

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE NUTRICION**



**“EFECTO DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) EN REEMPLAZO DE VITAMINA E SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y ESTADO ANTIOXIDANTE DE POLLOS DE CARNE DE 21 DIAS DE EDAD”**

**PRESENTADO POR:**

**MIGUEL EDUARDO NAVEDA CHIRINOS**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE**

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**Lima-Perú**

**2014**

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres**

Leonidas Naveda Felix y Martha Chirinos Muñoz  
Quienes con su amor, ejemplo, apoyo y sacrificio hicieron  
posible la culminación de mi carrera

### **A mis hermanos,**

Sonia, Erika, Lili y Raul  
Por sus cuidados, consejos y apoyo incondicional  
siempre

### **A mi hermana**

Sonia Naveda Chirinos que en paz descansa  
Por su cuidado, dedicación, ejemplo y paciencia  
que en vida me ofreció. Y por cuidarme desde el cielo

### **A mis abuelos,**

Por sus atenciones y cariños que en vida me dieron.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Carlos Vílchez Perales, Patrocinador del presente trabajo, por su invaluable ayuda, por su paciencia, sabios consejos y su orientación de gran maestro y guía, mi eterno agradecimiento.

A la empresa Montana S.A, por su colaboración y hacer posible la realización de este trabajo.

A los ingenieros Valentino Arnaiz y Alessandra Bolaños y al Dr. Alfredo Condemarín por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo, por sus sugerencias y apoyo brindado en todo momento, mi más sincero agradecimiento.

A mi mejor amigo Lic. Carlos López y mi mejor amiga Ing. Raquel Taipe por apoyarme incondicionalmente durante la realización del presente trabajo.

A mis amigos Alex, Felipe, Lucho, Luis, Israel, Cesar, Cristian y a todo el personal de UNMSM que me ayudaron en la realización de esta tesis, muchas gracias.

A mi gran amiga, compañera y enamorada Jhenny Jara que me ayudo y me acompañó en la realización de esta investigación

**“EFECTO DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) EN REEMPLAZO DE VITAMINA E SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y ESTADO ANTIOXIDANTE DE POLLOS DE CARNE DE 21 DIAS DE EDAD”**

**RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del extracto de semilla de achiote (ESA) en reemplazo de vitamina E sobre la respuesta productiva y estado antioxidante de pollos de carne de 21 días de edad. Para realizar la medición de los parámetros productivos y el estado antioxidante se utilizaron 200 pollos machos de la línea Cobb 500, divididos en 5 tratamientos (40 animales por tratamiento) y 4 repeticiones por tratamiento, teniendo una duración de 21 días. Los tratamientos fueron: T1, Dieta control suplementada con 80 UI de vitamina E; T2, Dieta suplementada con 60 UI de vitamina E y 20 UI de ESA; T3, Dieta suplementada con 40 UI vitamina E y 40 UI de ESA; T4, Dieta suplementada con 20 UI de vitamina E y 60UI de ESA y T5, Dieta suplementada con 80 UI de ESA. Los resultados en este estudio demostraron que el tratamiento control (T1) y el tratamiento suplementado con 80 UI de ESA (T5) mostraron el mismo efecto sobre los parámetros productivos, sin embargo el tratamiento que reemplazo el 50% de vitamina E (T3) obtuvo un mejor comportamiento productivo, del mismo modo la actividad antioxidante medido a través de la peroxidación lipídica y la actividad de la superóxido dismutasa no mostro diferencias en los tratamientos. En conclusión, el reemplazo de vitamina E por ESA en premezcla de pollos de carne no altera los parámetros productivos y la actividad antioxidante.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
I. INTRODUCCION .....	1
II. REVISION DE LITERATURA .....	2
2.1 Extracto de la semilla de achiote ( <i>Bixa orellana l.</i> ).....	2
2.2 Vitamina E.....	3
2.3 Importancia de vitamina E en las dietas para las aves .....	4
2.4 Reemplazo de la vitamina E por un producto antioxidante .....	6
2.5 Medición de la actividad antioxidante .....	8
2.5.1 Peroxidación lipídica .....	8
2.5.2 Actividad de la superóxido dismutasa .....	9
III. MATERIALES Y METODOS .....	11
3.1 Lugar y duración.....	11
3.2 Instalaciones y equipos .....	11
3.3 Animales experimentales y distribución de las unidades experimentales .....	12
3.4 Producto evaluado.....	12
3.5 Tratamientos.....	13
3.6 Formulación y análisis químico proximal de las dietas experimentales .....	13
3.7 Manejo alimenticio .....	17
3.8 Programa sanitario .....	17
3.9 Mediciones .....	17
3.9.1 Peso vivo semanal y ganancia de peso.....	17
3.9.2 Consumo de alimento.....	18
3.9.3 Conversión alimenticia.....	18
3.9.4 Análisis de la actividad antioxidante.....	19
3.9.4.1 Peroxidación lipídica .....	19

3.9.4.2 Actividad de la superóxido dismutasa.....	20
3.10 Diseño Estadístico .....	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSION .....	21
V. CONCLUSIONES .....	26
VI. RECOMENDACIONES .....	27
VII. BIBLIOGRAFIA.....	28
VIII. ANEXOS .....	36

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Recomendaciones o Requerimientos de vitamina E en pollos de carne	6
2. Composición y valor nutricional calculado de las dietas experimentales	14
3. Análisis químico proximal de las dietas experimentales	15
4. Composición de las premezclas experimentales por tonelada en la etapa de inicio (1-21 días).	16
5. Comportamiento productivo de pollos de carne alimentados con las dietas experimentales (21 días)	22
6. Efecto del reemplazo de vitamina E por el extracto de semilla de achiote (ESA) sobre los niveles de TBARS (sustancias reactivas al TBA) y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en plasma de pollos de carne de 1 a 21 días.	25

## I. INTRODUCCION

La industria avícola en el Perú es el sector más dinámico y con mayor desarrollo en el sector pecuario ya que, en el contexto latinoamericano, se encuentra entre los países de mayor producción en este sector. Esto se debe a los avances tecnológicos en genética, nutrición, sanidad, manejo e instalaciones, logrando fortalecer la productividad en comparación con otras especies. Además otro factor positivo, es la preferencia del consumidor por la carne de pollo que ha ocasionado que el consumo per cápita aumente en el Perú a diferencia de años anteriores.

Asimismo, este crecimiento se ha visto amenazado por la crisis económica en el mercado mundial, provocando un incremento en los costos de producción por el precio de ingredientes, aditivos no nutricionales y vitaminas. La vitamina que ha visto incrementado su precio es la vitamina E, nutriente importante en la dieta de aves, debido a sus propiedades antioxidantes, las cuales están relacionadas con el crecimiento óptimo y un mejor desempeño productivo, ante esta situación los productores consideran importante reemplazar la vitamina E mediante la evaluación de productos de origen natural que presenten componentes antioxidantes los cuales pudieran tener efectos sobre la respuesta productiva de pollos de carne, que maximicen el estatus antioxidante y que disminuyan el requerimiento de la vitamina E en la premezcla de aves. Uno de estos productos es el extracto de la semilla de achiote; subproducto oleoso que se extrae de la oleoresina del achiote la cual está constituido por isómeros de la vitamina E.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del extracto de la semilla de achiote (*Bixa orellana l.*) en reemplazo de vitamina E sobre la respuesta productiva y estado antioxidante de pollos de carne de 21 días de edad medido a través de la peroxidación lipídica y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en plasma.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Extracto de la semilla de achiote (*Bixa orellana l.*)

El ESA se obtiene de la oleorresina de la semilla de achiote, que es un subproducto de la extracción de un colorante, conocido como annatto que contiene pigmentos carotenoides (Bixina y Norbixina) de importancia industrial (Smith, 2006).

El proceso empieza cuando la semilla de achiote se somete a un proceso de extracción por lixiviación o disolvente orgánico, obteniéndose como productos la bixina y norbixina y como subproductos la Oleorresina y la Semilla Despigmantada; siendo la oleorresina, la parte lipídica, cuya densidad varía de líquido a sólido viscoso y está constituido por carotenoides y antioxidantes naturales (Soto, 1994).

El ESA se extrae de la oleorresina (parte lipídica del achiote) con un disolvente (n-hexano) y se aísla por cromatografía en capa fina. El producto que se forma es un aceite que presenta en su composición isómeros de la vitamina E, como los tocotrienoles en especial del  $\delta$  tocotrienol (Frega *et al.*, 1998). La presencia de estos componentes en el ESA le confiere propiedades antioxidantes, frente a la peroxidación lipídica (Haila *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 1993).

Las propiedades antioxidante de los tocotrienoles fueron estudiados por Serbinova *et al.* (1991), quienes mencionan que la capacidad antioxidante de los tocotrienoles se debe a tres funciones: mejor eficacia en el reciclado de radicales, mejor distribución en la bicapa de la membrana y captación de radicales libres.

Los estudios *in vitro* sobre la capacidad antioxidante de los tocotrienoles demuestran que el  $\gamma$  y  $\delta$  tocotrienol son cuatro veces más eficiente en la eliminación de radicales peróxido que otros isómeros tocotrienoles (Qurechiet *et al.*, 2000). Por otro lado los tocotrienoles son absorbidos más fácilmente por el organismo que los tocoferoles (Ikeda, 2003), más aun los tocoferoles interfieren con la absorción de los tocotrienoles (Hasselwander, 2002).

## 2.2 Vitamina E

Esta vitamina pertenece a las vitaminas liposolubles y es el antioxidante natural más importante de las membranas celulares (Halliwell y Gutteridge, citado por Arslanet *al.*, 2001). La estructura general de esta vitamina está representada por un grupo hidroxilo fenólico responsable de estabilizar los radicales libres y una cadena carbonada que favorece su inserción a la región lipídica de la membrana celular (Traber y Atkinson, 2007). Sin embargo, la vitamina E presenta 8 compuestos distintos que poseen una cadena hidrocarbonada que puede ser saturada o insaturada, las cuales son denominadas tocoferoles y tocotrienoles, respectivamente, ambas cadenas están constituidos por cuatro isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) que se diferencian por el número y posición del grupo metilo unido al anillo fenólico (Shahidiet *al.*, 1992). Los tocoferoles están presentes en los aceites vegetales y partes verdes de plantas superiores (Kamal-EldinyAppelqvist, 1996). Por el contrario, los tocotrienoles, que son menos abundantes en la naturaleza, se encuentran presentes en el aceite de la fruta de palma, cascarilla de arroz, germen de trigo y avena (Drago *et al.*, 2006).

Las aves no pueden sintetizar la vitamina E y, por ello, la misma debe incluirse en su dieta, siendo la forma comercial para suplemento alimenticio el acetato de alfatocoferol (Litta et al., 2013). Su absorción en el organismo, al igual que otras vitaminas liposolubles se inicia en el intestino delgado a través de micelas y se transporta por vía sanguínea a través de las lipoproteínas del plasma al hígado (Bjornmebueet *al.*, 1990). Luego, la proteína de transferencia de alfa-tocoferol lo transporta desde el hígado a la sangre y fija a las lipoproteínas para su posterior transporte a los diversos órganos y células (Hosomi *et al.*, 1998). Por último, este nutriente se deposita en las membranas celulares y sub-celulares de las células las que son ricas en ácidos grasos y así se convierte en parte integral de estos elementos estructurales, influenciando favorablemente la fluidez, integridad estructural y funcionalidad de las membranas biológicas en todas las células del organismo (Lauridsen y Jensen, 2012).

Una de las principales funciones de la vitamina E es impedir la formación de hidroperóxidos a través de su capacidad de eliminar los radicales libres (Urano y Matsuo, 1976) disminuyendo la peroxidación de los lípidos (McDowell, 1989). Además la vitamina E es un componente importante de las membranas biológica, ya que contribuye a

su estabilidad y las protege del daño producido por la peroxidación de lípidos insaturados, en consecuencia niveles bajos de vitamina E dentro de la célula puede causar daño en la membrana celular (Tappel, 1970).

### **2.3 Importancia de vitamina E en las dietas para las aves**

Actualmente la suplementación de vitamina E en la premezcla de aves es importante, ya que este nutriente es necesario para el crecimiento, modular el sistema inmune, disminuir los efectos del estrés y para el funcionamiento normal del sistema reproductor; además mejora el valor nutricional y las propiedades organolépticas de la carne y huevos (Litta *et al.*, 2013).

La vitamina E modula la respuesta inmune de las aves por tres mecanismos. El primero, está relacionado con la función antioxidante, ya que la vitamina E permite contrarrestar los efectos que ejercen los radicales libres en la membrana celular. El segundo mecanismo de acción de la vitamina E está relacionado con su participación en la síntesis de eicosanoides, que regulan la producción de prostaglandinas, que es un inmunosupresor de la inmunidad celular. Por último, el tercer mecanismo está asociado con la síntesis de interferón, que participa en la defensa inespecífica del huésped contra una invasión viral (Madrigal, 1996). Este efecto de la vitamina E sobre la inmunidad de las aves se traduce a una mayor resistencia a las enfermedades por ejemplo, estudios realizados por Konjufca *et al.* (2004), concluyen que suplementación de vitamina E en dietas de pollos de carne promueve la actividad fagocítica de los macrófagos.

La mejora de los parámetros productivos es otra función importante, ya que dietas suplementadas con altos niveles de vitamina E aumenta la ganancia de peso y mejora la conversión alimenticia (Lohakareet *et al.*, 2004).

Gao *et al.* (2010) evaluó los efectos del estrés por calor sobre la respuesta productiva en pollos de carne suplementadas con vitaminas. Concluyendo que la vitamina E disminuye los efectos del estrés por calor mediante la disminución de la peroxidación lipídica en pollos.

La vitamina E es necesario para el funcionamiento normal del sistema reproductor ya que, evita la oxidación de las células involucradas en la fertilización. Por esta razón, la

suplementación de este nutriente por encima de las recomendaciones en las reproductoras hembras mejora la ovulación durante la producción de huevos, sin embargo, una cantidad inadecuada en la premezcla es perjudicial para la fertilidad, aumentando la baja incubabilidad y mortalidad embrionaria antes y después de la incubación. De igual forma la vitamina E tiene un rol importante en la fertilidad de los espermatozoides, pues ejerce su acción antioxidante en las membranas biológicas del esperma y en el plasma seminal donde lo protege de los radicales libres que atacan a los lípidos presentes en las células (Surai et al., 1992)

Existen efectos beneficiosos de incluir niveles altos de vitamina E en premezcla de aves, ya que, está relacionado con el enriquecimiento de este nutriente en los productos avícolas como el huevo y la carne, representando un vehículo perfecto para la transferencia al hombre de este nutriente de alta calidad (Surai et al., 1999). Estudios realizados por Grauet *et al.* (2001), evaluaron el efecto de suplementar vitamina E en dietas ricas de grasas insaturadas sobre la calidad de la carne. Concluyendo que la vitamina E disminuye la cantidad de ácidos poliinsaturados en la carne y mejora la calidad retrasando la oxidación.

Por otro lado los estudios realizados por Xu *et al.* (1994), indicaron que la suplementación de vitamina E incremento el desarrollo óseo en pollos de carne; asimismo, estudios realizados por Chae *et al.* (2006) demostraron que el aumento de vitamina E, en la dieta de pollos de carne, mejoro la resistencia a la rotura de tibia por lo que sugieren el papel de la vitamina E en el fortalecimiento de los huesos y mostraron la posibilidad de que inducen la deposición de calcio en los huesos.

La mayoría de los síntomas de deficiencia de vitamina E están relacionadas a desordenes en la membrana celular, debido a la degradación de los ácidos grasos insaturados ocasionando enfermedades específicas de la especie, tales como distrofia muscular, que es causada por la acumulación de peróxidos que degeneran el tejido esquelético muscular, otra enfermedad es la diátesis exudativa que se manifiesta como un severo edema generalizado, producto de un aumento en la permeabilidad capilar y por último la deficiencia de esta vitamina puede causar la encefalomacia o locura del pollo que es una ataxia que se produce por la presencia de hemorragias y edemas en el cerebelo, causada a su vez por la formación de peróxidos a partir de lípidos orgánicos (Shimada, 2009).

A fin de ejecutar las funciones mencionadas, a nivel comercial se establecen niveles de suplementación entre 5 a 10 veces los requerimientos de vitamina E fijados por el NRC (National Research Council, 1994), (Leeson *et al*, 2007). Sin embargo, las recomendaciones de vitamina E en las diferentes líneas genéticas de pollos de carne dependerán del desempeño productivo de cada línea (Sell, 1997). Los diferentes requerimientos de vitamina E por las diferentes empresas genéticas se presentan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Recomendaciones o Requerimientos de vitamina E en pollos de carne**

REFERENCIAS	FASES			
	Unidad	inicio (1-21 días)	crecimiento(21-35 días)	acabado 35-42 días
NRC (1994)*	UI	10	10	10
ROSS (2009)**	UI	75	50	50
ARBOR ACRESS (2009)**	UI	75	50	50
TABLAS BRASILEÑAS PARA AVES Y CERDOS (2011)**	UI	33	28	21
COBB 500 (2012)**	UI	80	50	50

\* Requerimientos de vitamina E

\*\* Recomendaciones de vitamina E

#### **2.4 Reemplazo de la vitamina E por un producto antioxidante**

Actualmente la vitamina E se considera no sólo como un nutriente para optimizar la producción, si no como un modulador del sistema inmunológico y un antioxidante natural para aumentar y proteger el valor de los productos avícolas. Sin embargo, en los últimos años el aumento de las vitaminas ha estimulado el interés en buscar productos antioxidantes que maximicen el estatus antioxidante de las aves o disminuyan el requerimiento de esta vitamina. (Tuoying, 2011).

Goñiet *al*. (2007), evaluaron la suplementación del extracto de semilla de uva en reemplazo de vitamina E sobre la respuesta productiva de pollos de carne. Los resultados de

este estudio evidencio que la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia no presentaron diferencias significativas en todos los tratamientos.

Giannenas *et al.* (2010), evaluó la suplementación de un antioxidante a base de un hongo comestible (*Agaricus bisporus*) en dietas con bajos niveles de vitamina E (20 mg/kg), concluyendo que la suplementación del antioxidante natural mejoro el peso final, la conversión alimenticia y también se evidencio una mayor actividad antioxidante.

Xiao *et al.* (2011), compararon en dietas de pollos cuatro tratamientos con diferentes niveles de vitamina E (VitE) y un antioxidante natural a base de alga (EcoE). Los resultados indicaron que la capacidad antioxidante, mejoro tanto con la suplementación de VitE como del EcoE. Además, los efectos antioxidantes, evaluados en pruebas genómicas, evidenciaron la participación de la vitamina E y el antioxidante a base de algas en la morfología celular, desarrollo y funcionamiento del sistema muscular, respuesta inmunitaria, así como procesos de metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Zhang *et al.* (2011), evaluó el efecto de suplementar un antioxidante a base de un extracto de jengibre en dietas de pollos de carne con bajos niveles de vitamina E, los resultados de este estudio no mostraron diferencia estadística en la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia en las dietas de inicio y crecimiento de pollos de carne.

Por otro lado Yesilbaget *al.* (2011), evaluaron el extracto de romero y aceite de romero en reemplazo de la vitamina E sobre los parámetros productivos, calidad de carcasa y la actividad de la súper oxido dismutasa en suero de pollos de carne. Concluyendo que la suplementación del extracto de romero y aceite de romero en la dieta, no afectó el consumo de alimento, pero mejoro la ganancia de peso y la conversión alimenticia en comparación con los tratamientos que fueron suplementados con vitamina E. Además, comparando los tres tratamientos, los que obtuvieron una menor oxidación en la carne fueron las dietas suplementadas con extracto y aceite de romero, siendo la dieta suplementada con aceite de romero la que menos oxidación en la carne presento. Por último, se incrementó la actividad de la enzima superóxido dismutasa en los tratamientos que fueron suplementados con extracto y aceite de romero respecto a los tratamientos que recibieron solo vitamina E.

La peroxidación lipídica y capacidad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en plasma de pollos suplementados con antioxidantes naturales y sintéticos ha sido estudiado por Vossen *et al.* (2011), mediante el análisis de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), respectivamente. Los resultados muestran que los niveles de MDA en plasma de pollos de carne no fueron influenciados por la suplementación de ningún tipo de antioxidantes, incluso todos los tratamientos presentaron rangos elevados de 13.2 a 16.2 nmol MDA/ml. Además, la suplementación de estos antioxidantes no alteraron la actividad de la enzima SOD en plasma, incluso se presentaron pequeñas variaciones entre los resultados atribuyéndose a la toma de muestras, almacenamiento y el tipo de análisis.

Sin embargo, estudios anteriores realizados por Smet *et al.* (2008), evaluaron los mismos antioxidantes sobre la peroxidación lipídica en la carne de pollos, concluyendo que todos los antioxidantes tuvieron efectos significativos en la peroxidación lipídica del tejido muscular, es más los antioxidantes sintéticos mostraron una ligera disminución en el nivel de peroxidación lipídica que los antioxidantes naturales. Esto podría indicar que después de la distribución y absorción de los compuestos antioxidantes, estos se almacenan mejor en el músculo, por lo que solo en este tejido tendrían un mayor efecto antioxidante.

## **2.5 Medición de la actividad antioxidante**

### **2.5.1 Peroxidación lipídica**

La peroxidación lipídica es una secuencia de reacciones oxidativas de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana de fosfolípidos, lo que provoca la degradación del fosfolípido, lesiones en la membrana y formación de hidrocarburos saturados. Uno de estos productos finales de este proceso es el malondialdehído (MDA) que se utiliza como un biomarcador del daño provocado por radicales libres o sustancias ROS (sustancias reactivas al oxígeno) en respuesta a un estrés oxidativo. (Georgieva, 2005).

Para determinar los niveles de MDA se utiliza el método analítico SRAT (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), también conocido por su sigla en inglés como TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances); cada mol de MDA reacciona con dos moles

de ácido tiobarbitúrico, en condiciones de bajo PH y alta temperatura, dando lugar dando lugar a un ducto MDA-TBA cromógeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría (Estepa *et al.* 2001).

Según las investigaciones, el nivel de MDA en plasma dependerá de las condiciones de crianza y edad de las aves. Por esta razón, en los estudios de Ishraga y Garsan (2011) los resultados muestran niveles de 9.39 a 14.59 nmol MDA por mililitro de plasma en pollos de un día de edad sometidos a estrés. Sin embargo, los estudios de Koinarski *et al.* 2006, evidenciaron niveles de 2.50 a 2.78 nmol MDA por mililitro de plasma en pollos de 20 días de edad sometidos a diferentes grados de estrés. Ante estos resultados, es importante cumplir con las recomendaciones de suplementación de la vitamina E y otros antioxidantes en la dieta de las diferentes líneas genéticas de pollos de carne, con el propósito de disminuir los efectos del estrés y potenciar un óptimo desempeño productivo (Coelho, 2000).

### **2.5.2 Actividad de la superóxido dismutasa**

La enzima superóxido dismutasa es uno de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más eficaces, cataliza la conversión de radicales superóxido en moléculas de oxígeno y peróxido de hidrógeno (Rahman, 2007). En las células eucariotas existen dos formas de este enzima, una variante que contiene manganeso (Mn-SOD) localizada en la mitocondria y una variante citoplasmática que incorpora cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) (Fridovich, 1997). Por ende, el funcionamiento de la enzima superóxido dismutasa depende de la suplementación de cobre y zinc en la dieta (Bozcaya *et al.* 2001).

El incremento de la actividad de la superóxido dismutasa evidenciaría el resultado de la necesidad de una mayor protección frente a elevadas concentraciones del radical superóxido, debido a un desequilibrio pro oxidante y oxidante. Sin embargo, por sí solo la capacidad antioxidante de la SOD no responde a una mayor producción de superóxido, ya que se incrementa la producción de pro oxidantes en células que han sufrido un estrés oxidativo (Seclénet *et al.* 2006). Por esta razón, es importante la suplementación de vitamina E en la dieta ya que, acentúa el efecto antioxidante endógeno probablemente debido a la síntesis de la enzima y al aumento de la activación de la enzima superóxido dismutasa, lo

que provocaría un incremento en la actividad de esta enzima a nivel celular (Llorens *et al.*, 2010).

Tras *et al.* (2000), demostraron que la actividad de la enzima superóxido dismutasa se incrementó en suero de pollos de carne debido a la suplementación de vitamina E y Se en la dieta. Por otro lado, Vossen *et al.* (2011) concluye que la suplementación de antioxidantes en la dieta no altera la actividad de la SOD en plasma de pollos de carne. Sin embargo, los valores reportados en estos estudios no son numéricamente mayores en comparación a los reportados por Koinarski *et al.* (2006) y Georgieva *et al.* (2011), quienes reportan una mayor actividad antioxidante en los eritrocitos. La razón es que, estas células están expuestas a una alta tensión de oxígeno y en una situación de estrés oxidativo, la SOD tienen mayor actividad (Arnao *et al.*, 2012).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 Lugar y duración**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de Laboratorio Experimental de Patología Aviar de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, distrito San Luis, Lima, teniendo una duración de 21 días comprendidos entre Febrero y Marzo del 2013.

Los análisis de peroxidación lipídica y actividad de la SOD en plasma se realizaron en el Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2 Instalaciones y equipos**

Para el alojamiento de las aves se utilizaron baterías de tres pisos con una división en cada piso, es decir 6 jaulas por baterías. Se utilizó 20 jaulas de estructura metálica, con piso alambrado de fierro galvanizado y en la parte inferior de cada una bandeja acondicionada para colección de excretas, siendo cada jaula una unidad experimental.

El ambiente interno del microclima se preparó dos días antes de que lleguen los pollitos BB, utilizándose bebederos tongos de plástico y bandejas de alimento de plástico, que posteriormente fueron reemplazados por bebederos lineales y comederos lineales de fierro galvanizado.

Para la medición de la temperatura se usó un termómetro digital y un termómetro automático, la cual marcaba la temperatura cada 10 minutos. La temperatura de recepción fue de 35°C, y fue disminuyendo paulatinamente hasta llegar a 24°C.

Equipos utilizados:

- Comederos BB de bandeja de plástico
- Comedero lineal de aluminio
- Bebederos tongo de plástico
- Bebederos lineales de aluminio

- Focos 100 watts
- Termómetros ambientales
- Termómetros digitales
- Tela arpillera polipropileno
- Balanza de 20 Kg

### **3.3 Animales experimentales y distribución de las unidades experimentales**

Se utilizaron 200 pollitos BB machos de un día de edad, de la línea genética Cobb 500, obtenidos de la incubadora Guillermo Li, las aves fueron distribuidas al azar en 20 jaulas de 10 aves cada una. Tomándose como unidad experimental cada jaula; de esta forma se tuvo 4 repeticiones con un total de 40 aves por tratamiento.

### **3.4 Producto evaluado**

El extracto de la semilla de achiote (ESA) es un aceite que se extrae de la oleorresina la cual se forma como subproducto de la extracción de los colorantes (bixina y norbixina) de la semilla de achiote (*Bixa orellana l.*). Sin embargo, en este estudio para facilitar su mezclado en el alimento se transformó a polvo, usando maíz molido como vehículo. Esta mezcla contiene 20% del aceite de ESA.

La capacidad antioxidante del extracto de achiote (ESA) medido a través de valores ORAC equivale a 3,229 micro moles de vitamina E. El contenido de isómeros de la vitamina E en el ESA es: 84.48 g de tocoferoles totales g/kg y 149.76 g/kg de tocotrienoles totales.

### **3.5 Tratamientos**

En el experimento se evaluaron 5 niveles de reemplazo de la vitamina E por el ESA en la etapa de inicio de pollos de carne, los cuales se mencionan a continuación.

Tratamiento 1	:	80 UI de VIT E
Tratamiento 2	:	60 UI de VIT E y 20 UI de ESA
Tratamiento 3	:	40 UI de VIT E y 40 UI de ESA
Tratamiento 4	:	20 UI de VIT E y 60 UI de ESA
Tratamiento 5	:	80 UI de ESA

Las cantidades son en UI/kg de alimento, tanto de vitamina E como de ESA.

### **3.6 Formulación y análisis químico proximal de las dietas experimentales**

Las dietas utilizadas en el presente estudio, se formularon por computadora, usando el Programa DAPP Nutrition, de acuerdo a los requerimientos de macronutrientes y micronutrientes usados por la línea COBB 500 (2012).

La composición porcentual y valor nutricional calculado de las dietas experimentales se observan en el Cuadro 2. La composición del análisis químico proximal, se presentan en el Cuadro 3. Asimismo, la composición de la premezcla vitamínico mineral usado en el presente estudio se presenta en el Cuadro 4.

**Cuadro 2. Composición y valor nutricional calculado de las dietas experimentales**

	TRATAMIENTOS				
	1	2	3	4	5
Maíz molido	58.620	58.580	58.540	58.390	58.460
Torta de soya	33.570	33.580	33.580	33.610	33.590
aceite crudo de soya	3.710	3.720	3.740	3.790	3.770
Fosfato dicalcico	1.850	1.850	1.850	1.850	1.850
Carbonato de calcio	0.770	0.770	0.770	0.770	0.770
Sal común	0.460	0.460	0.460	0.460	0.460
DL- 2Metionina	0.290	0.290	0.290	0.290	0.290
Lisina HCL	0.190	0.190	0.190	0.190	0.190
PM. MONTANA*	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150
Cloruro de colina 60%	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Microsecuestrante	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Treonina L	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040
Zinc bacitracina 10%	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
Coccidiostato	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
Antifungico	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
ESA**	0.000	0.020	0.040	0.060	0.080
<b>TOTAL</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>

## Valor nutricional calculado:

Energía metabolizable Kcal/kg	3072	3072	3072	3072	3072
Proteína cruda, %	20.50	20.50	20.50	20.50	20.50
Lisina total, %	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26
Metionina + Cistina, total %	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94
Treonina total, %	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82
Triptófano total, %	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Calcio, %	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87
Fosforo disponible, %	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
Sodio, %	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

\*Para T1=PM1; T2=PM2; T3=PM3; T4=PM4; T5=PM5. (Ver Cuadro 4),

\*\*ESA= Extracto de semilla de achiote

**Cuadro 3. Análisis químico proximal de las dietas experimentales**

	<b>TRATAMIENTOS<sup>1</sup></b>				
	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
<b>Humedad, %</b>	12.30	11.80	12.40	12.25	11.95
<b>Proteína total, %</b>	20.02	20.40	20.33	20.18	20.44
<b>Extracto Etéreo, %</b>	6.25	6.33	6.40	6.50	6.95
<b>Fibra Cruda, %</b>	2.33	2.60	2.45	2.03	2.38
<b>Cenizas, %</b>	5.12	4.99	5.00	5.20	5.35
<b>Extracto libre de nitrógeno, %</b>	53.98	53.88	53.42	53.84	52.93

Fuente: Laboratorio de la Unidad Fisicoquímica e Instrumental de Montana S.A.

<sup>1</sup> Tratamiento: T1: (80 UI de vitamina E, 20 UI de ESA); T2: (60 UI de vitamina E, 20 UI de ESA); T3: (40 UI de vitamina E, 40UI de ESA); T4: (20 UI de ESA, 60 de vitamina E); T5: (80 UI de ESA)

**Cuadro 4: Composición de las premezclas experimentales por tonelada en la etapa de inicio (1-21 días).**

NUTRIENTES	PREMEZCLAS				
	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5
Vitamina A, UI	13,000,000	13,000,000	13,000,000	13,000,000	13,000,000
Vitamina D3, UI	5,000,000	5,000,000	5,000,000	5,000,000	5,000,000
Vitamina E, UI	<b>80,000</b>	<b>60,000</b>	<b>40,000</b>	<b>20,000.00</b>	<b>0.00</b>
vitamina k3, g	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Tiamina, g	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Riboflavina, g	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
Niacina, g	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00
Acidopantotenico, g	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Vitamina B6, g	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Ácido fólico, g	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Biotina, g	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Vitamina B12, g	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Manganeso, g	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Zinc, g	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Hiero, g	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
Cobre, g	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Yodo, g	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Selenio, g	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Dosis, Kg	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50

*PM1: 80 UI/Kg alimento; PM2: 60 UI/Kg alimento; PM3: 40 UI/Kg alimento; PM4: 20 UI/Kg alimento; PM5: 0 UI/Kg alimento*

### **3.7 Manejo alimenticio**

La presentación física del alimento utilizado en la experimentación fue en polvo. El suministro de alimento era constante, evitando que los comederos estén vacíos, pero calculando que para el día de la evaluación de los pesos, se encontrara la menor cantidad de alimento posible, para facilitar las labores. El alimento se proporcionó tres veces al día, llevando el control de alimento residual en forma diaria. El cambio de agua era diario, previa limpieza de los bebederos.

### **3.8 Programa sanitario**

Los pollitos fueron vacunados contra la enfermedad de Marek en la planta de incubación, posteriormente recibieron el día 8 vacuna contra la enfermedad Gumborovía agua de bebida.

### **3.9 Mediciones**

#### **3.9.1 Peso vivo semanal y ganancia de peso**

La medición del peso vivo se realizó semanalmente y se utilizaron todos los pollos.

$$\text{Peso vivo (kg/pollo)} = \frac{\text{Peso de las aves (kg)}}{\text{Número de pollos pesados}}$$

La ganancia de peso se determinó por la diferencia entre el peso final y el inicial

$$\text{Ganancia de peso (kg/pollo/semana)} = \text{Peso final (kg)} - \text{Peso inicial (kg)}$$

### 3.9.2 Consumo de alimento

La medición del consumo de alimento se realizó diariamente, pesando el residuo de alimento contenido en el comedero y por diferencia con el total suministrado en el día anterior. El consumo de alimento semanal es la suma de todas las diferencias diarias entre la cantidad suministrada y el residuo al final de la misma.

$$\text{Consumo de alimento} = \frac{\text{Consumo de alimento semanal (kg)}}{\text{Número de pollos}}$$

(Kg/pollo/ semana)

### 3.9.3 Conversión alimenticia

En base a los datos contenidos sobre consumo de alimento y peso vivo, se calcularon la conversión alimenticia semanal y acumulada.

Conversión Alimenticia Semanal (C.A.S)

$$\text{C.A.S} = \frac{\text{Consumo de alimento semanal (kg)}}{\text{Ganancia de peso semanal (kg)}}$$

Conversión Alimenticia Acumulada (C.A.A)

$$\text{C.A.A} = \frac{\text{Consumo de alimento acumulado (kg)}}{\text{Peso final del pollo (kg)}}$$

### **3.9.4 Análisis de la actividad antioxidante**

El método usado para la extracción de sangre fue por el método del ala. El procedimiento fue el siguiente:

- a) Se colocaron a los pollos de cúbito dorsal, exponiendo el ala, para una adecuada visualización de la vena branquial.
- b) Se realiza una punción en la parte media de la vena con una aguja 20 G x 1/2" para que la sangre fluya.
- c) Con la otra mano se coloca el tubo de ensayo con anticoagulante, para permitir el llenado. Se obtuvo 2 mililitros de sangre por ave.
- d) Tras la extracción se invirtieron, suavemente el tubo para favorecer el mezclado con el anticoagulantes
- e) Luego se hizo reposar las muestras por 10 minutos aproximadamente y se procedió a centrifugar a 840 g por 10 minutos.
- f) Las muestras de plasma se almacenaron a -20° C hasta su posterior análisis.

Para determinar la actividad antioxidante en plasma se realizó la medición de la peroxidación lipídica, mediante el método de Buege y Aust (1978), y la actividad de la superóxido dismutasa, según la técnica de Marklund y Marklund (1974).

#### **3.9.4.1Peroxidación lipídica**

La peroxidación lipídica se midió a través del ensayo TBARS (sustancias reactivas al ácidotiobarbitúrico) expresada en nmol/ml, según el método de Buege y Austen (1978).

Cada muestra se mezcló con 0.5 ml de Ácidotricloroacético 10%, para ser llevado a baño maría por 15 minutos, para después ser enfriado con agua. Luego se añadió 0.75 ml Acido tiobarbiturico 0.67% en HCL 0.25N y se volvió a colocar en baño maría por 30 minutos, se retira y se enfrió en agua helada. Después de esto se somete a una centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se midió por espectrofotometría a 535 nm es un espectrofotómetro (Spectro UV-VIS double beam PC; LaboMED INC). La concentración de TBARS fue expresada en nmol de MDA por ml de plasma.

### 3.9.4.2 Actividad de la superóxido dismutasa

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) expresada en USOD/ml, fue medida mediante la técnica de Marklund y Marklund (1974).

Esta técnica consiste en la inhibición de la autoxidación del pirogalol en medio alcalino. Las mediciones se hicieron a 420 nm en un espectrofotómetro (Spectro UV-VIS doublé beam PC; LaboMED INC).

### 3.10Diseño Estadístico

El estudio se llevó a cabo bajo un Diseño Completamente al Azar (D.C.A), evaluando cinco tratamientos con cuatro repeticiones por tratamiento. Las mediciones obtenidas fueron evaluadas mediante una ANOVA usando el programa StatisticalAnalysisSystem (SAS, 1999) y la prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan (1955) entre las medias de los tratamiento a un nivel de alfa =0.05.

Modelo aditivo lineal fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

donde:

$Y_{ikj}$ = Valor de la observación

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del j-ésimo tratamiento

$e_{ij}$ = Efecto del error

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del comportamiento productivo de los pollos de carne alimentados con dietas que contiene diferentes niveles de vitamina E y extracto de achiote durante un periodo de crianza de 21 días se presentan en el Cuadro 5.

### 4.1 Peso vivo y ganancia de peso

El efecto de reemplazo de vitamina E por el extracto de semilla de achiote sobre el peso corporal y la ganancia de peso se muestra en el Cuadro 5, los promedios de peso corporal y ganancia de peso, a los 21 días se muestran en el Anexo 8. El análisis de variancia del peso final y la ganancia de peso no fueron significativamente influenciados por los tratamientos evaluados.

Aunque la prueba estadística no mostro diferencias significativas entre los tratamientos, se logró obtener un mayor peso promedio final para el tratamiento que sustituyo el 50% de la vitamina E (T3) por el ESA. Por otro lado el peso final en la dieta que recibió 80 UI de vitamina E fue levemente superior al tratamiento que recibió 80 UI de ESA.

Los resultados de ganancia de peso de las aves que recibieron las dietas experimentales se muestran en el Cuadro 5. Similar a lo observado en los promedios de pesos vivos finales ( $p>0.05$ ), no hubo diferencia significativa en ganancia de peso entre los tratamientos. Sin embargo, de igual forma el tratamiento que sustituyo el 50% de la vitamina E por el ESA obtuvo una mayor ganancia de peso frente a los otros tratamientos. Del mismo modo Goñiet *al.* (2007) y Zhang *et al.* (2009), compararon dietas con antioxidantes naturales y vitamina E. obteniendo como resultado el mismo efecto sobre el peso final y la ganancia de peso en todas las dietas de pollos de carne. Sin embargo, Giannenas *et al.* (2010), obtuvieron un incremento en el peso final y la ganancia de peso en pollos de carne suplementados con un antioxidante natural procedente de un extracto de hongos.

**Cuadro 5:** Comportamiento productivo de pollos de carne alimentados con las dietas experimentales (21 días)

Mediciones	Tratamiento*				
	1	2	3	4	5
Peso inicial, g	43.1 <sup>a</sup>	45.8 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup>	45.7 <sup>a</sup>	43.7 <sup>a</sup>
Peso final, g	999.0 <sup>a</sup>	1005.0 <sup>a</sup>	1042.5 <sup>a</sup>	1022.5 <sup>a</sup>	998.0 <sup>a</sup>
Ganancia de peso, g	955.8 <sup>a</sup>	959.1 <sup>a</sup>	997.42 <sup>a</sup>	976.7 <sup>a</sup>	954.2 <sup>a</sup>
Consumo de alimento, g	1312.5 <sup>a</sup>	1320.0 <sup>a</sup>	1326.0 <sup>a</sup>	1322.7 <sup>a</sup>	1325.2 <sup>a</sup>
Conversión alimenticia, g/g	1.373 <sup>a</sup>	1.376 <sup>a</sup>	1.329 <sup>a</sup>	1.354 <sup>a</sup>	1.389 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Valores son promedio de cuatro repeticiones de 10 aves cada una (40 aves por tratamiento)

<sup>a</sup> Valores dentro de una fila con superíndice común no difieren significativamente (p>0.05)

\* *Tratamiento: T1: (80 UI de vitamina E); T2: (60 UI de vitamina E, 20 UI de ESA); T3: (40 UI de vitamina E, 40UI de ESA); T4: (20 UI de ESA, 60 de vitamina E); T5: (80 UI de ESA)*

## **4.2 Consumo de alimento**

Los datos sobre el efecto de los tratamientos evaluados en el presente estudio sobre el consumo de alimento se presenta en el Cuadro 5 asimismo, la variación semanal y acumulado de alimento se reportan en el Anexo IV y V, respectivamente.

Los valores de consumo de alimento promedio (Cuadro 5) indican que este parámetro no fue significativamente influenciado ( $p>0.05$ ) por ninguno de los tratamientos; sin embargo el consumo numéricamente más bajo fue registrado por el tratamiento que reemplazo el 100% de vitamina E por ESA. Estos resultados concuerdan con datos reportados en la literatura (Yesilbaget *al.*, 2011, Giannenas *al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2009 y Goñiet *al.*, 2007), en los que el consumo de alimento de aves alimentada con dietas suplementadas con diferentes extractos naturales no fueron estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) de aquellas que recibieron niveles bajos de vitamina E.

## **4.3 Conversión alimenticia**

Los resultados de conversión alimenticia acumulada de los cinco tratamientos del presente estudio se muestran en el Cuadro 5. El análisis de variancia, demuestra que no existe diferencias significativas ( $p>0.05$ ), entre los tratamientos evaluados.

Las tendencias de las respuestas obtenidas en el presente estudio coinciden con los observados en la literatura. Por ejemplo, Goñiet *al.* (2007) y Yesilbaget *al.* (2011) no encontraron diferencias significativas en la conversión alimenticia de pollos de carne suplementados con extractos naturales o vitamina E en la dieta.

## **4.4 Peroxidación lipídica en plasma**

Los resultados de la peroxidación lipídica (Cuadro 6), medido a través de la concentración de nmoles MDA por ml de plasma, no mostraron diferencias estadísticas ( $p>0.05$ ) en los diferentes tratamientos del presente estudio.

Las tendencias de las respuestas obtenidas en el presente estudio coinciden con los observados en la literatura. Por ejemplo, Vossen *et al.* (2011) no encontraron diferencias

significativas en el análisis de peroxidación lipídica entre pollos de carne alimentados con dietas suplementadas con antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos. Por otro lado, existen estudios que reportan niveles bajos de MDA entre grupos de pollos de carne que fueron alimentados con dietas que contenían diferentes extractos naturales o vitamina E (Zhang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008).

#### **4.5 Actividad de la Superóxido Dismutasa en Plasma**

Se puede observar que no hubo diferencias numéricas entre los tratamientos; sin embargo, hay una tendencia al aumento de la actividad de la SOD en los tratamientos que reemplazaron la vitamina E por el ESA.

Los valores de la actividad de la SOD en plasma de pollos de carne (Cuadro 6) indican una mayor actividad en la dieta que reemplazo el 100% de la vitamina E por el ESA. Sin embargo, los resultados no coinciden por los reportados por Vossen *et al.* (2011), quienes reportan una menor actividad de la SOD en plasma de pollos de carne por la suplementación de antioxidantes naturales en la dieta, por lo que proponen que la actividad de esta enzima se ve influenciado por factores externos: la toma de muestra, almacenamiento de las mismas y el tipo de ensayo.

Las tendencias de la actividad antioxidante de la SOD en el presente estudio plantean que la suplementación de ESA en la dieta de aves no altero negativamente la función de la SOD. Sin embargo, aún no está clara el efecto de la suplementación de extractos naturales en dietas de pollos de carne sobre la actividad de las enzimas endógenas (Alia *et al.*, 2003).

**Cuadro 6:** Efecto del reemplazo de vitamina E por el extracto de semilla de achioté (ESA) sobre los niveles de TBARS (sustancias reactivas al TBA) y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en plasma de pollos de carne de 1 a 21 días.

Parámetro	Tratamiento*				
	1 <sup>1</sup>	2	3 <sup>2</sup>	4	5
TBARS (nmol/ml)	2.173 <sup>a</sup>	2.163 <sup>a</sup>	2.346 <sup>a</sup>	2.084 <sup>a</sup>	2.248 <sup>a</sup>
SOD (U/ml) <sup>3</sup>	16.00	17.75	17.00	16.80	17.55

<sup>1</sup> Valores son promedio de 4 muestras

<sup>2</sup> Valores son promedio de 5 muestras

<sup>3</sup> Valores son promedio de dos muestras

<sup>a</sup> Valores dentro de una fila con superíndice común no difieren significativamente ( $p > 0.05$ )

\*Tratamiento 1: 80 UI de vitamina E; Tratamiento 2: 60 UI de vitamina E y 20 UI de ESA; Tratamiento 3: 40 UI de vitamina E y 40 UI de ESA; Tratamiento 4: 20 UI de vitamina E y 60 UI de ESA; Tratamiento 5: 80 UI de ESA.

## V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo experimental permiten concluir lo siguiente:

1. El comportamiento productivo de los pollos de carne no fue influenciado por el reemplazo de la vitamina E por el ESA en la premezcla.
2. El reemplazo de la vitamina E por el ESA en la premezcla, no influyó la actividad de la SOD y el nivel de peroxidación lipídica en plasma de pollos de carne.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Bajo las condiciones experimentales y de acuerdo con los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación se recomienda:

1. Evaluar el reemplazo de la vitamina E por el ESA en la crianza de pollos de carne de 42 días.
2. Sustituir de manera total la vitamina E por el ESA en premezclas de inicio de pollos de carne, evaluar la peroxidación lipídica y el estado antioxidante en la carne de pollos de 42 días edad.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- ARNAO, A. I.; SUAREZ, S.; TRABUCCO, J.; CISNEROS, RUTH.; RODRIGO, M. E.2012. “Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallanthussonchifolius* (Yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén”. *Anales de la Facultad de Medicina*. 73 (3): 239-244.
- ARSLAN M.; OZCAN, M.; MATUR, E.; COTELIOGLU, U.; ERGUL, E. 2001. “The effects of vitamin E on some blood parameters in broilers”. *Turkish Journal of Veterinay and Animal Sciences*. 25: 711-716
- BJORMEBUE, A.; GUNN, E. A.; DEVRON, C. A. 1990. “Absorption, transport and distribution of vitamin E”.*Journal nutrition*. 120(3): 233-242.
- BOZCAYA, L.A.; ÖZTURK-ÜREK, R.; AYDEMIR, T.; TARHAN, L. 2001. “Effects of Se, Cu and Se + vitamin E deficiency on the activities of CuZnSOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in Chicken erythrocytes”.*Cell Biochemistry and Function* 19: 153-157.
- CHAE, B.J.; LOHAKARE, J.D.; CHOI, J.Y. Effects of incremental level of  $\alpha$ -tocopherol acetate on performance, nutrient digestibility and meat quality of commercial broilers.2006. *AsianAustralasianJournal of Animal Science*. 19(2):203-208.
- COBB 500. 2012. Suplemento informativo sobre rendimiento y nutrición en pollos de engorde COBB 500.
- COELHO, M. 2000. Poultry, swine, dairy vitamin supplementation updated.*Feedstuffs*.  
<http://www.highbeam.com/doc/1G1-64438696.html>
- DRAGO SERRANO, M. E. LOPEZ LOPEZ, M. SAINZ ESPUÑES, T.R. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(004), 58-68.

- DUNCAN, D.B. 1955. Multiple range and multiple Ftests. *Biometrics* 11: 1-41.
- ESTEPA, V; RÓDENAS, S.; MARTÍN, M.C. 2001. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anales de la real academia de farmacia*, 67(3), 1-17.
- FREGA, N.; MOZZON, M.; BOCCI, F. 1998. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass Spectrometry. *JAOCs*. 75(12): 1723-1727.
- FRIDOVICH, I. 1997. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases and related matters. *Journal of Biological Chemistry* 272: 18515-18517.
- GAO, J.; LIN, H.; WANG, X. J.; SONG, Z. G.; JIAO, H. C. 2010. Vitamin E supplementation alleviates the oxidative stress induced by dexamethasone treatment and improves meat quality in broiler chickens. *Poultry science* 89: 318-327.
- GEORGIEVA, N. V. 2005. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 8(1): 1-11.
- GEORGIEVA, N. V.; GABRASHANSKA, M.; KOINARSKI, V.; YANEVA, Z.; 2011. Zinc supplementation against *Eimeria acervulina* – induced oxidative damage in broiler chickens. *Veterinary Medicine International*.
- GIANNENAS, I.; PAPPAS, I. S.; MAVRIDIS, S.; KONTOPIDIS, G.; SKOUFOS, J.; KYRIAZAKIS, I. 2010. Performance and antioxidant status of broiler chickens supplemented with dried mushrooms (*Agaricus bisporus*) in their diet. *Poultry Science*. 89: 303-311.

- GRAU, A.; GUARDIOLA, F.; GRIMPA, S.; BARROETA, A.C.; CODONY, R. 2001. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: Influence of dietary fat and  $\alpha$  – tocopherol and ascorbic acid supplementation. Poultry Science. 80: 1630 -1642.
- GOÑI, I.; BRENES, A.; CENTENO, C.; VIVEROS, A.; SAURA-CALIXTO, F.; REBOLÉ, A.; ARIJA, I.; ESTEVEZ, R. 2007. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrition digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. Poultry Science. 86: 508-516.
- HOSOMI, A.; GOTO, K.; KONDO, H.; IWATSUBO, T.; YOKOTA, T.; OKAWA, M.; ARITA, M.; AOKI, J.; ARAI, H.; INOUE, K. 1998. Localization of alpha – tocopherol transfer protein in rat brain. Neuroscience Letters. 256 (3): 159-162.
- HAILA, K. M.; LIEVONEN, S.M.; HEINONEN, M.I. 1996. Effects of lutein, lycopene, annatto, and gamma-Tocopherol on autoxidation of triglycerides, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44(8): 2096-2100.
- HASSELWANDER O, KRAMER K, HOPPE P P. 2002. Effects of feeding various sources on plasma lipids and aortic atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. Food Research International. 35(2-3): 245-51.
- IKEDA, S.; TOHYAMA, T.; YOSHIMURA, H.; HAMAMURA, K.; ABE, K.; YAMASHITA, K. 2003. Dietary alpha-tocopherol decreases alpha-tocotrienol but not gamma-tocotrienol concentration in rats. Journal of Nutrition. 133(2): p. 428-34.
- ISHRAGA G, IBRAHIM and YARSAN E. 2011. Enrofloxacin drug induced reactive oxygen species. Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences. 1(8). 489-491

- KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31:671–701.
- KOINARSKI, V.; GABRASHANSKA, M.; GEORGIVA, N.; PETKOV, P. 2006. Antioxidant parameters in eimeria acervulina infected chicks after treatment with a new zinc compound. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 50: 55-61.
- KONJUFCA, V. K.; BOTTJE, W. G.; BERSI, T.K.; ERF, G.F. 2004. Influence of dietary vitamin E on phagocytic functions of macrophages in broiler. *Poultry Science* 83:1530-1534.
- LAURIDSEN, C.; JENSEN, S. K. 2012. Alfa tocoferol incorporation in mitochondria and microsomes upon supranutritional vitamin E supplementation. *Genes Nutrition* 7(4): 475-482.
- LEESON, S. 2007. Vitamin requirements: Is there a basis for re-evaluating dietary specifications? *World's Poultry Science Journal*. 63:255–266.
- LITTA, G.; CHUNG, T.K.; WEBER, G.M. 2013. La vitamina E: un nutriente esencial para la salud y el rendimiento animal. Artículo Técnico de la Revista Actualidad Avipecuaria. <http://www.actualidadavipecuaria.com/dsm/articulos/vitamina-e-nutriente-esencial.html>
- LOHAKARE, J. D.; CHOI, J. Y.; KIM, J. K.; YONG, J. S.; SHIM, Y. H.; HAHN, T. W.; CHAE, B. J. 2004. Effects of dietary combinations of vitamin A, E and methionine on growth performance, meat quality and immunity in commercial broilers. *Asian – Australasian Journal of Animal Sciences*. 18(4): 516-523.
- LLORENS, C.; BÁEZ, MC.; TARÁN M.; CAMPANA, V.; FONSECA, I.; OYOLA, E.; PALMA, J.; MOYA M. 2010. Papel antioxidante de la vitamina E en la

aterogénesis inducida por hiperfibrinogenemia. Revista Argentina de Cardiología. 78 (5). 405 – 410

MADRIGAL, SERGIO R. La vitamina E y la inmunidad en aves. 1996. Nutrición Animal Tropical.[http://www.cina.ucr.ac.cr/recursos/docs/Revista/la vitamina E y la la inmunidad de las aves. pdf.](http://www.cina.ucr.ac.cr/recursos/docs/Revista/la%20vitamina%20E%20y%20la%20inmunidad%20de%20las%20aves.pdf)

MCDOWELL L.R. 1989. Vitamins in Animal Nutrition. Comparative Aspects to Human Nutrition. Vitamin A and E. Academic Press, London. 10-52, 93-131.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). 1994. Nutrient Requirements of Poultry. National Academy Press. 157p.

QURECHI, A. A.; MO, H. 2000. Isolation and structural identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant and antitumor properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 131: 223-230.

RAHMAN K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Journal of Clinical Interventions in Aging. 2(2):219-36.

ROSS. Suplemento de Nutrición del Pollo de Engorde. 2009. 21p.

SECLÉN SANTISTEBAN SEGUNDO, BARACCO MAGGI ROSSANA, MOHANNA BARRENECHEA SALIM. 2006. Antioxidante en poblaciones adultas del nivel del mar y de grandes alturas: Actividad de la superóxido dismutasa. Revista Médica Herediana. 17(1): 4-7.

SELL, J. L. 1997. Últimos avances en la nutrición de aves. XII curso de especialización. Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal. Madrid.

- SERBINOVA E, KAGAN V, HAN D, PACKER L. 1991. Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radical Biology & Medicine*. 10 (5):263–275.
- SHAHIDI, F.; JANITHA P.K.; WANASUNDARA, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*. 32(1): 67-103.
- SHIMADA, MIYASAKA. 2009. *Nutrición Animal*. México: Trillas. 397p.
- SHIRO URANO, MITSUYOSHI MATSUO, 1976. A radical scavenging reaction of alfatocopherol with methyl radical. *Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*, 35(1), 380-383.
- SMET, K.; RAES, K.; HUYGHEBAERT, G.; HAAK, L.; ARNOUITS, S.; DE SMET, S. 2008. Lipid and protein oxidative of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. *Poultry Science*. 87: 1682-1688.
- SMITH JAMES. 2006. Annatto extracts. Chemical and Technical Assessment. <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/67/annatto.pdf>
- SOTO DURAN, T.A. 1994. Evaluación de diferentes niveles de oleoresina de achiote en dietas en base a maíz sobre la pigmentación de la yema de huevo. Tesis. UNALM.
- SURAI, P.; IONOV I. 1992. Vitamin E in goose reproduction. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Waterfowl*. 83-85.
- SURAI, P.F.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K. 1999. Relationship between vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick. *British Poultry Science*. 40: 406-410.

- SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; WASSALL, S.R.; CHOO, Y.M.; GOVIL, G; KAGAN, V.E.; PACKER, L. 1993. Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*. 32 (40):10692–10699.
- TABLAS BRASILEÑAS PARA AVES Y CERDOS. 2011. Universidad federal de Vicosa. Departamento de Zootecnia. 259p.
- TAPPEL, A.L. 1970. Biological antioxidant protection against lipid peroxidation damage. *American Journal of Clinical Nutrition*. 23(8): 1137-1139.
- TRABER, M. G.; ATKINSON, J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*. 43(1): 4-15.
- TRAS, B.; INAL, F; BAS, A.L.; ALTUNOK, V.; ELMAS, M.; YAZAR, E. 2000. Effects of continuous supplementations of ascorbic acid, aspirin, vitamin E and selenium on some haematological parameters and serum superoxide dismutase level in broiler chickens. *British Poultry Science*. 41: 664-666.
- TUOYING, A.O. 2011 Reemplazo de vitamina E con un producto antioxidante en dietas para aves. *Industria Avicola*. 58(2), 22-23.
- VOSEN, E.; NTAWUBIZI, M.; RAES, K.; SMET, K.; HUYGHEBAERT, G.; ARNOOTS, S.; DE SMET, S. 2011. Effect of dietary antioxidant supplementation on the oxidative status of plasma in broiler. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 95: 198-205.
- WANG, M. L.; SUO, X.; GU, J. H.; ZHANG, W. W.; FANG, Q.; WANG, X. 2008. Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: Effect on chicken coccidiosis and antioxidant status. *Poultry Science*. 87: 2273-2280.

- XIAO, R.; POWER, R. F.; MALLONE, D.; CROWDUS, C.; BRENNAN, K. M.; AO, T.; Pierce, J. L.; Dawson K. A. 2011. A comparative transcriptomic study of vitamin E and an algae-based antioxidant as antioxidative agents: Investigation of replacing vitamin E with the algae-based antioxidant in broiler diets. *Poultry Science*. 90: 136-146.
- XU, H.B.; WATKINS, A.; SEIFERT, M. F. 1994. Vitamin E status can alter bone histomorphometry. *J. Bone Mineral Res.*9:S249.
- YESILBAG, D.; EREN, M.; AGEL, H.; KOVANLIKAYA, A.; BALCI, F. 2011. Effects of dietary rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and serum SOD activity. *British Poultry Science*. 52(4): 472-482.
- ZHANG, G. F.; YANG, Z. B.; WANG, Y.; YANG, W. R.; JIANG, S. Z.; GAI, G. S. 2009. Effects of ginger root (*Zingiberofficinale*) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status and serum metabolites of broiler chickens. *Poultryscience* 88:2159-2166.

## **VIII. ANEXOS**

## **ANEXO I: FICHA TECNICA DEL EXTRACTO DE ACHIOTE (ESA).**

### **1. Descripción del producto**

El ESA, es un aceite líquido natural de color amarillo, extraído de la parte lipídica existente en la superficie de la semilla de achiote (*Bixa Orellana*). Este producto natural contiene alto contenido de tocotrienoles.

### **2. Composición**

Principales componentes.

<b>Isómeros</b>	<b>Tocoferoles</b>	<b>Tocotrienoles</b>
Alfa	6.9%	-
Beta	-	-
Gamma	66.8%	14.9%
Delta	26.32%	83%
Total (g/kg)	84.48	149.76

## ANEXO II: FICHA TECNICA MICROVIT<sup>IM</sup> E PROMIX 50

### 1. Descripción

El microvit<sup>IM</sup> E Promix, es un acetato de dl- alfa- tocoferol con formula química  $C_{31} H_{52} O_3$ . Es de uso exclusivamente para la alimentación de animales. El producto comercial tiene un contenido de vitamina E de 500 U.I. /g (50%).

### 2. Especificaciones

Composición	Vitamina E (acetato de dl- alfa -tocoferol)
Fórmula química	$C_{31} H_{52} O_3$
Ingredientes	Sílice
Aspecto	polvo muy fluido
Color	de crema a beige
Solubilidad	en el agua: insoluble
	en los disolventes orgánicos: solubilidad parcial

**ANEXO III: REGISTRO SOBRE LOS PESOS VIVOS (KG/POLLO) POR  
TRATAMIENTO CON SUS RESPECTIVAS REPETICIONES**

Tratamiento	repetición	Semana		
		1era	2da	3era
T-1	1	0.220	0.514	0.958
	2	0.210	0.507	0.969
	3	0.211	0.517	1.029
	4	0.221	0.550	1.050
	Promedio	0.215	0.522	0.999
T-2	1	0.231	0.560	1.025
	2	0.216	0.513	1.013
	3	0.222	0.521	1.000
	4	0.219	0.520	0.982
	Promedio	0.222	0.528	1.005
T-3	1	0.230	0.555	1.033
	2	0.212	0.519	0.999
	3	0.211	0.534	1.016
	4	0.219	0.570	1.122
	Promedio	0.218	0.544	1.042
T-4	1	0.194	0.520	0.978
	2	0.232	0.544	1.021
	3	0.224	0.549	1.052
	4	0.230	0.551	1.039
	Promedio	0.220	0.541	1.022
T-5	1	0.196	0.524	0.972
	2	0.196	0.510	0.978
	3	0.222	0.537	1.027
	4	0.228	0.523	1.015
	Promedio	0.210	0.523	0.998

**ANEXO III: REGISTRO SOBRE LA GANANCIA DE PESO (KG/POLLO) POR  
TRATAMIENTO CON SUS RESPECTIVAS REPETICIONES**

Repetición	Peso inicial	Semana			Ganancia de peso final
		1era	2da	3era	
1	0.041	0.179	0.335	0.623	0.916
2	0.041	0.169	0.338	0.631	0.927
3	0.043	0.168	0.349	0.670	0.975
4	0.045	0.176	0.374	0.676	1.004
Promedio	0.043	0.173	0.349	0.650	0.956
1	0.044	0.187	0.373	0.652	0.98
2	0.043	0.173	0.340	0.673	0.969
3	0.047	0.175	0.346	0.654	0.952
4	0.048	0.171	0.349	0.633	0.933
Promedio	0.046	0.177	0.352	0.653	0.959
1	0.047	0.183	0.372	0.661	0.986
2	0.041	0.171	0.348	0.651	0.957
3	0.044	0.167	0.367	0.649	0.971
4	0.047	0.172	0.398	0.724	1.075
Promedio	0.045	0.173	0.371	0.671	0.997
1	0.041	0.153	0.367	0.611	0.937
2	0.047	0.185	0.359	0.662	0.974
3	0.046	0.178	0.371	0.681	1.006
4	0.048	0.182	0.369	0.67	0.991
Promedio	0.046	0.175	0.367	0.656	0.977
1	0.043	0.153	0.371	0.601	0.929
2	0.043	0.153	0.357	0.621	0.935
3	0.047	0.175	0.355	0.672	0.980
4	0.041	0.187	0.336	0.679	0.974
Promedio	0.044	0.167	0.355	0.643	0.955

**ANEXO IV: REGISTRO SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO (g/pollo) POR  
TRATAMIENTO CON SUS RESPECTIVAS REPETICIONES**

Tratamiento	Repetición	Semana		
		1era	2da	3era
T-1	1	187	420	691
	2	182	428	691
	3	200	430	691
	4	209	430	691
	Promedio	194.5	427	691
T-2	1	210	426	691
	2	203	395	688
	3	211	435	691
	4	209	430	688
	Promedio	208.25	421.5	689.5
T-3	1	224	422	691
	2	204	430	691
	3	205	430	691
	4	215	413	691
	Promedio	212	423.75	691
T-4	1	191	396	691
	2	215	430	691
	3	212	430	691
	4	223	430	691
	Promedio	210.25	421.5	691
T-5	1	213	430	691
	2	182	430	691
	3	214	430	691
	4	213	425	691
	Promedio	205.5	428.75	691

**ANEXO V: REGISTRO SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO ACUMULADO  
(g/pollo) POR TRATAMIENTO CON SUS RESPECTIVAS  
REPETICIONES**

Tratamiento	Repetición	Semana		
		1era	2da	3era
T-1	1	187	607	1298
	2	182	610	1301
	3	200	630	1321
	4	209	639	1330
	Promedio	194.5	621.5	1312.5
T-2	1	210	636	1327
	2	203	598	1286
	3	211	646	1337
	4	209	639	1327
	Promedio	208.25	629.75	1320.00
T-3	1	224	646	1337
	2	204	634	1325
	3	205	635	1326
	4	215	628	1319
	Promedio	212	635.75	1326
T-4	1	191	587	1278
	2	215	645	1336
	3	212	642	1333
	4	223	653	1344
	Promedio	210.25	631.75	1322.75
T-5	1	213	643	1334
	2	182	612	1303
	3	214	644	1335
	4	213	638	1329
	Promedio	205.5	634.25	1325.25

**ANEXO VI: REGISTRO SOBRE CONVERSION ALIMENTICIA (g/g) POR TRATAMIENTO CON SUS RESPECTIVAS REPETICIONES**

Tratamiento	Repetición	Semana		
		1era	2da	3era
T-1	1	1.05	1.43	1.56
	2	1.08	1.44	1.5
	3	1.19	1.41	1.38
	4	1.19	1.31	1.38
	Promedio	1.1275	1.3975	1.455
T-2	1	1.12	1.29	1.49
	2	1.18	1.33	1.38
	3	1.21	1.45	1.44
	4	1.22	1.43	1.49
	Promedio	1.1825	1.375	1.45
T-3	1	1.22	1.3	1.45
	2	1.2	1.4	1.44
	3	1.23	1.33	1.43
	4	1.25	1.18	1.25
	Promedio	1.225	1.3025	1.3925
T-4	1	1.25	1.21	1.51
	2	1.16	1.38	1.45
	3	1.19	1.32	1.37
	4	1.23	1.34	1.42
	Promedio	1.2075	1.3125	1.4375
T-5	1	1.39	1.31	1.54
	2	1.19	1.37	1.48
	3	1.23	1.37	1.41
	4	1.28	1.35	1.4
	Promedio	1.2725	1.35	1.4575

**ANEXO VII: RESULTADOS DE ANALISIS TBARS EN PLASMA DE POLLOS DE  
CARNE DE 21 DIAS DE EDAD**

Tratamiento	Muestras	nmol/mL
T-1	1	2.50
	2	2.15
	3	1.73
	4	2.31
	Promedio	2.17
T2	1	2.38
	2	2.42
	3	1.85
	4	2.00
	Promedio	2.16
T-3	1	2.54
	2	1.69
	3	2.31
	4	2.46
	5	2.73
	Promedio	2.35
T-4	1	1.92
	2	2.15
	3	1.50
	4	2.50
	5	2.35
	Promedio	2.08
T-5	1	2.58
	2	2.27
	3	2.12
	4	1.85
	5	2.42
	Promedio	2.25

*Laboratorio de investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*

**ANEXO VII: RESULTADOS DE ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASAS EN PLASMA DE POLLOS DE CARNE DE 21 DIAS DE EDAD**

Tratamiento	Muestras	USOD/ml
T-1	1	16.50
	2	15.60
	Promedio	16
T-2	1	17.9
	2	17.6
	Promedio	17.8
T-3	1	17
	2	17
	Promedio	17
T-4	1	16.1
	2	17
	Promedio	16.6
T-5	1	16.8
	2	17.8
	Promedio	17.3

*Laboratorio de investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*