en premezclas de pigmentos para concentrados animales con propiedades para pigmentar la yema de huevo, los tegumentos y la grasa subcutánea de aves de corral, así como la carne y tegumentos de pescado y crustáceos.

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Las aves de corral, pescado y crustáceos son usados como un recurso alimenticio por el ser humano desde la antigüedad. Su popularidad se debe a su alto valor nutricional ya que son ricos en proteínas, vitaminas y minerales, ácidos grasos saturados e insaturados, junto con otras sustancias como la luteína y la colina. Muchos estudios han permitido concluir que la carne de aves de corral, pescado y crustáceos, además de algunos subproductos de estos animales como los huevos de las aves de corral, suplen los requerimientos de un alimento funcional. Es por esta razón que estos productos representan una ventaja adicional para la salud humana debido a la capacidad que tienen esos animales de almacenar compuestos bioactivos en formas altamente disponibles, como se ha demostrado, por ejemplo las ventajas de la suplementación con selenio en dietas para reproductoras y pollos de engorde, con los subsecuentes efectos benéficos sobre la salud humana del selenio.

El aumento del valor nutricional de estos alimentos se logra a través de la dieta suministrada a los animales, para lo cual se adicionan a los concentrados premezclas caracterizadas por dar un aporte nutricional a los animales, pues se ha demostrado por ejemplo, que la incorporación de antioxidantes en su alimentación, no solo aumenta el contenido de estas sustancias en los productos derivados, sino que también mejoran considerablemente la salud animal (Surai & Sparks, 2001).

Los carotenoides son ingredientes esenciales en la alimentación animal, tanto por su función pigmentaria como por su papel en la promoción de la salud, ya que presentan propiedades antioxidantes y son precursores de la vitamina A. Se ha demostrado la presencia de carotenoides como luteína y zeaxantina en la yema de huevo (Ribaya Mercado JD, 2004), además se ha podido establecer que a pesar de que su contenido es inferior al de algunas fuentes de origen vegetal, la biodisponibilidad es superior. De esta manera la presencia de sustancias bioactivas en la carne de aves de corral, pescado y crustáceos y del huevo dependen exclusivamente de la dieta suministrada al animal, generando no solo la aceptación sensorial en el consumidor por el color que se percibe en la carne y yema de huevo, sino también efectos biológicos que mejoran considerablemente la salud del animal (Chung, Rasmussen, & Johnson, 2004).

El documento US20090214696A1 describe huevos que contienen licopeno y un método para la producción de los mismos que consiste en alimentar aves de corral con concentrados animales suplementados con una cantidad efectiva de licopeno que se deposita en la yema de huevo. Adicionalmente se describe métodos para incorporar los huevos enriquecidos con licopeno en una dieta humana. El huevo de acuerdo con el documento comprende licopeno en una cantidad entre 0,005-0,5 mg/g de yema de huevo. Las fuentes del licopeno empleadas pueden purificarse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, tomates, aceite de palma rojo, sandía, papaya, pomelo rosa y guayaba rosa) o fabricarse sintéticamente. El licopeno también puede obtenerse comercialmente. En una modalidad se emplean tomates rojos como fuente de licopeno. El licopeno se suministró en forma de polvo al 5% unido a una molécula de gelatina, para que el licopeno se absorba de esta fuente, se utilizó agua (60°C) con el objetivo de dispersar el licopeno antes de la adición a la dieta animal (Koutsos & Olson, 2006).

Por otro lado el documento US7056525B2 divulga una formulación de carotenoides en forma de una suspensión que comprende entre 5 a 35% en peso de una mezcla de β-caroteno, licopeno y luteína. La relación en peso de la mezcla es 1 parte de β-caroteno, entre 0,05 a 20 partes de licopeno y entre 0,05 a 20 partes de luteína. Adicionalmente la formulación contiene fósforo entre 0,01% a 2,0% del peso total de la mezcla de β-caroteno, licopeno y luteína. De acuerdo con el documento, el β-caroteno y el licopeno se obtienen sintéticamente. La formulación contiene adicionalmente un coloide protector seleccionado del grupo que consiste en gelatina, gelatina de pescado, almidón, dextrina, proteínas vegetales, pectina, goma arábiga, caseína, caseinato, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y alginatos. La formulación obtenida puede ser empleada como un suplemento alimenticio, un alimento para animales, un producto alimenticio humano o una composición farmacéutica o cosmética.

El documento US5605699A divulga una composición alimenticia para animales (premezcla) que comprende una matriz convencional para consumo en alimentación animal, un antioxidante y uno o más carotenoides y se caracteriza por un contenido de carotenoides totales entre 0,1 a 150 miligramos de carotenoide o carotenoides por kilogramo de alimento concentrado (mg/kg). Preferiblemente para pigmentar partes o productos de aves de corral se emplea una composición con un contenido de carotenoides totales entre 0,25 a 20 miligramos de carotenoides por kilogramo de alimento (mg/kg). La formulación es especialmente útil para la pigmentación de las yemas de los huevos de gallinas ponedoras, y la pigmentación de pollos de engorde y para la pigmentación de pescado o crustáceos, en particular su carne y tejidos (piel, escamas y conchas, según corresponda). El contenido de carotenoides preferido de la premezcla es de 0,001% a 15% en peso.

Aun cuando hay un número relativamente grande de composiciones empleadas para mejorar las propiedades organolépticas de aves de corral, pescado y crustáceos usados como recurso alimenticio por el ser humano, éstas se elaboran adicionando entre otras, premezclas de

pigmentos artificiales que podrían ser tóxicos y provocar enfermedades como alergias, crisis de asma, migrañas, problemas de visión, desarreglos en el comportamiento y ansiedad. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas formulaciones de premezcla de pigmentos para concentrados animales que aporten un valor nutricional adicional, provengan de fuentes naturales y aumenten la biodisponibilidad de los carotenoides en el producto final.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a formulaciones de premezcla de pigmentos naturales para concentrados animales a partir de residuos agroindustriales que comprende: lechuga (*Lactuca sativa*), tomate (*Lycopersicum esculentum*), repollo (*Brassicaoleracea L.*), pimentón (*Capsicum annuum*), zanahoria (*Daucus carota*) y mezclas de los mismos. Las formulaciones de la invención se caracterizan por un porcentaje de humedad entre 10 a 14% y un aporte de carotenoides entre 8,5 a 9,8g de carotenoides/Kg de premezcla. Las formulaciones son adicionadas a un concentrado de aves de corral, pescado o crustáceos para pigmentar la yema de huevo, los tegumentos y la grasa subcutánea de aves de corral, así como la carne y tegumentos de pescado y crustáceos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Perfiles cromatográficos de los componentes de la premezcla.

FIG. 2 Diferencia de color entre las yemas de los 6 tratamientos empleados en el ensayo biológico.

FIG. 3 Valores de la Escala de Roche de las yemas de los 6 tratamientos empleados en el ensayo biológico.

FIG. 4 Peso promedio en gramos de los huevos de los 6 tratamientos registrado durante el ensayo biológico.

FIG. 5 Grosor de las cáscaras de los huevos de los 6 tratamientos registrado durante el ensayo biológico.

FIG. 6 Índice Morfológico en porcentaje de los huevos de los 6 tratamientos registrado durante el ensayo biológico.

FIG. 7 Capacidad Antioxidante (ORAC) en las yemas de los 6 tratamientos estudiados en el ensayo biológico.

FIG. 8 Capacidad Antioxidante (ORAC) en piel, músculo, sangre de las gallinas y yema de los huevos en la última semana ensayo biológico.

FIG. 9. Contenido de carotenos totales en las yemas de los 6 tratamientos estudiados en el ensayo biológico.

FIG. 10. Contenido de carotenos totales en piel, músculo, sangre de las gallinas y yema en la última semana ensayo biológico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En los últimos años el consumo y comercialización de frutas y verduras se ha venido incrementando debido a sus atractivas propiedades sensoriales y al reconocimiento de su valor nutricional. Sin embargo dichas actividades de comercialización y transformación de frutas y vegetales generan gran cantidad de residuos y excedentes poscosecha y de transformación que constituyen un problema debido a su facilidad de descomposición, representando un problema de salud pública para los centros de distribución, incrementando también los costos de disposición de los mismos. Usualmente estos desechos son empleados como fertilizantes o simplemente se convierten en focos de contaminación para las fuentes de agua, los mismos cultivos o peor aún son un problema de salud pública en centros de abastecimiento urbanos, en donde su disposición final genera costos cada vez más insostenibles.

Estos residuos y excedentes poscosecha representan una oportunidad única para explorar su potencial y uso en la extracción de fitoquímicos para ser usados en suplementos nutracéuticos, aditivos dietarios, alimentos y productos farmacéuticos y de esta manera disminuir su impacto en el medio ambiente. Por ejemplo, es una práctica común en la avicultura que los productores de huevos y carnes incorporen pigmentos sintéticos a los concentrados para mejorar el color del producto final (Hernández Gimeno, 2003), como es el caso de la yema del huevo, sin embargo estos pigmentos sintéticos no aportan ningún beneficio nutricional. Los residuos agroindustriales representan una materia prima para la producción de pigmentos naturales con un valor nutricional agregado y que logran el mismo efecto de pigmentación que las premezclas de pigmentos artificiales empleadas tradicionalmente.

Es de conocimiento general que vegetales y frutas como: lechuga, repollo, tomate, espinaca, acelgas, albaricoque, naranja, mango, nabo, zanahoria, pimentón, espinaca, coles de bruselas, brócoli, calabaza, cebolla, piña, plátano, uva, berenjena, melón, sandía, pera, maíz y trigo se caracterizan por presentar un alto contenido de sustancias y vitaminas en las que se destaca la presencia de carotenoides como licopeno, β-caroteno, luteína, α–caroteno, β-criptoxantina, zeaxantina y capsantina. Los carotenoides son pigmentos liposolubles que se dividen en xantofilas y carotenos, y son los responsables de darle el color rojo, amarillo, anaranjado y púrpura a las frutas y vegetales. Como antioxidantes, los carotenoides son capaces de inactivar especies reactivas de oxígeno por lo que ayudan a retrasar el daño oxidativo, además este efecto antioxidante se ha asociado con la reducción del riesgo de desarrollar

enfermedades crónicas como las cardiovasculares, cáncer y osteoporosis. Además de estos importantes efectos, se ha identificado el importante papel que cumplen xantofilas como la luteína y la zeaxantina, que se encuentran en vegetales verdes y amarillos, en la salud ocular: su ingesta está relacionada con prevención de la aparición de cataratas y la degeneración macular asociada con la edad (Nwachukwu, Udenigwe, & Aluko, 2016; Perry, Rasmussen, & Johnson, 2009)

La presente invención proporciona formulaciones de premezcla de pigmentos naturales para concentrados animales ricas en carotenoides, a partir de residuos agroindustriales. Las formulaciones de la presente invención son adicionadas a un concentrado de aves de corral, pescado o crustáceos para pigmentar la yema de huevo, los tegumentos y la grasa subcutánea de aves de corral, así como la carne y tegumentos de pescado y crustáceo.

Los residuos agroindustriales empleados para obtener las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de la presente invención fueron seleccionados teniendo en cuenta dos factores: la abundancia del residuo y su contenido de carotenos. El primero, obedece a una lógica de aprovechamiento de aquellos residuos que generan un mayor problema de disposición por su alto volumen de producción, lo cual garantizará también la sostenibilidad en la generación de materia prima. El segundo factor, responde a la necesidad de incorporar residuos agroindustriales a la premezcla de pigmentos naturales que aporten un alto contenido de carotenoides como sustancias de interés.

Los residuos agroindustriales empleados para obtener las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de la presente invención se seleccionan de: lechuga, repollo, tomate, espinaca, acelgas, albaricoque, naranja, mango, nabo, zanahoria, pimentón, espinaca, coles de bruselas, brócoli, calabaza, cebolla, piña, plátano, uva, melón, berenjena, sandía, pera, maíz, trigo y mezclas de los mismos, teniendo en cuenta los factores descritos anteriormente: abundancia del residuo y contenido de carotenoides. En una modalidad de la invención los residuos agroindustriales empleados se seleccionan de: lechuga (*Lactuca sativa*), tomate (*Lycopersicum esculentum*), repollo (*Brassicaoleracea L.*), pimentón (*Capsicum annuum*), zanahoria (*Daucus carota*) y mezclas de los mismos.

La lechuga (*Lactuca sativa*) en las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de la presente invención aporta entre 8000 a 9500ppm de carotenoides, entre 8500 a 9000ppm y entre 9000 a 9500ppm. El tomate (*Lycopersicum esculentum*) en las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de la presente invención aporta entre 8000 a 9500ppm de carotenoides, entre 8000 a 8500ppm, entre 8500 a 9000ppm y entre 9000 a 9500ppm.

El repollo (*Brassicaoleracea L.*) en las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de la presente invención aporta entre 5000 a 6500ppm de carotenoides, entre 5500 a 6000ppm y entre 6000 a 6500ppm. El pimentón (*Capsicum annuum*) en las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de la presente invención aporta entre 10000 a 11500ppm

de carotenoides, entre 10000 a 10500ppm, entre 10500 a 11000ppm y entre 11000 a 11500ppm. La zanahoria (*Daucus carota*) en las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de la presente invención aporta entre 6000 a 7500ppm de carotenoides, entre 6000 a 6500ppm, entre 6500 a 7000ppm y entre 7000 a 7500pmm.

Para elaborar las formulaciones de premezcla de pigmentos naturales de acuerdo a la presente invención, cada residuo agroindustrial seleccionado se deshidrata y se muele. Para ello primero se lavan y desinfectan los residuos agroindustriales con una solución de ácido peracético a una concentración entre 0,10 a 0,20%(v/v), por un periodo entre 12 y 25 minutos. Luego, dependiendo del residuo agroindustrial, se corta en trozos o en rodajas de grosor uniforme. En una modalidad de la invención se emplea un procesador de alimentos para lograr la uniformidad en el corte. Los trozos y rodajas se desinfectan una vez más como se describió anteriormente, y posteriormente cada uno de los residuos agroindustriales empleados en la formulación se escurre y se deshidrata individualmente en un secador de lecho fluidizado a una temperatura entre 48°C y 55°C (a fin de evitar pérdida de compuestos bioactivos por la influencia del calor), y se deshidrata hasta alcanzar una humedad final en los residuos entre el 8% a 14%, al final de la etapa de deshidratación. Finalmente los residuos son molidos para obtener polvos finos de cada uno de los componentes.

A continuación, se prepara un extracto lipofílico a partir de los polvos finos de cada uno de los componentes para determinar el contenido de carotenoides totales de los componentes de la formulación, empleando métodos espectrofotométricos a una absorbancia de 450nm (Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. A., 2010). Adicionalmente, se determinan los perfiles cromatográficos de cada residuo fresco (FIG. 1), con los que se establece que los carotenoides presentes en la formulación son: licopeno, β-caroteno, luteína, α–caroteno, β-criptoxantina, zeaxantina, capsantina y mezclas de los mismos. Posteriormente, los polvos finos de cada componente se pesan individualmente hasta que cumpla con los requerimientos de concentración de carotenoides definidos en la Tabla y se mezclan hasta garantizar su completa compenetración.

Tabla 1. Contenido de carotenoides totales en los componentes de la premezcla.

Residuo	**Carotenoides totales (ppm)**
Lechuga	8000 a 9500
Tomate	8000 a 9500
Repollo	5000 a 6500
Pimentón	10000 a 11500
Zanahoria	6000 a 7500

Finalmente se obtiene una formulación de premezcla de pigmentos naturales en forma de polvo con un alto contenido de carotenoides caracterizada por un porcentaje de humedad entre 10 a 14% y un aporte de carotenoides totales entre 0,85 a 0,98g de carotenoides/Kg de premezcla, en una modalidad entre 8,5 a 9,8g de carotenoides/Kg de premezcla, entre 8,5 a 9,0g de carotenoides/Kg de premezcla, y entre 9,0 a 9,8g de carotenoides/Kg de premezcla.

Adicionalmente, la invención describe un método para pigmentar la yema de huevo, los tegumentos y la grasa subcutánea de aves de corral y la carne y tegumentos de pescado y crustáceos que comprende: adicionar al concentrado de alimentación de los animales entre el 1 y 20% p/p de la formulación de premezclas de pigmentos naturales descrita anteriormente. Para corroborar las propiedades de pigmentación de la premezcla en la yema de huevo, los tegumentos y la grasa subcutánea de aves de corral, pescado y crustáceos se realizaron ensayos biológicos. Los ensayos biológicos consisten en la inclusión de la premezcla de la invención, en una dieta comercial a diferentes concentraciones, seleccionadas entre 1 a 20 % (p/p) para evaluar su efecto sobre la piel, el músculo, la sangre y las yemas. El ensayo también se realizó empleando un colorante comercial y una dieta libre de colorantes.

En el ensayo se determina el color de la yema y se compara con un patrón de color, desarrollado por la empresa Roche en 1969, denominado en ese entonces, abanico de Roche, en inglés Roche Yolk Color Fan (RYCF), que hoy en día se le conoce con el nombre de abanico de DSM en inglés DSM Yolk Color Fan (DSM, YCF), debido al cambio de nombre de la empresa Roche por DSM. El abanico consta de 15 tirillas que van desde amarillo pálido hasta anaranjado rojizo y una escala de 1 a 15. Esta escala está basada en la determinación del color de diferentes yemas de huevo y establecer su posición en el triángulo de color CIE (Comission Internationali de l´Eclairage). Adicionalmente, se determinan parámetros como el peso, grosor de cáscara e índice morfológico. Los huevos con cáscara delgada y muy porosa están sujetos a una evaporación más intensa, pierden peso con mayor rapidez, y en consecuencia son de calidad más baja que los que poseen la cáscara gruesa y poco porosa. Además durante el almacenamiento la cáscara se seca ya que la sustancia viscosa de los poros se evapora y como consecuencia los canalículos que atraviesan la cáscara se agrandan, haciéndolos más propensos a la deshidratación, por lo tanto huevos de menos de 0,35 mm son poco apropiados para la comercialización por su fragilidad (Periago Castón, 2011).

Estos parámetros se analizan estadísticamente mediante ANOVA, usando GraphPad Prism 5.00® para Windows GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Para el cálculo del índice morfológico del huevo se midió el ancho y la longitud del huevo y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice morfológico} = \frac{Ancho}{Longitud}$$

Por otro lado, se determinó la presencia de carotenoides totales y capacidad antioxidante en piel, músculo, yemas y sangre con extractos preparados con el método empleado por Sales y Resurrección (2010), para lo cual se trata la muestra con hexano y diclorometano. La muestra se centrifuga y el sobrenadante se separa en un tubo de ensayo, considerando este como la primera extracción. El residuo se somete nuevamente a una segunda extracción tal como fue descrito anteriormente; el sobrenadante se une con el primer extracto y se somete a secado bajo una corriente de nitrógeno hasta evaporación completa del hexano y diclorometano, constituyéndose este en la fase lipofílica para el análisis de carotenoides totales y de capacidad antioxidante ORAC por sus siglas en inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity. Los extractos se conservan -20°C y en oscuridad hasta su análisis. La protección antioxidante se midió a partir del área de fluorescencia bajo la curva AUC (del inglés Area Under the Curve) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente.

El contenido total de carotenoides se determina por medio del espectrofotómetro, para lo cual se utilizó el extracto lipofílico reconstituido en acetona y se realizaron entre 3 y 5 curvas de calibración usando β-caroteno en concentraciones desde 0,10 a 3,50 µg/mL y midiendo la absorbancia a 450nm y empleando el método de mínimos cuadrados se determinó la ecuación que expresa el contenido de carotenoides como g de β-caroteno por 100 g de muestra (Szydlowska-Czerniak, Trokowski, Karlovits, & Szlyk, 2011).

La capacidad antioxidante se determina usando el método capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés). Para ello se midió la disminución en la fluorescencia como resultado del daño oxidativo causado por el AAPH como fuente de radicales peróxido (ROO) como se describe en la metodología de (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). Para la curva de calibración se utilizó el análogo soluble en agua del tocoferol conocido como Trolox en concentraciones entre 5 a 200 µM. La muestra utilizada fue un extracto lipofílico reconstituido en acetona; esta solución se mezcló con una solución de β ciclo dextrina metilada al azar (RMCD, Ramdomly Methylated cyclo dextrine de sus siglas en inglés).

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparar la premezcla de pigmentos a partir de residuos agroindustriales

Para elaborar la formulación de la premezcla se utilizaron residuos de pimentón, zanahoria, tomate, repollo y lechuga. Cada residuo fue deshidratado y molido. Para ello primero fueron lavados y desinfectados con una solución de ácido peracético a razón de 1,3 mL por litro de agua, durante 20 minutos. Luego dependiendo del producto se cortó en trozos o en rodajas

de grosor uniforme, usando un procesador de alimentos (Modelo PA7, Brasil) y nuevamente se desinfectaron como se describió anteriormente. El material se escurrió y se deshidrató en un secador de lecho fluidizado (Model 0193, Series 002, ACTUM, Rionegro, Antioquia, Colombia), a 50 °C hasta alcanzar una humedad del 12%. La temperatura se escogió a fin de evitar pérdida de compuestos bioactivos por la influencia del calor. Por último los residuos se molieron y se empacaron al vacío para su uso posterior.

Para calcular la cantidad de cada residuo seco se emplearon dos factores ponderantes, la abundancia del residuo y su contenido de carotenoides. El primero, obedece a una lógica de aprovechamiento de aquellos residuos que generan un mayor problema de disposición por su alto volumen de producción, lo cual garantiza también la sostenibilidad en la generación de materia prima. El segundo factor, responde a la necesidad de incorporar residuos que aporten un alto contenido de carotenoides como sustancias de interés. En la Tabla 2 se muestra el cálculo para obtener 38,808 Kg de la premezcla de pigmento, teniendo en cuenta el contenido de carotenoides.

Tabla 2. Cálculos para la formulación de la premezcla de acuerdo a parámetros de volumen y contenido de carotenoides

Residuo	**Cantidad (Tm)**	**Factor 1**	**% C F1**	**Carotenos totales (mg/100 g)**	**Factor 2**	**%CF2**	**Premezcla (csp harina)**
Lechuga	10,95	0,23	90	927,68	0,23	10	8,90
Tomate	5,9	0,12	90	864,73	0,21	10	5,14
Repollo	12	0,25	90	569,86	0,14	10	9,33
Pimentón	13,85	0,29	90	1098,86	0,27	10	11,19
Zanahoria	5	0,10	90	617,89	0,15	10	4,25
Total	47,7	1		4079,02	1		38,808
Promedio ponderado				848,75			

Tm: Tonelada métrica, Factor 1: Abundancia, Factor 2: Contenido de carotenos, Porcentaje de contribución Factor 1: % C F1, Porcentaje de contribución Factor 2: %CF2, csp: cantidad suficiente para.

El contenido total de carotenoides fue determinado por medio del espectrofotómetro, para lo cual se utilizó el extracto lipofílico reconstituido en acetona. La absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA); utilizando un plato de cuarzo de 96 pozos de 300 µL de capacidad (Hellma Analytics, USA). Las curvas de calibración se prepararon usando β-caroteno en concentraciones desde 0,10 a 3,50 µg/mL. Se graficaron cinco curvas usando el método de mínimos cuadrados que resulta de la

ecuación y = (0.262x ± 0.007) - (0.0042 ± 0.0026), R2 = 0.9999, RSD pendiente = 0.85% (n = 5).

Ejemplo 2: Ensayo biológico de la premezcla en dieta comercial de gallinas ponedoras.

Se realizó un ensayo biológico donde se emplearon 180 gallinas de la raza Lohman Brown, las gallinas empleadas contaban con las vacunas exigidas por ICA. Las aves fueron distribuidas aleatoriamente para ensayar 6 dietas diferentes. Para esto, los animales se dividieron en 6 grupos con 10 animales en cada grupo y se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo. Los 6 grupos se organizaron de tal manera que se pudiera comparar los efectos de incorporar la premezcla preparada de acuerdo al Ejemplo 1, en diferentes concentraciones en el alimento para gallinas ponedoras descrito en la Tabla . El ensayo también se realizó incorporando al concentrado descrito un colorante comercial y una dieta libre de colorantes como blanco. El pigmento comercial empleado fue Carofil® rojo y amarillo de la empresa DSM en una dosificación recomendada por el asesor avícola de 60 mg/kg, compuestos de cantaxantina y Apo-Ester respectivamente (DSM, 2005).

Tabla 3. Concentrados para gallinas ponedoras empleado en el ensayo biológico

Ingrediente	Cantidad kg	Cantidad %
Maiz amarillo Americana 8-12	564,000	56,436
Torta de soya Americana	164,000	16,399
Carbonato de calcio	72,100	7,219
Salvado de trigo	70,000	7,000
Harina de Carne 48	60,000	6,000
Ponedora I	20,000	2,000
Torta de palmiste Expeller	20,000	2,000
Aceite ácido de Soya	20,000	2,000
Harina de hueso calcinado	4,540	0,454
Sal yodada	2,839	0,284
L-Lisina HCl	1,476	0,148
Biozyme Ponedora	0,350	0,035
DL Metionina	0,253	0,025
Total Bache	999,558	100,000

Las aves se alojaron en jaulas individuales para gallinas ponedoras, y fueron ubicadas en un espacio con condiciones higiénico-sanitarias de una granja comercial de gallinas ponedoras. Así, los grupos se distribuyeron como se describe en la Tabla .

Tabla 4. Dietas suministradas durante el ensayo biológico

Grupo	Tratamiento
1	Dieta comercial con pigmento comercial Carofil® rojo y amarillo
2	Dieta comercial sin pigmento
3	Dieta comercial con inclusión premezcla de pigmentos naturales al 5 % (p/p)
4	Dieta comercial con inclusión premezcla de pigmentos naturales al 10% (p/p)
5	Dieta comercial con inclusión premezcla de pigmentos naturales al 15% (p/p)
6	Dieta comercial con inclusión premezcla de pigmentos naturales al 20% (p/p)

El alimento se suministró a razón de 105 gramos/animal/día. Tanto el agua como el alimento fueron suministrados a libre acceso durante todo el ensayo. Durante dos semanas las aves fueron alimentadas con una dieta libre de colorantes artificiales a fin de remover todo color de las yemas que procediera de la alimentación que venían consumiendo las gallinas antes de suministrar los tratamientos propuestos para el ensayo biológico. Una vez se verificó la disminución en el color de las yemas se procedió a suministrar los tratamientos respectivos durante cuatro semanas.

Ejemplo 3: Determinación del color de las yemas por la escala de Roche

Los huevos procedentes de las gallinas empleadas en el ensayo realizado en el Ejemplo. 1, fueron recolectados diariamente en canastillas y al finalizar cada semana se llevaron al laboratorio para realizar el análisis de color. Para esto el color de la yema se comparó con el abanico de DSM (DSM, YCF).

Los resultados obtenidos de las yemas de los huevos recolectados de cada grupo empleado en el ensayo se muestran en la FIG. 2, donde el grupo 4 alimentado con el concentrado y el 5% de la premezcla posee un color muy similar al que se obtuvo en el grupo 1 alimentado con el concentrado y el pigmento comercial sintético Carofil®. Además se evidencia el incremento de color entre los grupos 4, 5 y 6 alimentados con el concentrado y con la premezcla en concentraciones de 10, 15 y 20 % respectivamente, siendo el grupo 6 el de tonalidad más intensa. Esto se verifica con las mediciones realizadas en la escala de Roche como se observa en la FIG. 3**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde se evidencia un incremento en los valores entre 13 y 15, siendo muy similares en las 4 semanas evaluadas. Los valores de escala de Roche superan a los obtenidos por gallinas criadas al aire libre con acceso al pasto y alimentación suplementada, donde el máximo valor alcanzado fue de 10,3 (Skřivan & Englmaierová, 2014).

Ejemplo 4: Parámetros morfológicos de los huevos

Se determinó el peso registrado en los huevos durante todo el ensayo biológico y se observó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos empleados en los grupos durante las cuatro semanas del ensayo, lo cual indica que la incorporación de la premezcla a la dieta no tuvo ninguna incidencia en dicho parámetro, como se observa en la FIG. 4. En la primera semana el peso entre los diferentes grupos estuvo entre 51 y 54g aproximadamente. De acuerdo a la norma técnica NTC 1240 "Industria Alimentaria: Huevos de gallina frescos para consumo", el huevo fresco para consumo humano se clasifica según este peso entre las categorías A y B que contemplan un rango de peso entre 46,0 y 52,9g para la categoría B y entre 53,0 y 59,9g para la categoría A. En las semanas dos y tres se obtuvieron pesos de entre 53 y 55g, lo que ubica estos huevos como categoría A; para la semana cuatro se obtuvo un leve incremento de entre 54 y 56g lo que los sigue ubicando en la categoría A, por lo que puede decirse que en general durante las tres últimas semanas del ensayo biológico se obtuvieron huevos tipo A (ICONTEC, 2011).

Por otro lado, los valores hallados para el grosor de la cáscara son mayores de 0,35 mm con lo que se puede afirmar que estos huevos son más resistentes a la rotura por lo tanto tendrán una mayor resistencia al empaque, embalaje, almacenamiento y comercialización de acuerdo a lo reportado en (Periago Castón, 2011). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados en el ensayo durante las cuatro semanas, lo cual indica que la premezcla no afectó el grosor de la cáscara como se ilustra en la FIG. 5.

En cuanto al índice morfológico, durante todas las semanas del ensayo biológico este se mantuvo estable oscilando desde el principio hasta el final del ensayo entre 77 y 79%, superior a 74%, valor establecido como aceptable para este parámetro como se observa en la FIG. 6, que indica que los huevos tuvieron una forma elíptica que facilita las operaciones de empaque y transporte. Huevos muy largos están especialmente expuestos a daños mecánicos, mientras que los huevos esferoidales y muy gruesos ofrecen dificultad para ser introducidos en los empaques preformados (Periago Castón, 2011)

Ejemplo 5: Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)

La capacidad antioxidante fue determinada usando el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés). Para ello se midió la disminución en la fluorescencia de la fluoresceína como resultado del daño oxidativo causado por el AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) como fuente de radicales peróxido (ROO). Se prepararon extractos adicionando 0,1g de la muestra molida (p.e. sangre, músculo, yema, piel) en un tubo para microcentrífuga Eppendorf® de 2 mL al cual se le agregó 1,5 mL de una mezcla de hexano y diclorometano (1:1), posteriormente se llevó al agitador vórtex KMC 1300v (Vision Scientific, korea) durante un minuto. Luego se sometió a sonicación por 10 minutos a 25 °C, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se separó en un tubo de ensayo, considerando este como la primera

extracción. El residuo fue sometido nuevamente a una segunda extracción tal como fue descrito anteriormente; el sobrenadante se unió con el primer extracto y fue sometido a secado bajo una corriente de nitrógeno hasta evaporación completa del extractante.

Se determinó la capacidad de los antioxidantes presentes en los extractos, midiendo la intensidad de fluorescencia en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA). Para la curva de calibración se utilizó el análogo soluble en agua del tocoferol conocido como Trolox en concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 µM, en buffer de fosfato 10 mM a pH 7,4. Para esto el extracto lipofílico reconstituido se mezcló con una solución de β ciclo dextrina metilada al azar (RMCD, de sus siglas en inglés). Las soluciones obtenidas se adicionaron a una microplaca de 96 pozos en estricto orden: buffer fosfato, la dilución de Trolox (5,10, 25, 50, 100, 150, 200 µM) y la muestra.

Posteriormente se llevó el plato al lector de placas, donde se preincubó durante 30 min a 37 °C. Pasado este tiempo se le adicionó a cada pozo la solución de AAPH y se procedió a la medición por triplicado de la intensidad de la fluorescencia cada 2 min durante 2 horas con una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente. En la FIG. 7, se observa la capacidad antioxidante de las yemas de huevos recolectados en las 4 semanas del ensayo biológico. Se evidencia que en las dietas donde se incluyó la premezcla de la invención la capacidad antioxidante incrementa en comparación con las dietas donde se empleó el pigmento comercial y el concentrado solo. Se observó que la capacidad antioxidante es constante durante las cuatro semanas, lo que permite concluir que los grupos alimentados con el concentrado que incluía la premezcla de la invención acumularon más sustancias bioactivas en la yema.

Por otro lado en la FIG. 8 se observa, que los valores de capacidad antioxidante encontrados en piel no presentaron una relación al incrementarse el porcentaje de inclusión de la premezcla en el concentrado. En cuanto a la capacidad antioxidante en el músculo se observa una relación directa con la inclusión de la premezcla en el concentrado. Finalmente se puede establecer que en la piel los valores oscilaron entre 1,25 y 34,96 µmol TE/100g, para el músculo entre 37,33 y 80,38 µmol TE/100g, mientras que en la sangre se hallaron valores entre 226,87 y 290,609 µmol TE/100g y en las yemas los valores encontrados oscilaron entre 266,327 y 563,733 µmol TE/100g.

Ejemplo 6: Determinación del contenido de carotenos totales

Para determinar el contenido total de carotenos en las yemas se prepararon extractos adicionando 0,1 g de la muestra molida en un tubo para microcentrífuga Eppendorf® de 2mL al cual se le agregó 1,5 mL de una mezcla de hexano y diclorometano (1:1), posteriormente se llevó al agitador vórtex KMC 1300v (Vision Scientific, korea) durante un minuto. Luego se sometió a sonicación por 10 minutos a 25 °C, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se separó en un tubo de ensayo, considerando este como la primera extracción. El residuo fue sometido nuevamente a una

segunda extracción tal como fue descrito anteriormente; el sobrenadante se unió con el primer extracto y fue sometido a secado bajo una corriente de nitrógeno hasta evaporación completa del extractante.

El contenido total de carotenos fue determinado por medio del espectrofotómetro, para lo cual se utilizó el extracto reconstituido en acetona. Las curvas de calibración se prepararon usando patrones de β-caroteno en concentraciones desde 0,10 a 3,50 µg/mL, el resultado final se expresó como mg de β-caroteno por 100g de muestra. Se graficaron cinco curvas usando el método de mínimos cuadrados, de lo que resulta la ecuación:

$$y = (0.262x \pm 0.007) - (0.0042 \pm 0.0026)$$

Con los resultados obtenidos de la ecuación se evidencia desde la primera semana del ensayo las diferencias en el contenido de carotenos totales en los diferentes grupos estudiados en el ensayo biológico. Se observa que a medida que incrementa el porcentaje de inclusión de la premezcla en el concentrado, aumenta el contenido de carotenoides en comparación con el grupo 1 que es la dieta comercial y el grupo 2 que es la dieta con inclusión de pigmentos sintéticos comerciales, el incremento evidenciado es de al menos dos veces.

En las semanas 2, 3 y 4 el contenido de carotenos aumentó para todos los grupos excepto en el grupo 2, que fue el tratamiento sin inclusión de pigmentos. Nuevamente se evidencia que al incrementar el porcentaje de inclusión de la premezcla en el concentrado, aumenta el contenido de carotenos totales, como se evidencia en la FIG. 9.

Como se observa en la FIG. 10, el contenido de carotenoides totales en la piel oscila entre 10 a 34 mg β-caroteno por cada 100 gramos de muestra y se puede observar que a medida que aumenta el porcentaje de inclusión en la premezcla en el concentrado aumenta el contenido de carotenoides en comparación al grupo alimentado con el concentrado y pigmento comercial y el grupo alimentado con un concentrado sin adición de pigmentos. Por otro lado el contenido total de carotenos en las muestras de músculo y sangre fue muy bajo con respecto a la piel y yemas, se registraron valores por debajo de 1 mg β-caroteno/100g, mientras que en las yemas se encontraron los mayores valores de carotenos. Esto significa que con la inclusión de la premezcla logró aumentar el contenido de carotenos en la yema de huevo.

De acuerdo a lo anterior se puede concluir que los carotenos logran pasar del alimento a la sangre y de allí se logran depositar en mayor cantidad en las yemas, la piel y por último en el músculo, razón por la cual el contenido en la sangre es mucho más bajo. Es de conocimiento general que las gallinas no son capaces de sintetizar estos pigmentos, pero si tienen la habilidad de transportar entre el 20 y el 60% de los pigmentos a la yema desde la alimentación ingerida (Rowghani, Maddahian, & Abousadi, 2006).