

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Evaluación Química y Biológica de los
Pigmentos de la Spirulina

228

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A
IRENE MONTALVO VELARDE

MEXICO, D. F. 1974



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. FRANCISCO GIRAL GONZALEZ

VOCAL: Prof. ENRIQUE GARCIA GALIANO

SECRETARIO: Prof. ANGELA SOTELO LOPEZ

1er. SUPLENTE: Prof. LILIA VIERNA DE GARCIA

2do. SUPLENTE: Prof. RUBEN BERRA GARCIA COSS

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:

ALIMENTOS BALANCEADOS DE MEXICO, S.A. de C.V. y P.E.

SUSTENTANTE: IRENE MONTALVO VELARDE

ASESOR: Q.F.B. y M.C. ANGELA SOTELO LOPEZ

A MIS PADRES, CON TODO MI CARIÑO.

A MIS HERMANAS, FLOR Y PATRICIA.

A MI ABUELITA JUANITA; AL
RECUERDO DE MIS ABUELITOS:
IRENE, MANUEL Y JOSE MARIA.

A VIRGINIA, ELSA Y ELOISA.

A MIS AMIGOS Y FAMILIARES.

A VERONICA.

Con gran cariño y agradecimiento a la amiga y compañera Srita. Q.F.B. Beatríz Murillo - Sánchez por su gran ayuda técnica y moral , ya que sin ella no hubiera sido posible la realización de éste trabajo.

Con todo respeto a la maestra Q.F.B. y M.S. Angela Sotelo López de quién recibí valiosos consejos y gran ayuda.

C O N T E N I D O

<u>Capítulo</u>		<u>Páginas</u>
I	INTRODUCCION	1-3
II	GENERALIDADES	4-9
III	PARTE EXPERIMENTAL	10-24
IV	RESULTADOS	25-43
V	DISCUSION Y CONCLUSIONES	44-45
VI	BIBLIOGRAFIA	46-49

I.- I N T R O D U C C I O N

Uno de los mayores problemas con que cuentan las Industrias de Alimentos Balanceados para ganado, es la falta de una buena fuente de pigmentos que se incluya en las dietas para aves de corral. Aún cuando el grado de pigmentación no es función directa del valor alimenticio, se debe establecer el hecho de que la pigmentación en las aves es muy delicada, ya que existen factores que retardan o nulifican totalmente la acción de los pigmentos, por ejemplo: la Coccidiosis anula totalmente el efecto de cualquier pigmentante ya sea natural o sintético; el exceso de sulfas actúa en igual forma con los pigmentantes sintéticos.

Actualmente las dependencias que se dedican al abasto de aves, exigen que el pollo de engorda tenga una pigmentación adecuada tanto en piel como en grasa y que las aves de postura proporcionen un huevo que tenga buen aspecto por la coloración de su yema; esto es debido a que el consumidor final de productos avícolas prefiere un pollo amarillo a uno prácticamente blanco, y un huevo con la yema naranja brillante a uno que la tenga amarillo claro, creyendo que estos tonos van en relación directa con el valor alimenticio de éstos productos. Es por ésto que el avicultor debe producir el pollo ó el huevo para plato debidamente pigmentados.

Las principales fuentes naturales de pigmentos son: el maíz amarillo, la alfalfa, el zempazuchil y el chile (que se utiliza como mordiente), sin embargo, el problema que éstos presentan es su escasez y alto precio en determinadas épocas del año. También se usan algunos pigmentantes sintéticos como los Carofiles Rojo y Amarillo, el Naranpol P-450, etc.; pero con poco éxito debido a la pigmentación deficiente que presentan y a su elevado precio. Por lo que es conveniente buscar -- nuevas fuentes de pigmentación fácilmente asequibles.

En estudios hechos con relación al valor nutritivo de la Spirulina, se obtuvieron resultados satisfactorios por su alto índice de utilización proteica. En uno de los experimentos realizados en ALBAMEX (Alimentos Balanceados de México, S.A. de C.V. y P.E.), se vió que los pollos alimentados con esta alga se coloreaban más que los alimentados con una dieta -- que no la contenía, de donde se dedujo que la Spirulina contenía sustancias pigmentantes en alto contenido.

El objeto de éste trabajo fué hacer un estudio de -- los pigmentos de la Spirulina y así poder establecer una comparación entre ésta y las demás fuentes pigmentantes ya conocidas.

II.- G E N E R A L I D A D E S

Las zonas áridas y semi-áridas se definen por su clima, caracterizándose por un balance hídrico deficiente, debido al desnivel de la relación entre precipitación y evaporación. Son muchos los factores que intervienen en la formación de estas zonas, tales como lo accidentado del terreno, el régimen térmico, la insolación, la duración de los vientos y también ciertos factores biológicos.

En una zona árida y semi-árida en valles cerrados -- (donde se recogen las aguas de cuencas hidrológicas por no tener salida a mares u océanos), ocurren fenómenos particulares, pues las sales minerales contenidas en las aguas se concentran dando origen a lagunas saladas o alcalinas.

Cuando las rocas de una zona están formadas por sedimentos marinos, las aguas de la cuenca contienen cloruro de sodio; si por el contrario las rocas son de origen volcánico, se forman salmueras alcalinas que contienen carbonatos. Como las rocas que se encuentran en un valle cerrado son generalmente de ambas variedades, volcánico y sedimentario, las aguas contienen casi siempre cloruros y carbonatos.

Por lo general los lagos alcalinos se encuentran en las zonas áridas y semi-áridas y entre ellos citamos, en África, los lagos del Fezzan, algunos lagos en la parte norte de la República del Tchad, el lago Aranguadi en Etiopía, y el lago Magadi en Kenya. En América se encuentran los lagos Searles

y Owens en California, el lago Antofogasta en Chile y el lago de Texcoco en el Valle de México.

El lago de Texcoco tiene numerosas peculiaridades, una de éstas es de sumo interés: nos referimos a una especie de vegetación que se formaba en la superficie del lago y que los Aztecas hacían recoger, secar y asar para consumirla como alimento; en su idioma náhuatl la llamaban "tecuitlatl", que quiere decir "excremento de piedra", pues habían notado que solamente se formaba en aguas con alto contenido de sales minerales.

Esta alga azul continúa creciendo en la actualidad en el lago de Texcoco, especialmente en los vasos exteriores del Caracol ("O" y "A"). Este es un inmenso evaporador solar de aproximadamente 900 hectáreas de superficie y ubicado en la parte noroeste del lago, en el cual se concentra la salmuera alcalina extraída del subsuelo para ser tratada posteriormente en la Planta Sosa Texcoco y obtener carbonato de sodio y sosa cáustica.

Esta misma alga, la Spirulina, con pequeñas varian--tes de especie, es conocida en otros países, principalmente --del continente africano, Perú, Pakistán y otros países. Hasta estos últimos años no se tenía mucha información sobre la Spi--rulina, puesto que prácticamente no se había investigado, a pesar de que es un alimento con más de 10 % de nitrógeno, lo que

equivale a un mínimo de 63 % de proteínas en el producto seco.

En 1967, se iniciaron en México los trabajos sobre el cultivo de algas en las instalaciones de Sosa Texcoco, buscando la aplicación a escala industrial de los nuevos métodos. Los trabajos han continuado desde entonces, realizándose mediante una estrecha colaboración entre el Instituto Francés del Petróleo y Sosa Texcoco.

Propiedades de la Spirulina.- Existen decenas de miles de variedades de algas; pero solamente algunas de ellas son aprovechadas como alimento.) Hace unos veinte años, la Fundación Carnegie de los Estados Unidos de Norteamérica hizo estudios sobre las "Chlorellas" y las "Scenesdesmus", habiendo tropezado con algunos problemas tecnológicos en el cultivo y recolección para fines industriales de esas minúsculas algas cuyo diámetro es de solo algunas micras. La Spirulina es de tamaño cien veces mayor aproximadamente, con un diámetro de 0.25 a 0.50 milímetros; además su forma de espiral (de donde proviene su nombre), permite que las unidades se enganchen unas a otras, formando núcleos más o menos compactos, lo que facilita la cosecha.

La característica predominante de la Spirulina, es que necesita para vivir de un medio básico con un elevado pH:

de 9 a 11. Esto representa una ventaja, pues en un medio alcalino el gas carbónico reacciona neutralizando el carbonato alcalino que se transforma en bicarbonato y reacciona proporcionando a la Spirulina el pH básico ideal para su existencia. De esa manera el alga dispone de un volumen potencialmente importante de CO_2 que le permite elaborar constantemente su materia orgánica, la cual, en estado seco, contiene 50 % de carbono. - En cambio en medio ácido, como lo necesita la "chlorella", el gas carbónico se disolvería; para mantener una concentración adecuada de CO_2 , tendría que disponerse de grandes cantidades de gas carbónico, ya que éste, en un cultivo a cielo abierto, presenta la tendencia a perderse rápidamente en la atmósfera.

Con respecto al uso de la Spirulina como fuente de proteínas, podemos decir que contiene todos los aminoácidos -- esenciales en una proporción muy aproximada a la composición -- tipo establecida por la FAO (Food and Agriculture Organization) Esto es muy importante si se tiene en cuenta que de los veinte aminoácidos que componen las proteínas, ocho son esenciales para los adultos y nueve para los niños, los que deben estar contenidos en los alimentos que ingieren, ya que el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos. La única forma de obtenerlos es consumiendo carne de animales que los hayan absorbido y asimilado o vegetales que los contengan por su propia elaboración. Desafortunadamente, no todas las plantas producen el total de los aminoácidos.

La existencia de concentrados de proteínas, y ahora también de algas, que a pesar de su procedencia vegetal, constituyen un concentrado natural, permite aliviar tales insuficiencias, elevando a un nivel asimilable por el organismo humano los porcentajes deficitarios de aminoácidos. Los análisis practicados sobre ratas alimentadas con Spirulina muestran un valor biológico elevado y una digestibilidad excelente. (1)

En un plano un poco distinto, también debe hacerse mención de las propiedades antibióticas del alga Spirulina. A la fecha se le han reconocido tres actividades microbianas, la más importante es la de la Spirulina "A" que contiene un polieno antimicrobiano con acción fuertemente tóxica para hongos y levaduras, la cual ha despertado gran interés dada la falta actual de antibióticos fungicidas.

Diremos también, que la Spirulina contiene un alto porcentaje de ácido gama-linoleico, reconocido como hipotensor. Además de las proteínas, la Spirulina contiene cierta cantidad de lípidos y un alto porcentaje de vitaminas y glúcidos. (2)

III.- P A R T E

E X P E R I M E N T A L

1.- Objetivo.- Cuantificar los pigmentos de la Spirulina, para hacer un estudio del nivel adecuado de ésta alga para la correcta pigmentación de aves. Este estudio comprende una serie de experimentos químicos y biológicos.

Las pruebas químicas (A) tuvieron como objeto efectuar la evaluación del material pigmentante de la Spirulina en cuanto a su contenido de Carotenos y Xantofilas. Las pruebas biológicas (B) estuvieron encaminadas a observar el efecto pigmentante de la Spirulina en pollos de engorda en la dieta finalizadora y en gallinas ponedoras (huevo para plato).

2.- Materiales y Métodos.- En el presente trabajo se empleó el alga Spirulina, colectada en el Vaso "0" del Caracol del Lago de Texcoco, la cual se deshidrató previamente.

La parte experimental se efectuó en los laboratorios y en la granja piloto de ALBAMEX.

A.- Pruebas Químicas.- Las determinaciones que a continuación se describen, se efectuaron de acuerdo con los métodos del A.O.A.C. (a, b, c, d, e, f, g y h). (3).

a.- Humedad.- Se pesaron 2 g de muestra, empleando cajas de aluminio que previamente se pusieron a peso constante, desecándose a continuación en una estufa a 100°C. El tiempo de

secado en la estufa fué de 5 horas, al finalizar el tiempo se colocaron las muestras en un desecador y se pesaron. La pérdida de peso proporciona directamente la cantidad de humedad que se informa por 100 gramos de muestra.

b.- Proteína Cruda.- Se determinó el nitrógeno proteico por el método de Kjeldahl (modificación de Wieninger), utilizando H_2SO_4 concentrado como digestor y mezcla reactiva de selenio como catalizador. Después de 40 mín. se obtiene un líquido verde claro y en éste momento se considera terminada la digestión; se diluye con agua. Después de ésto se llevó a cabo la destilación con NaOH al 50 %. El producto de la destilación se recogió en un matrás con 50 ml de ácido bórico al 4 % con indicador de rojo de metilo; posteriormente se tituló con HCl 0.1 N. El resultado obtenido dá el porciento de nitrógeno por 100 gramos de muestra, éste valor al multiplicarse por 6.25 dá el porciento de proteína.

c.- Extracto Etéreo.- La muestra desecada se colocó en un cartucho de "Goldfish" previamente pesado. Se sometió a extracción con éter de petróleo en el aparato de "Goldfish" durante 12 horas. Después de efectuada la extracción el recipiente conteniendo el extracto que estaba previamente a peso constante se calentó en una estufa a $100^{\circ}C$ durante 30 mín.; esto se hizo para eliminar el éter hasta la obtención del extracto

solo, se puso en un desecador y se pesó. La diferencia de pesos proporcionó la cantidad del extracto que se informa por -- 100 gramos de muestra.

d.- Fibra Cruda.- Esta determinación se hizo por el método de Henneberg, que consiste en someter a hidrólisis a la muestra seca y desgrasada, por el método del extracto etéreo; se trató primero con H_2SO_4 al 1.25 % y posteriormente con NaOH al 1.25 %, en cada una de éstas hidrólisis se filtró al vacío a través de un lino adaptado a un Büchner y éste a su vez a un Kitasato y se lavó con agua caliente hasta neutralidad. El residuo de secado representa la fibra cruda que es referida a -- 100 gramos de muestra original.

e.- Cenizas.- Se pesó aproximadamente 1 gr de muestra en un crisol de porcelana que se puso previamente a peso constante, se sometió primeramente a combustión con un mechero Bunsen y posteriormente a calcinación en la mufla a $550^{\circ}C$, hasta la obtención de cenizas blancas. El residuo obtenido después de la calcinación proporciona la cantidad de cenizas que se informa en 100 gramos de muestra.

f.- Extracto Libre de Nitrógeno.- Se sacó por diferencia entre los datos del análisis proximal restados a 100 %.

g.- Calcio.- Para esta determinación se utilizaron las cenizas del alga, las cuales se disolvieron en 5 ml de agua regia, se filtró, se le agregaron unas gotas de anaranjado de metilo e hidróxido de amonio hasta vire del indicador, se sometió a ebullición para eliminar el exceso de NH_4OH , después se le agregaron 60 ml de oxalato de amonio caliente y se dejó reposar toda la noche. A continuación se filtró y se lavó con agua caliente hasta desaparición del oxalato. La solución se calentó a $70-90^\circ\text{C}$ y se tituló en caliente con KMnO_4 0.05 N, el resultado se refirió a 100 gramos de muestra.

h.- Fósforo.- Se incineró la muestra en el mechero y se llevó a una mufla a 600°C durante 8 hrs.; al residuo se le adicionó 20 ml de HCl y unas gotas de HNO_3 , completándose a un volumen de 100 ml con agua destilada. Se hicieron lecturas de porcentaje de Transmitancia a $400\text{ m}\mu$ en un espectrofotómetro, teniendo como base una curva estándar. El resultado obtenido se refirió a 100 gramos de muestra original.

i.- Aminoácidos.- El análisis se hizo en un autoanalizador Hitachi Perkin Elmer KLA-3B. La muestra se hidrolizó con HCl 6 N, a reflujo constante durante 22 horas.

j.- Pigmentos Totales.- Se hizo una saponificación de -

la muestra con potasa alcohólica al 30 % durante 30 mín., posteriormente por extracciones sucesivas con hexano se separaron los pigmentos; estas fracciones de hexano se juntaron y se lavaron con agua hasta neutralidad de la capa acuosa, se pasó -- por un filtro con sulfato de sodio anhidro para eliminar los -- residuos de agua y se llevó a un volumen de 100 ml. Este ex-- tracto contenía Carotenos y Xantofilas. Se leyó el extracto en un colorímetro Bausch & Lomb a $450\text{ m}\mu$ junto con una curva es-- tándar de β -Carotenos, la cual se preparó dándole el mismo tratamiento que a la muestra y haciendo diluciones que conte-- nían de 1 a 6 γ /ml. El colorímetro se ajustó a 100 % de Trans-- mitancia con hexano. Se construyó una curva graficando la con-- centración en γ /ml contra la densidad óptica; la concentra-- ción encontrada para la muestra se interpoló en la gráfica de la curva estándar y se relacionó con el peso de la muestra pa-- ra sacar la concentración de pigmentos totales.

k.- Análisis de los Pigmentos.- Este estudio se hizo -- por dos métodos de separación; uno por Cromatografía en Colum-- na y el otro por Cromatografía en Capa Fina.

Se hicieron varios métodos de Cromatografía en Colum-- na para buscar el más adecuado; como en el que se usan colum-- nas de magnesia y diferentes eluyentes (4); el método de los Laboratorios Roche (5); el de columnas de óxido de magnesio-

Celite 545 (6); pero el que dió mejores resultados fué el método oficial del A.O.A.C., 1970 (3) que fué el que se usó.

Para ésta separación se hicieron dos columnas, la -- primera tenía como adsorbente polvo de gel de sílice-tierra de diatomeas (1:1) de la cual se sacaron tres fracciones:

1ª) Carotenos Totales.- Se eluyeron con hexano-acetona (96 + 4).

2ª) Mono-hidroxi Pigmentos (MHP).- Como la Cripto--xantina, que se eluyeron con hexano-acetona (90 + 10).

3ª) Di-hidroxi Pigmentos (DHP).- Como la luteína, zeaxantina y sus isómeros que se eluyeron con hexano-acetona - (80 + 20).

La violaxantina, neoxantina y otros poli-oxi Pigmentos (POP) permanecieron en la columna, porque solamente se eluyen en la fracción de Xantofilas Totales que se saca en la segunda columna.

En la segunda columna que tenía como adsorbente óxi-do de magnesio-tierra de diatomeas (1:1), solamente se sacaron dos fracciones:

1ª) Carotenos Totales (TC).- Que se eluyeron con - hexano-acetona (90 + 10).

2ª) Xantofilas Totales (TX).- Se eluyeron con hexano-acetona-metanol (80 + 10 + 10).

Las lecturas de todas las fracciones se hicieron en un espectrofotómetro Beckman DB-G, el cual estaba perfectamente calibrado, tomando como base una solución estándar de Sudán I (1-fenilazo-2-naftol) disuelto en acetona-isopropanol (50 + 50), para que el factor de corrección del aparato fuera de cero. Se hicieron las lecturas en el menor tiempo posible para evitar la oxidación de las muestras.

Para la cromatografía en capa fina también se probaron varios métodos de separación en placas que contenían fosfato de magnesio activado y como eluyentes éter de petróleo-benceno (90 + 10) ó tetracloruro de carbono (7); el de placas que tenían como soporte gel de sílice-hidróxido de calcio (1:6) y como solvente benceno-metanol (98:2); las de gel de sílice impregnadas con líquido de parafina ó con algún triglicérido y como eluyente acetona-metanol-agua (15 + 75 + 10) (8); y el método en el que se usaron placas de gel de sílice y como eluyente dicloruro de metileno-acetato de etilo (80 + 20) (9), que fué el que se usó para la separación de Carotenos y Xantofilas.

La preparación de la muestra se hizo siguiendo el mismo método que para la cromatografía en columna. La muestra ya preparada se colocó sobre una placa de gel de sílice 7G -- (TLC) activada, usando como eluyente dicloruro de metileno-ace

tato de etilo (80 + 20). Se hicieron las lecturas de los R_f --
marcados lo antes posible, para evitar que la muestra se oxida
ra (10).

B.- Pruebas Biológicas.- Se hicieron varias prue--
bas en aves (14), para poder definir el comportamiento de la
Spirulina como fuente de pigmentos en las dietas, y así esta--
blecer los niveles adecuados de ésta. Las pruebas se efectua--
ron en el siguiente orden:

Prueba # 1.- Es ésta prueba se usó el extracto crudo de
la Spirulina, el cual se extrajo con hexano eliminando las clo
rofilas mediante una saponificación en frío (con KOH metanóli-
co al 40 %), y posteriormente se cuantificó espectrofotométri-
camente para conocer la concentración del material pigmentante
que se usó.

Se emplearon 6 niveles de pigmentos que fueron de: 0
(testigo), 20, 40, 60 y 80 mg de material pigmentante en ex--
tracto crudo por cada kilogramo de dieta, y un nivel de 80 mg
de material pigmentante de Spirulina entera por cada kilogramo
de dieta; ésto se hizo para tener una base de comparación en--
tre el extracto crudo y la Spirulina entera y ver cual de los
dos funcionaba mejor.

Una vez que se cuantificó el extracto, se midió para
cada nivel de acuerdo con su concentración y se revolvió con -

el alimento; se dejó un día expuesto moderadamente al aire con el fin de eliminar el solvente.

La dieta se dió a pollos de engorda raza Vantress de 6 semanas de edad. Las aves se alojaron en pisos, en lotes de 10 pollos por cada tratamiento usando dos repeticiones por lote, o sea, 5 pollos por cada repetición; agua y alimento se les dió a libertad. Se usó como alimento la dieta balanceada ya establecida por ALBAMEX para pollos de engorda en etapa finalizadora. (Cuadro No. 1).

La prueba tuvo una duración de 3 semanas y cada semana se tomaron datos de ganancia de peso, consumo de alimento y al final de la prueba se hizo una evaluación visual de la calidad del pollo.

Prueba # 2.- Esta prueba tuvo como objeto encontrar el nivel óptimo para una buena pigmentación en pollos de engorda, usando la Spirulina entera a diferentes niveles y como única fuente de pigmentos. Los niveles que se usaron fueron:

- 1.- 0 mg de pigmentos (dieta testigo).
- 2.- 20 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 3.- 40 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 4.- 60 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 5.- 80 mg de pigmentos / Kg de alimento.

La substitución de pigmentos en la dieta base se hizo a expensas de sorgo. El alimento que se usó fué el de pollos

de engorda en etapa finalizadora que se dá en el cuadro anterior.

Se emplearon pollos de engorda raza Vantress de 6 semanas de edad, y se distribuyeron en lotes de 10 pollos para cada nivel, usando dos repeticiones de 5 pollos para cada uno. Las aves se alojaron en jaulas de desarrollo y se les dió agua y alimento a libertad.

Esta prueba tuvo una duración de 3 semanas y cada semana se tomaron datos de consumo de alimento y ganancia de peso para poder hacer la conversión alimenticia. Al final de la prueba se hizo una evaluación visual en torsos y piel de las aves, para poder informar cual nivel fué el óptimo.

Prueba # 3.- Una vez que se tuvo el valor del nivel óptimo de pigmentación para la Spirulina se trató de hacer una comparación entre ésta y los diferentes materiales pigmentantes ya conocidos y usados en sus niveles óptimos para el mismo fin con el objeto de establecer la calidad de éstos según las exigencias del mercado. Los materiales pigmentantes usados fueron: Spirulina, Zempazuchil, Alfalfa, Maíz amarillo (11) y Carofil sintéticos (rojo y amarillo). Los tratamientos empleados fueron los siguientes:

- 1.- Dieta base (libre de pigmentos).
- 2.- 2 % de Alfalfa + 10 % de Maíz Amarillo / Kg de alimento.
- 3.- 50 mg de Carofil amarillo + 30 mg de Carofil rojo / Kg de alimento.

4.- 80 mg de pigmentos de Zempazuchil / Kg de alimento.

5.- 80 mg de pigmentos de Spirulina / Kg de alimento.

La substitución de pigmentos en la dieta base se hizo a expensas de sorgo. El alimento que se les dió a las aves fué el mismo que se usó en las dos pruebas anteriores.

En el laboratorio se cuantificaron los pigmentos del Zempazuchil y de la Spirulina para poder sacar la cantidad de cada material pigmentante según el nivel usado.

Se emplearon 50 pollos de engorda raza Vantress de 5 semanas de edad y se distribuyeron en lotes de 10 pollos para cada nivel, usando dos repeticiones de 5 pollos para cada uno. Las aves se alojaron en jaulas de desarrollo y se les dió agua y alimento a libertad.

Esta prueba tuvo una duración de 4 semanas y cada semana se tomaron datos de ganancia de peso de las aves, consumo de alimento y una evaluación visual de la calidad del pollo. Al final de la prueba se mató un ave de cada tratamiento para hacer una cuantificación mediante extracción con solventes de los pigmentos fijados en piel y grasa.

Prueba # 4.- En ésta prueba se trató de encontrar el nivel óptimo de Spirulina, usando diferentes niveles en gallinas ponedoras, para inducir una buena pigmentación en la yema de huevo. Los niveles usados fueron los siguientes:

1.- 0 mg de pigmentos (dieta testigo).

2.- 20 mg de pigmentos /Kg de alimento.

- 3.- 30 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 4.- 40 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 5.- 50 mg de pigmentos / Kg de alimento.

La substitución de pigmentos en la dieta base se hizo a expensas de sorgo. La dieta que se usó es la ya establecida y balanceada por ALBAMEX para Gallinas Ponedoras (Cuadro - No. 6).

Se emplearon 30 gallinas raza Leghorn, las cuales se distribuyeron en lotes de 6 aves para cada nivel, poniendo para cada nivel dos repeticiones de tres aves para cada uno. Las aves se alojaron en jaulas individuales de postura; agua y alimento se les dió a libertad.

Esta prueba tuvo una duración de 3 semanas en experimento y una semana pre-experimental, durante la cual las aves tuvieron una dieta libre de pigmentos, con el propósito de -- agotar los pigmentos naturales de la yema, e inducir el color únicamente con la Spirulina y poder hacer la evaluación de ésta como única fuente de pigmentos.

Cada semana se tomaron datos de producción de huevo, consumo de alimento y se abrieron dos huevos de cada nivel para hacer una apreciación visual de la coloración de la yema -- del huevo y hacer una diferencia de color entre cada nivel; para ésto se usó el Abanico Colorimétrico de Roche para pigmentación de huevo, con escala de 1 a 12 para colores que van desde el amarillo pálido al naranja oscuro. Al final de la prueba -

se hizo una evaluación visual para poder establecer el nivel óptimo de pigmentación en el huevo.

Prueba # 5.- En la prueba anterior los dos últimos niveles (40 y 50 mg de pigmentos / Kg de alimento) tenían una coloración sumamente intensa, por lo cual se decidió repetir la -- prueba para el mismo fin, o sea, encontrar el nivel óptimo económico para la pigmentación de huevo para plato, pero usando -- los niveles hasta el de 30 mg de pig. / Kg de alim. y más espaciados. Los niveles que se usaron fueron:

- 1.- 0 mg de pigmentos (dieta base).
- 2.- 10 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 3.- 15 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 4.- 20 mg de pigmentos / Kg de alimento.
- 5.- 30 mg de pigmentos / Kg de alimento.

La substitución de pigmentos en la dieta base se hizo a expensas de sorgo. La dieta que se usó fué la misma que -- la de la prueba anterior.

Se emplearon 30 gallinas raza Leghorn y se llevó a -- cabo la prueba en las mismas condiciones que la anterior.

La prueba tuvo una duración de 7 semanas: 6 semanas en experimento y una pre-experimental, tomando como base la -- prueba anterior. Cada semana se tomaron datos de consumo de -- alimento, producción de huevo y se abrieron dos huevos de cada tratamiento para hacer la apreciación visual de la coloración

de la yema del huevo con el Abanico Colorimétrico de Roche.
Al final de la prueba se hizo la cuantificación química de los pigmentos fijados en la yema. (12, 13).

IV.- R E S U L T A D O S

De todas las pruebas que se hicieron se sacaron los siguientes resultados:

A.- Pruebas Químicas.- Los resultados obtenidos - para el análisis proximal fueron los siguientes:

a.-	Humedad	-----	12.8 %
b.-	Proteína cruda	-----	65.4 %
c.-	Extracto etéreo	-----	0.5 %
d.-	Fibra cruda	-----	1.3 %
e.-	Cenizas	-----	6.8 %
f.-	Extracto libre de nitrógeno	-----	13.2 %
g.-	Calcio	-----	3.00 %
h.-	Fósforo	-----	0.99 %

i.- Aminoácidos.- Los resultados están en gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína.

Aspartico	-----	15.92
Glutámico	-----	21.84
Treonina	-----	4.48
Serina	-----	4.31
Prolina	-----	2.90
Alanina	-----	6.06
Glicina	-----	4.03
Valina	-----	5.44
Cistina	-----	2.16
Metionina	-----	2.11
Isoleucina	-----	4.49
Leucina	-----	7.66
Tirosina	-----	3.90
Fenilalanina	-----	3.84
Lisina	-----	4.50
Histidina	-----	1.58
Arginina	-----	9.38
Triptofano	-----	1.23

j.- Pigmentos Totales.- Los pigmentos totales están reportados como β -Carotenos ----- 4.32 g/Kg

k.- Análisis de Pigmentos.- Por cromatografía en columna se tuvieron las siguientes fracciones:

Para la Spirulina:

Columna No. 1.-

1ª)	Carotenos Totales (TC)	-----	1981.72 mg/Kg
2ª)	Monohidroxi Pigmentos (MHP)	-----	316.34 mg/Kg
3ª)	Dihidroxi Pigmentos (DHP)	-----	<u>1711.94 mg/Kg</u>
			4010.00 mg/Kg

Columna No. 2.-

1ª)	Carotenos Totales (TC)	-----	1892.64 mg/Kg
2ª)	Xantofilas Totales (TX)	-----	<u>2357.36 mg/Kg</u>
			4250.00 mg/Kg

Para el Zempazuchil:

Columna No. 1.-

1ª)	Carotenos Totales (TC)	-----	327.97 mg/Kg
2ª)	Monohidroxi Pigmentos (MHP)	-----	873.52 mg/Kg
3ª)	Dihidroxi Pigmentos (DHP)	-----	<u>6823.55 mg/Kg</u>
			8025.04 mg/Kg

Columna No. 2.-

1ª)	Carotenos Totales (TC)	-----	303.24 mg/Kg
2ª)	Xantofilas Totales (TX)	-----	<u>7705.70 mg/Kg</u>
			8008.48 mg/Kg

La diferencia que existe entre el valor total obtenida por la Columna No. 1 y el obtenido en la Columna No. 2 se debe a que en la primera no se eluyen los Polioxi Pigmentos --

(POP), y en la segunda si se eluye el total de las Xantofilas.

Se hizo la cromatografía de la Spirulina y del Zempazuchil para tener un punto de comparación entre los dos pigmentantes, ya que éste último es uno de los más usados.

Por Cromatografía en Capa Fina se obtuvieron los siguientes resultados:

	$R_f \times 100$	Encontrados $R_f \times 100$
Azafrina -----	2.0	1.9
Bixina -----	5 - 5.5	5.7
Capsorubina -----	13 - 13.5	13.7
Capsantina -----	16.0	16.1
Violaxantina -----	21.0	----
Zeaxantina -----	24.0	24.5
Anteraxantina -----	32.0	31.9
Luteína -----	35.0	35.6
Criptoxantina -----	75.0	75.4
Cantaxantina -----	90.0	89.9
Metilbixina -----	97.0	96.7
Torularodín-metil-éster ---	100.0	99.4
↓	↓	
Carotenoides con O ₂ (Apo-Carotenales) 2 -----	100.0	-----
↓		↓
Hidrocarburos Carotenoides (α, β, γ Carotenos, licopeno, torulina)		

B.- Pruebas Biológicas.- De las pruebas realizadas en pollos se sacaron las siguientes conclusiones:

Prueba # 1.- En la prueba hecha con extracto crudo se hizo la evaluación de la concentración del material pigmentante, mediante una cuantificación espectrofotométrica, como se describe anteriormente, y el valor fué de: 4.32 g de pigmentos totales (Carotenos y Xantofilas) por kilogramo de material seco; de acuerdo con éste valor se prepararon las dietas según los niveles especificados.

Al final de la prueba se hizo la evaluación visual de la calidad del pollo en cuanto a pigmentación de piel, dando como resultado que fué muy deficiente en los 5 primeros niveles y solamente en el nivel 6, o sea, el de 80 mg de pigmentos de Spirulina entera / Kg de alimento hubo una muy buena pigmentación de los pollos; no se pudo hacer una comparación entre los diferentes niveles, ya que en la mayoría de ellos la pigmentación fué mala. Esto es debido a que el material pigmentante usado en extracto se descompone fácilmente con la luz y con el oxígeno del medio, por lo cual no se fijó en el pollo.

La dieta usada para pollos en etapa finalizadora se dá en el siguiente Cuadro # 1.

CUADRO No. 1

DIETA PARA POLLOS DE ENGORDA FINALIZADOR

	<u>%</u>
Sorgo -----	66.1
Pasta de Soya -----	20.5
Pasta de Ajonjolí -----	2.0
Harina de Pescado -----	7.5
Roca Fosfórica -----	3.0
Sal -----	0.4
Premezcla Vitamínica y Mineral -----	0.5 <u>1/</u>

1/ Incluye 0.180 % de DL-Metionina.

Prueba # 2.- Esta prueba se realizó para encontrar el nivel óptimo de pigmentación para pollos de engorda usando diferentes niveles. Al final de la prueba se hizo una evaluación visual en torsos, piel y grasa de las aves, para lo cual fué necesario matar una de las aves de cada tratamiento para poder establecer cual fué el mejor y se encontró que fué el de 80 mg de pigmentos / Kg de alimento. Los resultados de ganancia de peso, consumo de alimento y consumo de pigmentos se dan en el Cuadro No. 2.

Prueba # 3.- Cuando se tuvo el valor óptimo de pigmentos para la Spirulina se comparó ésta con otros materiales pigmentantes ya conocidos y usados en sus niveles óptimos, para conocer las ventajas que podían ofrecer unos con respecto a otros. La prueba se siguió como se describe anteriormente en el método.

Se cuantificaron los pigmentos de la Spirulina y del Zempazuchil, para sacar la cantidad que se iba a usar de cada material, los resultados fueron: Spirulina = 4.32 g de pig. / Kg de material seco; Zempazuchil = 7.8 g de pig. / Kg de material seco.

Los resultados de los datos que se tomaron cada semana de ganancia de peso del ave, consumo de alimento, consumo de pigmentos y evaluación visual del pollo se dan en el Cuadro

No. 3. La diferencia de color que hubo entre cada tratamiento se puede apreciar en las fotografías A, B, C, D y E.

Al final de la prueba se mató un ave de cada tratamiento, para hacer una cuantificación de los pigmentos fijados en piel y en grasa, los resultados se dan en los Cuadros No. 4 y 5 respectivamente. Los pigmentos naturales del ave (dieta base) se restaron a cada tratamiento para tener solamente la cantidad del material pigmentante usado.

Prueba # 4.- En ésta prueba donde se empezó a trabajar con gallinas ponedoras se trató de encontrar el nivel óptimo de pigmentación en yema de huevo, siguiendo la prueba como se describe anteriormente.

Al final de la prueba se tuvo que, al hacer la evaluación visual de la yema con el Abanico Colorimétrico de Roche, el nivel de 30 mg de pigmentos / Kg de alimento tenía un valor de 12 que es el máximo en el abanico y los niveles de 40 y 50 mg de pigmentos / Kg de alimento tenían una coloración naranja muy intensa que se salía fuera de los valores del Abanico Colorimétrico.

La dieta usada para Gallinas Ponedoras se dá en el Cuadro No. 6.

CUADRO No. 2

TRATAMIENTO	PESO DE LAS AVES (g)	GANANCIA DE PESO (g)	CONSUMO DE ALIMENTO (g)	CONVERSION ALIMENTICIA	CONSUMO DE SPIRULINA (g)
1.- (dieta base)	1420	1120	3200	2.85	0
2.- 20 mg pig/Kg de alim.	1340	1025	3273	3.19	15.6
3.- 40 mg pig/Kg de alim.	1467	1152	3151	2.73	30.0
4.- 60 mg pig/Kg de alim.	1370	1065	3320	3.12	47.5
5.- 80 mg pig/Kg de alim.	1400	1095	3400	3.10	64.7

CUADRO No. 3

TRATAMIENTO	PESO DE LAS AVES (g)	GANANCIA DE PESO (g)	CONSUMO DE ALIMENTO (g)	CONVERSION ALIMENTICIA	CONSUMO DE PIGMENTOS (mg)	CALIDAD DEL POLLO
1.- 0 mg / Kg	1820	995	2755	2.76	0	Blanco
2.- 2 % de alfalfa + 10 % maíz amarillo	1765	920	2605	2.83	28.7	Regular
3.- 50mg carofil amarillo + 30mg carofil rojo	1890	1045	2765	2.64	221.2	Buena
4.- 80 mg de pigmentos de zempazuchil.	1720	890	2765	3.10	221.2	Muy buena
5.- 80 mg de pigmentos de Spirulina.	1715	865	2460	3.84	196.8	Muy buena



A



B



C



D



E

CUADRO No. 4

PIGMENTACION EN PIEL

TRATAMIENTO	CONSUMO DE ALIMENTO (g)	CONSUMO DE PIGMENTOS (mg)	PIGMENTOS FIJADOS (mg)	% DE FIJACION
1.- 0 mg / Kg	2755	0	6.3	0
2.- 2 % de alfalfa + 10 % maíz amarillo.	2605	28.7	20.0	69.68
3.- 50mg carofil amarillo + 30mg carofil rojo.	2765	221.2	86.0	38.88
4.- 80 mg de pigmentos de zempazuchil.	2765	221.2	100.0	45.21
5.- 80 mg de pigmentos de Spirulina.	2460	196.8	130.0	66.06

CUADRO No. 5

PIGMENTACION EN GRASA

TRATAMIENTO	CONSUMO DE ALIMENTO (g)	CONSUMO DE PIGMENTOS (mg)	PIGMENTOS FIJADOS (mg)	% DE FIJACION
1.- 0 mg / Kg	2755	0	3.7	0
2.- 2 % de alfalfa + 10 % maíz amarillo.	2605	28.7	4.7	16.38
3.- 50mg carofil amarillo + 30mg carofil rojo.	2765	221.2	6.8	3.07
4.- 80 mg de pigmentos de zempazuchil.	2765	221.2	9.4	4.25
5.- 80 mg de pigmentos de Spirulina.	2460	196.8	8.8	4.47

CUADRO No. 6

DIETA PARA GALLINAS PONEDORAS

	<u>%</u>
Sorgo -----	66.071
Pasta de Soya -----	12.500
Pasta de Ajonjolí -----	8.000
Harina de Pescado -----	4.000
Roca Fosfórica -----	4.000
Carbonato de Calcio -----	4.500
Sal -----	0.400
Premezcla Vitamínica -----	0.500
Metionina -----	0.029

Prueba # 5.- En ésta prueba donde se hicieron los niveles más espaciados se tuvieron los siguientes resultados: Al hacer la evaluación visual del color de la yema, se vió que desde el nivel de 20 mg de pigmentos / Kg de alimento la pigmentación era muy buena, pero debido a las exigencias del mercado se estableció que el nivel óptimo de pigmentación en yema de huevo era el de 30 mg de pigmentos de Spirulina / Kg de alimento. La diferencia de color en las yemas de cada tratamiento se puede ver en la fotografía F.

Los datos de consumo de alimento, porcentaje de postura y consumo de pigmentos se dan en el Cuadro No. 7.

Al final de la prueba se tomó un huevo al azar de cada tratamiento y se hizo la cuantificación de pigmentos en la yema, los resultados se dan en el Cuadro No. 8.



F

CUADRO No. 7

PIGMENTACION EN HUEVO PARA PLATO

TRATAMIENTO	% DE POSTURA	CONSUMO DE ALIMENTO (g)	CONSUMO DE PIGMENTOS (mg)	INDICE DE FIG. EN LA ESCALA DE ROCHE
1.- 0 mg / Kg	41.4	3691.5	0	∠ 4
2.- 10 mg / Kg	55.5	3716.5	37.16	5
3.- 15 mg / Kg	62.0	3758.0	56.37	8
4.- 20 mg / Kg	56.4	3758.0	75.16	10
5.- 30 mg / Kg	52.1	3891.5	116.74	12

CUADRO No. 8

PIGMENTACION EN HUEVO

TRATAMIENTO	CONSUMO DE ALIMENTO (g)	CONSUMO DE PIGMENTOS (mg)	% DE POSTURA	PIGMENTOS FIJADOS (mg)	% DE FIJACION
1.- 0 mg / Kg	3691.5	0	41.4	3.4 ^{1/}	0
2.- 10 mg / Kg	3716.5	37.16	55.5	10.6	28.52
3.- 15 mg / Kg	3758.0	56.37	62.0	20.3	36.01
4.- 20 mg / Kg	3758.0	75.16	56.4	25.4	33.79
5.- 30 mg / Kg	3891.5	116.74	52.1	34.7	29.72

^{1/} - En el tratamiento 1 se encontró una fijación de pigmentos, que se debe a los pigmentos biliares propios del ave; éste valor se va a restar a los demás tratamientos, para tener solamente el valor real de la pigmentación proporcionada por la Spirulina.

V.- D I S C U S I O N Y

C O N C L S I O N E S

Comparando los resultados obtenidos con trabajos anteriores y otros productos que se usan para el mismo fin, se puede decir que a la Spirulina se le encontró un contenido total de pigmentos de 4.32 g/Kg de muestra seca (el contenido va ría de acuerdo con el tiempo que tenga la muestra, ya que los pigmentos son fácilmente oxidables y baja su contenido si no se guarda debidamente); no es tan alto como el valor del Zempazuchil, pero presenta ciertas cualidades que éste no tiene, - por ejemplo, su contenido de fibra cruda es mucho más bajo y - la proteína mucho más alta, por lo que se podría formular en dietas para aves tomando en cuenta el contenido de pigmentos y el de proteína. Con respecto a los Carofiles sintéticos se podría decir que éstos tienen un costo mucho más elevado que el de cualquier pigmentante natural.

Por los resultados que se obtuvieron en animales, se puede decir que la pigmentación en piel, grasa y yema de huevo resultó satisfactoria tanto en apreciación visual como en fijación; fué semejante a la producida por el zempazuchil que es - el producto utilizado ampliamente en nuestro País para colorear pieles y huevo, y fué superior a la pigmentación producida por la alfalfa y los carofiles sintéticos.

De acuerdo con esto se puede concluir que la Spirulina se puede comparar con los materiales pigmentantes usados comúnmente y usarse con buenos resultados.

VI.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- 3rd International Congress of Food Science and Technology.
Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae -
(Spirulina) and Their Possible Use in Food Formulations.
Washington, D.C., August 9-14, 1970.
Ref. I.F.P. 18:532.

- 2.- Hubert Durand Chastel. 1970.
La Spirulina: Una fuente de proteínas.
Primer Simposio Mundial de Zonas Aridas.

- 3.- Association of Official Agricultural Chemist (A.O.A.C.).
Official Methods of Analysis. Eleventh Edition (1970).

- 4.- Harold H. Strain Ph.D.
Chromatographic Adsorption Analysis.
Interscience Publishers, Inc. (1945).
New York, N.Y.

- 5.- F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd.
Determination of the ethyl ester of -apo-8'-carotenoic acid and of the major Xanthophyll Components in -
Feeding Stuffs.
Vitamin Department, (1962).

92445
1335

- 6.- J. Friend, T.O.M. Nakayama.
A Rapid Method for Determining the Constituent Components in Carotenoid Extracts from Leaf Tissue.
Analyst, 1959, 84:654-655.

- 7.- H.R. Bolliger and A. König.
Thin-Layer Chromatography.
Vitamins, Including Carotenoids, Chlorophylls and Biologically Active Quinones.
2nd Edition. Pag. 266-273.

- 8.- Kurt Randerath.
Thin-Layer Chromatography.
Verlag Chemie. Academic Press (1964). Pag. 152-156.

- 9.- Egon Stahl.
Thin-Layer Chromatography.
A Laboratory Handbook.
New York, 1965. Pag. 214-219.

- 10.- Bickoff E.M., A.L. Livingston, J. Guggolz and C.R. -
Thompson.
Comparative evaluation of antioxidants for carotene.
J. Am. Chem. Soc., 1952, 29:445-446.

- 11.- Brambila S., J.A. Pino and Carmen Mendoza.

Studies with a natural source of xanthophylls for the pigmentation of egg yolks and skin of poultry.

Poultry Sci., 1962, 41:1629.

- 12.- Ashton H.E., and D.A. Fletcher.

Development and use of color standards for egg yolks.

Poultry Sci., 1962, 41:1903-1909.

- 13.- Forsythe R.H.

Report on color in eggs.

J. Assoc. Official Agr. Chem., 1960, 43:540.