



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO
DICÁLCICO Y SU EVALUACIÓN EN
POLLOS DE ENGORDA**

DIANA ANGÉLICA GUTIÉRREZ ARENAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: “**Síntesis y caracterización de nanopartículas de fosfato dicálcico y su evaluación en pollos de engorda**” realizada por la alumna: **Diana Angélica Gutiérrez Arenas** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Manuel Cuca García

ASESOR



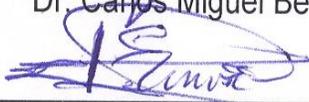
Dr. Arturo Pro Martínez

ASESOR



Dr. Carlos Miguel Becerril Pérez

ASESOR



Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR



Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015.

• *Dedicatoria* •

DIOS

Porque tu ocupas el primer lugar en mi vida. . . y por lo tanto, todas las piezas restantes en ella, encajan alrededor de ti, en un orden perfecto.

SERVANDO

El amor, compañía, respeto, confianza, compromiso y sobre todo tu paciencia, me impulsaron cada día para culminar éste proyecto. Tú has sido quien me ha motivado con tu apoyo constante y amor incondicional, has sido amigo y compañero inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento. TE AMO♥.

SARAH

Mi preciosa hija, tú eres quien más ha sufrido mis ausencias, pero también quien ha encendido la chispa de alegría en momentos difíciles. Tu espontaneidad y dulzura me hacen sentir la mamá más orgullosa del mundo.

EULOGIO Y BERTHA

Un logro más para ustedes, porque cada objetivo alcanzado es producto de la constancia y dedicación que sólo ustedes nos han enseñado. Gracias por darme la vida. . . Estaré eternamente agradecida.

ARMA Y ARE

Ups. . . ¿cómo decirles a ustedes cuanto los amo? Sus virtudes infinitas, su gran corazón y esa complicidad que sólo se consigue con un hermano, me llevaron a sentirme en un ambiente familiar cálido, para culminar éste logro.

TITA Y YALE

Porque todas las cosas visibles de este mundo han sido puestas al cuidado de un ángel y tu llegaste cuando creíste que era el momento perfecto. Las quiero mucho.

FAMILIARES

Familia Arenas (en especial a Tus, In, Rope, Chela) y Familia Reyes Castro, porque siempre escuche alguna palabra de ánimo y motivación.

AMIGOS

Ross, Yaneth, Mariana, Nelly, Flor. . . espero que esta tesis les sirva por lo menos para recordarme al pasar los años, los quiero mucho.

!!! LOS QUIERO MUCHO A TODOS!!!

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** Campus Montecillo, por formarme y darme las herramientas necesarias para alcanzar esta meta.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT)** por el apoyo económico recibido.

A la **Línea Prioritaria de Investigación 16 “Innovación Tecnológica”**, por darme los recursos necesarios para llevar a cabo mi investigación y por ser el vínculo para conocer personas tan valiosas.

Al **Dr. Cuca**, porque es mejor un día con un gran maestro como él, que mil días de arduo estudio, gracias una vez más por compartir conmigo su sabiduría y experiencias.

Al **Dr. Becerril**, porque siempre tuvo una excelente forma de motivarme y muchas veces sus palabras me levantaron el ánimo y me hicieron sentir una estudiante muy capaz y segura.

Al **Dr. Méndez**, por enseñarme a hacer cosas nuevas, no simplemente a repetir lo que han hecho otras generaciones y por la forma tan sencilla de nuestro trato, la cual contribuyó de manera significativa para concluir éste logro.

Al **Dr. Pro**, por enseñarme a pensar de manera intensa y crítica. Esa es la verdadera educación.

Al **Dr. Efrén**, porque siempre hubo disposición y motivación de su parte para llevar a cabo éste proyecto de investigación.

Al **Dr. Jaime Gallegos Sánchez** porque él fue quien me motivo e inicio en el ámbito científico y gracias a eso descubrí que la investigación me apasiona.

A la **Dra. Carmen González y Dr. Rogelio Carrillo** por el apoyo y atenciones que tienen hacia mí. La línea 16 nos puso en el mismo camino y su trabajo como investigadores me inspira a ser una colega dedicada y trabajadora.

A la **Dra. Araceli Zavaleta, Dra. Tere Sánchez y Dra. Magdalena Crosby** por sus palabras de apoyo y ánimo.

A la **Ing. Margarita Crosby Galván** por sus conocimientos compartidos y pláticas que hicieron más amena mi estancia en el laboratorio.

A todos y cada uno de los **Profesores del Colegio de Postgraduados** con quienes me forme académicamente.

Al **Equipo Secretarial** del Programa en Ganadería, en especial a **Celsa Fragoso Garay** por su disposición y apoyo en trámites académicos y administrativos.

A las instituciones, empresas y personas que me apoyaron:

Universidad de las Américas-Puebla.

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Universidad Nacional Autónoma de México (Viridiana Maturano Rojas).

Instituto Politécnico Nacional (Biol. Ma. Esther Sánchez Espíndola).

Instituto Nacional de Cancerología (MC. Pilar Ramos Godínez).

Evonik México S.A de C.V. (MC. Roberto Santiago, Ing. Gino Romero y MC. Juan Domínguez)

!!!GRACIAS!!!

Contenido:

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
2. OBJETIVOS	4
2.1. <i>Objetivo general</i>	4
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
3. HIPÓTESIS	5
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. <i>Fósforo</i>	5
4.1.1. <i>Propiedades químicas</i>	6
4.1.2. <i>Función biológica</i>	6
4.1.3. <i>Absorción</i>	7
4.1.4. <i>Biodisponibilidad del fósforo</i>	7
4.1.5. <i>Fuentes inorgánicas de fósforo</i>	8
4.1.5.1. <i>Fosfatos de calcio</i>	9
4.2. <i>Nanotecnología</i>	10
4.2.1. <i>Diseño y preparación de NPs</i>	11
4.2.2. <i>Caracterización de NPs</i>	13
4.2.2.1. <i>Microscopia electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)</i>	13
4.2.2.2. <i>Dispersión dinámica de luz (DLS)</i>	15
4.2.2.3. <i>Espectroscopia de energía dispersa (EDS)</i>	17
4.2.2.4. <i>Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)</i>	17
4.2.2.5. <i>Difracción de rayos X de polvos (pDRX)</i>	18
4.2.3. <i>Aplicaciones de la nanotecnología en la producción animal</i>	19
4.2.4. <i>Absorción, distribución y toxicidad de NPs</i>	21
5. LITERATURA CITADA	22
CAPITULO I.	28

RESUMEN	28
ABSTRACT	29
1.1. <i>Introducción</i>	30
1.2. <i>Materiales y métodos</i>	31
1.2.1. Instituciones participantes	31
1.2.2. Síntesis de NPFD	31
1.2.2.1. Reactivos e instrumental utilizado	32
1.2.2.2. Cálculos para la preparación de soluciones	32
1.2.2.3. Síntesis de nanopartículas	33
1.2.3. Caracterización de NPFD	34
1.2.3.1. Morfología y tamaño promedio	35
1.2.3.1.1. TEM y SEM	35
1.2.3.1.2. DLS	35
1.2.3.2. Composición química	36
1.2.3.2.1. EDS	36
1.2.3.2.2. FTIR	36
1.2.3.2.3. pDRX	36
1.3. <i>Resultados y discusión</i>	37
1.3.1. Morfología y tamaño promedio	37
1.3.1.1. SEM y TEM	37
1.3.1.2. DLS	39
1.3.2. Composición química	41
1.3.2.1. EDS	41
1.3.2.2. FTIR	41
1.3.2.3. pDRX	42
1.4. <i>Conclusiones</i>	43
1.5. <i>Literatura citada</i>	43
CAPITULO II.	45
RESUMEN	45
ABSTRACT	46
2.1. <i>Introducción</i>	47
2.2. <i>Materiales y métodos</i>	48
2.2.1. Localización	48

2.2.2. Fase experimental y manejo de los animales.....	48
2.2.3. Dietas experimentales.....	48
2.2.4. Características estudiadas	50
2.2.5. Análisis estadístico	53
2.2.5.1. Modelo estadístico.....	53
2.3. Resultados y discusión	53
2.3.1. Consumo de alimento	53
2.3.2. Ganancia de peso.....	55
2.3.3. Conversión alimenticia.....	58
2.3.4. Mortalidad	60
2.3.6. Digestibilidad aparente del fósforo	61
2.3.6. Fósforo total en pechuga e hígado.....	63
2.3.7. Contenido de cenizas en tibias.....	64
2.3.8. Fósforo total en tibias	65
2.3.9. Mediciones de la tibia.....	66
2.4. Conclusiones	67
2.5. Literatura citada	67
CONCLUSIÓN GENERAL Y RECOMENDACIONES	71
APÉNDICE	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Ortofosfatos de calcio existentes.....	10
Cuadro 2.	Tratamientos y proporción de la fuente mineral utilizada con su respectiva concentración de Ca y Pd.....	49
Cuadro 3.	Composición y análisis nutrimental de las dietas experimentales para pollos de engorda.....	50
Cuadro 4.	Fósforo total ingerido (FTI), excretado (FTE), absorbido (PTA) y digestibilidad aparente del fósforo (Dap) en pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	62
Cuadro 5.	Fósforo total en pechuga e hígado de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	63
Cuadro 6.	Contenido de cenizas en tibias de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	64
Cuadro 7.	Fósforo total en tibias de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	65
Cuadro 8.	Longitud (LT), diámetro proximal (DPT), diámetro medio (DMT) y diámetro distal (DDT) de tibias de pollos de engorda (mm) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Molécula de Ácido fítico.....	2
Figura 2.	Diagrama de un equipo SEM.....	14
Figura 3.	Diagrama de un equipo TEM.....	15
Figura 4.	Esquema que detalla el radio hidrodinámico de una partícula y las subsecuentes intensidades de dispersión de luz estática y dinámica.....	16
Figura 5.	Esquema de un espectrofotómetro por transformada de Fourier.....	18
Figura 6.	Esquema de difracción de rayos X.....	19
Figura 7.	Esquema del cambio en la superficie cuando la partícula se hace más pequeña.....	21
Figura 8.	Esquema de la síntesis de nanopartículas de fosfato dicálcico.....	34
Figura 9.	Micrografías de SEM de NPFd en forma prismática.....	37
Figura 10.	Micrografías de TEM de nanopartículas de fosfato dicálcico....	38
Figura 11.	Distribución de tamaño por medio de DLS en Zeta-sizer Nano.....	39
Figura 12.	Distribución de tamaño por medio de DLS en Nanotracs Wave.....	40
Figura 13.	Resultados del análisis de EDS a muestras de nanopartículas de fosfato dicálcico.....	41
Figura 14.	Gráfica de FTIR que muestra el comparativo de las nanopartículas de fosfato dicálcico sintetizadas, con el PVP y el CaHPO_4 de grado analítico	42
Figura 15.	Difractogramas de rayos X.....	42
Figura 16.	Consumo de alimento en pollos de engorda (g ave-1 semana-1) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	54
Figura 17.	Ganancia de peso en pollos de engorda (g ave-1 semana-1) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	56
Figura 18.	Conversión alimenticia en pollos de engorda en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).....	59
Figura 19.	Mortalidad de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible.....	60

ABREVIATURAS

°C	=	Grados centígrados
ADN	=	Ácido desoxirribonucleico
ADP	=	Adenosin difosfato
AOAC	=	Association of Official Analytical Chemist
ARN	=	Ácido ribonucleico
ATP	=	Adenosin trifosfato
ATR	=	Reflectancia total atenuada
Ca	=	Calcio
CA	=	Conversión alimenticia
CAL	=	Consumo de alimento
CC	=	Contenido de cenizas en tibias
cm	=	Centímetros
CT	=	Cenizas en tibias
CTAB	=	Hexadecil trimetil amonio
Dap	=	Digestibilidad aparente del fósforo
DDT	=	Diámetro distal de la tibia
DLS	=	Dispersión dinámica de luz
DMT	=	Diámetro medio de la tibia
DPT	=	Diámetro proximal de la tibia
EDS	=	Espectroscopia de energía dispersa- Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy
EM	=	Energía metabolizable
FD	=	Fosfato dicálcico
FSAI	=	Food Safety Authority of Ireland
FTIR	=	Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier
g	=	Gramos
GP	=	Ganancia de peso
h	=	Horas
HCl	=	Ácido clorhídrico
kV	=	Kilovoltios
LT	=	Longitud de tibia
M	=	Mortalidad
ml	=	Mililitros
mM	=	Milimolar
mm	=	Milímetros
msnm	=	Metros sobre el nivel del mar
nm	=	Nanómetros
NPDF	=	Nanopartículas de fosfato dicálcico anhidro
NPPs	=	Nanopartículas de fósforo
NPs	=	Nanopartículas
NRC	=	National Research Council
P	=	Fósforo
PAA	=	Ácido poliacrílico
Pd	=	Fósforo disponible
pDRX	=	Difracción de rayos X de polvos

PH	=	Fósforo total en hígado
PM	=	Peso molecular
PP	=	Fósforo total en pechuga
PT	=	Fósforo total
PT	=	Fósforo total
PTT	=	Fósforo total en tibias
PVP	=	Polivinil pirrolidona
rpm	=	Revoluciones por minuto
SEM	=	Microscopia electrónica de barrido- Scanning Electron Microscopy
TEM	=	Microscopia electrónica de transmisión- Transmission Electron Microscopy
TGI	=	Tracto gastrointestinal
V	=	Voltios

INTRODUCCIÓN GENERAL

El sector pecuario en México presenta grandes retos ante la dependencia de insumos alimenticios del extranjero, aunada a la crisis económica por la que atraviesa nuestro país. Así también, hay gran interés por implementar tecnologías de bajo costo que vayan acorde con la filosofía “limpio, verde y ético” para producir insumos alimenticios para consumo humano que permitan cubrir la demanda de éstos y bajo condiciones amigables con el ambiente.

A lo largo de los años y aún en la actualidad, la alimentación ha sido el recurso limitante más importante en la producción animal, ya que si se analizan los costos de producción pecuaria, se observa que juega un papel sobresaliente. En un estudio realizado por Silos (1968), quien evaluó los costos e ingresos en la producción de huevo en la Comarca Lagunera, informa que los costos por compra de alimentos y pollitos en 23 explotaciones avícolas en la sección de crecimiento para producir una polla de remplazo corresponden al 86% del total de los gastos variables. Por su parte, Cuca *et al.* (2009) señalan que el alimento balanceado representa del 60 al 70% del total de costo de producción de carne o huevo; por lo que cualquier mejora o ahorro que se pueda lograr en ésta área, tendrá un impacto significativo en los costos de producción y por consiguiente en la ganancia al productor y en el precio al consumidor. Por tal motivo, es importante tratar de reducir la cantidad de alimento utilizado, sin afectar la calidad nutricional del producto final, asegurando al mismo tiempo, la obtención del máximo beneficio. Es necesario implementar tecnologías de vanguardia tales como la nanotecnología que permitan incrementar la biodisponibilidad de los nutrientes, con la consecuente disminución en los niveles de inclusión de ingredientes en la dieta, sin descuidar el nivel de producción, la calidad, valor nutricional e inocuidad de los alimentos. En éste sentido y debido a que los minerales son uno de los nutrientes más utilizados en la nutrición animal se ha explorado el uso de nanomateriales de diversas fuentes minerales como son nanopartículas (NPs) de cobre (Rohner *et al.*, 2007), selenito de sodio

(González-Eguía *et al.*, 2009), fosfato férrico (Romero-Pérez *et al.*, 2010), entre otros. La forma en la que se encuentran los minerales influye en su biodisponibilidad, si hay baja biodisponibilidad, el animal no podrá hacer un uso adecuado de ellos y serán eliminados en excretas, contribuyendo así al daño del medio ambiente (Ramírez y Hernández, 2010).

El fósforo (P) es un mineral esencial involucrado en muchos procesos metabólicos del organismo animal y contribuye a un crecimiento normal de los pollos de engorda. Éste mineral es el tercer componente más costoso en dietas para aves (Vallardi *et al.*, 2002). Debido al alto contenido de ácido fítico (Figura 1) en los ingredientes de origen vegetal (>60%) y a que las aves no producen la enzima fitasa (Beltrán-López *et al.*, 2000), es necesario que las dietas en aves sean complementadas con fuentes de P inorgánico, para satisfacer las necesidades del elemento, ya que se considera que el P de fuentes inorgánicas es 100% disponible, mientras que el proveniente de las fuentes de origen vegetal solo tiene un 30% de disponibilidad (Scott *et al.*, 1982). Sin embargo, el precio de los fosfatos se ha incrementado significativamente en años recientes, lo cual aumenta el costo de las dietas (Cuca *et al.*, 2003; Rodehutschord, 2011) y por otra parte, la excreción de éste mineral provoca la acumulación en el suelo y su lixiviación, con consecuencias negativas sobre las aguas superficiales, tales como la eutrofización (Sharpley, 1999; Keshavarz y Austic, 2004; Rodehutschord, 2011). Waldroup *et al.* (2000) estiman que al menos el 50% del P de las excretas proviene de fosfatos minerales no digeridos, principalmente de pollos.

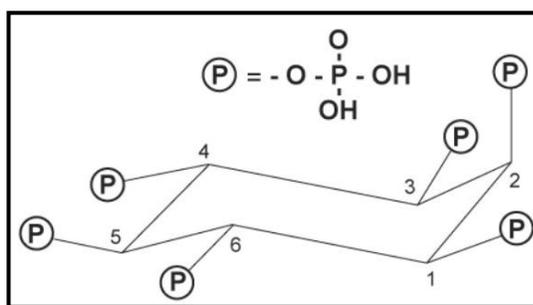


Figura 1. Molécula de Ácido fítico (Vieira *et al.*, 2006).

El fosfato dicálcico (FD) es comúnmente utilizado como fuente de P en dietas para animales (Fernandes *et al.*, 1999) y su disponibilidad depende del estado de hidratación en el que se encuentre la molécula, por lo que puede existir en forma anhidra o dihidratada, siendo esta última la más disponible para pollitos (Gillis *et al.*, 1962), por lo que Leeson y Summers (2005) indican que el FD anhidro tiene aproximadamente 10% menor disponibilidad que la forma hidratada. Lima *et al.* (1995) indican que el fosfato de calcio comercial es una mezcla de varias cantidades de FD, ácido fosfórico, carbonato de calcio e impurezas. Según De Blas *et al.* (2010), la disponibilidad del P del FD para aves es del 85%, pero ésta disponibilidad puede variar por lo que una alternativa para mejorar la biodisponibilidad de éste suplemento, puede ser la implementación de nuevas formas de administración del P, que cubran el requerimiento de los animales. Una opción es la utilización del FD en NPs, reduciendo el tamaño de partícula, en consecuencia se incrementa la zona de superficie expuesta a la interacción química dentro del tracto gastrointestinal y se puede obtener una mayor eficiencia de absorción, según Wang *et al.* (2004), las partículas de hasta 100 nm se absorben en el tubo gastrointestinal de 15 a 250 veces más que las de un mayor tamaño, por lo que se puede reducir la cantidad de FD en la dieta de las aves si ésta se adiciona en forma de NPs y de ésta manera reducir costos por concepto de alimentación. En el presente estudio se plantea la elaboración de NPs de FD anhidro (NPFD) con el objetivo de caracterizarlas y evaluar su efecto productivo, en pollos de engorda en iniciación.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según Rebolgar y Mateos (1999) las materias primas de origen vegetal contienen alrededor de dos tercios del P en forma de fitatos y su disponibilidad para no rumiantes es prácticamente nula, por lo que al ser consumido por el animal, éste aparece casi por completo en las heces cuando se integran en el suelo; este P es liberado mediante la acción de las fitasas contenidas en los microorganismos del suelo y pasa a ríos y lagos con la consecuente eutrofización de aguas y de reservorios acuáticos. Bajo estas circunstancias, hay un crecimiento acelerado de algas y un agotamiento del contenido en oxígeno del agua, lo que provoca la mortalidad de la fauna acuática. La baja disponibilidad del P crea al productor dos problemas: la necesidad de adicionar a las dietas P inorgánico, con el consiguiente encarecimiento del producto final, y la excreción al ambiente de altas cantidades de éste macromineral. Actualmente, la tecnología permite generar productos que tengan un impacto positivo en la producción animal; en este sentido, la nanotecnología es una tecnología que puede ser encaminada hacia el desarrollo de avances sustantivos en ésta área. La FSAI (FSAI, 2008), sugiere que los nutrientes esenciales pueden ser mejor biodisponibles con el uso de la nanotecnología, por lo que la producción de nanopartículas de fósforo (NPPs) es una alternativa que puede permitir la disminución del tamaño de la partícula, para un mejor proceso de biodisponibilidad del macronutriente en el alimento. El proceso, podría permitir que el P sea mejor aprovechado por el ave, haciendo de ésta manera posible el ajustar el consumo de P a las necesidades reales del animal, disminuyendo así el costo de alimentación y de los niveles de P excretados por los animales.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Sintetizar, caracterizar y evaluar el efecto productivo de NPPD en pollos de engorda en iniciación.

2.2. Objetivos específicos

- Obtener NPFDF mediante el método de coprecipitación, empleando precursores apropiados de Ca^{2+} y de HPO_4^{2-} en solución acuosa, en presencia de un agente de recubrimiento biocompatible y realizar las caracterizaciones morfológicas y de dispersión de tamaño, así como de composición química y de identidad (fase cristalina) de las NPFDF elaboradas.
- Evaluar el efecto fisiológico y productivo de las NPFDF en pollos de engorda en iniciación y compararlo con las fuentes de P comercial (FD dihidratado) y de grado analítico (FD anhidro), constituidas por partículas de tamaño convencional.

3. HIPÓTESIS

El método de coprecipitación permite obtener NPFDF menores a 100 nm que pueden ser utilizadas en la alimentación avícola.

Las NPFDF mejoran la ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y acumulación del P en tibias de pollos de engorda.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Fósforo

El P es un macromineral que se discute en forma conjunta con el calcio (Ca) debido a que están muy asociados en diversas funciones que se realizan en el organismo animal (Cuca *et al.*, 2009), juntos constituyen la mayor parte del contenido mineral del hueso y son los dos elementos minerales más abundantes en el cuerpo animal (46% de Ca y 29% de P). La deficiencia o exceso de uno puede interferir con la utilización del otro (McDowell, 2003), e incluso el desbalance en la disponibilidad

de cualquiera de éstos dos minerales, puede producir cantidades excesivas de P excretado (Kebreab *et al.*, 2009). Según el NRC (1994), el P debe estar presente en los alimentos en cantidades tales que la relación Ca:P no fítico sea de 2:1 con la excepción de dietas para gallinas ponedoras, en donde el requerimiento de Ca es tan alto que la relación Ca:P no fítico puede ser hasta de 12:1. La sangre contiene aproximadamente 35-45 mg de P por 100 ml (Scott *et al.*, 1976).

4.1.1. Propiedades químicas

El fósforo es un elemento químico que tiene un peso atómico de 30.97 g/mol, número atómico de 15 y su símbolo es P. Se encuentra en la serie química de los no metales. Tiene un isótopo 100% natural, ³¹P. Es el segundo elemento mineral más abundante en el organismo animal y constituye el 0.12% de la corteza terrestre. Este mineral no se encuentra en forma libre en la naturaleza sino combinado formando fosfatos y siempre está presente en la superficie de la tierra en la forma de ortofosfatos (Underwood, 1981; McDowell, 2003). En granos de cereales y oleaginosas, el fósforo es de baja disponibilidad para las aves, ya que se encuentra en forma de fitatos, los cuales representan de un 50 a 80% del fósforo total del grano, mientras que el fósforo restante se encuentra en los fosfolípidos, fosfoproteínas, ácidos nucleicos y fosfatos inorgánicos (Hernández *et al.*, 2006).

4.1.2. Función biológica

El P es un mineral que cumple funciones vitales para los seres vivos, por lo que es considerado como un elemento químico esencial; es probablemente el elemento mineral con más funciones (Underwood, 1981), juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras óseas; metabolismo de la energía, carbohidratos, aminoácidos y grasas; metabolismo del tejido nervioso; crecimiento esquelético y transporte de ácidos grasos y otros lípidos; es un componente importante del Adenosin di y trifosfato (ADP y ATP), ácidos nucleicos (ADN y ARN) y de moléculas de fosfolípidos, que integran y dan flexibilidad a las membranas celulares (Scott *et al.*, 1976; McDowell, 2003).

4.1.3. Absorción

Algunos autores (Arnaud y Sánchez, 1996; Ternouth y Coates, 1997) indican que el 70 al 80% del P ingerido en la dieta es normalmente absorbido. La principal absorción del P se da por difusión pasiva y activa en el tracto intestinal en donde el duodeno y yeyuno son los principales sitios de absorción (McDowell, 2003).

Independientemente de las formas en las cuales se ingiera el P, su absorción dependerá de su solubilidad, de la fuente de P, pH intestinal, edad del animal, parasitismo intestinal y del consumo de otros minerales como el calcio, fierro, aluminio, manganeso, potasio y magnesio. Así mismo, la Vitamina D influye en la absorción de éste mineral ya que estimula su transporte a través del epitelio intestinal, debido a que en el intestino la 1,25-(OH)₂D promueve la síntesis de calbindina y otras proteínas para estimular la absorción de P (McDowell, 2003).

4.1.4. Biodisponibilidad del fósforo

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mayor parte del P contenido en las materias primas de origen vegetal que se utilizan para la fabricación de alimentos balanceados se encuentra en forma de P fítico el cual es indisponible para las aves debido a la carencia de la enzima fitasa en el tracto gastrointestinal (Scott *et al.*, 1976). Por lo que es de gran importancia conocer la biodisponibilidad del P, ya que cuanto más preciso sea el suministro de éste mineral para cubrir los requerimientos nutrimentales de P disponible, mayor será el conocimiento de la disponibilidad del P de los ingredientes a utilizar (Rodehutscord, 2011), además éstos requerimientos y las concentraciones de los alimentos para la elaboración de dietas deben ser expresadas en términos de unidades biodisponibles (Sibbald, 1987). Sin embargo, según Sibbald (1987) la biodisponibilidad es un concepto abstracto por lo cual no puede ser medido pero si analizado. Conocer la biodisponibilidad o digestibilidad de productos minerales fosfatados empleados como complementos en alimentación animal es importante no sólo por el factor económico que representan, sino también por el impacto del fósforo en el ambiente, lo cual genera el interés de optimizar la

formulación de dietas para evitar gastos excesivos y contribuir así a mejorar las condiciones de preservación del ambiente (Cornejo *et al.*, 2005).

Debido a que es necesario suplementar las dietas para aves con fuentes de P de alta disponibilidad, las fuentes inorgánicas de P son elegidas para formar parte del alimento balanceado ya que según el NRC (1994) y Scott *et al.*, (1976), el fósforo proveniente de productos de origen animal y de suplementos inorgánicos es muy utilizado en la elaboración de dietas para aves, por su alta disponibilidad. En general, FD es la forma química más utilizada en la elaboración de dietas y se le asignaba arbitrariamente una disponibilidad del 100% por lo que la disponibilidad del P de las demás materias primas se estimaba en forma relativa relacionándolas con el valor de disponibilidad del FD; éste método es aún recomendado por el NRC (1994), por lo que algunas fuentes inorgánicas de P que son más disponibles que el FD, pueden presentar valores superiores al 100% (FEDNA, 2010). Gillis *et al.* (1962) indican que existe confusión en los estudios de disponibilidad del FD en aves, ya que no se toma en cuenta que muchos compuestos fosfatados pueden existir en diversos estados de hidratación lo que afecta la disponibilidad del P, por lo que ellos indican que la forma dihidratada tiene una mayor disponibilidad en comparación con la forma anhidra, probablemente debido a diferencias en la estructura física o propiedades químicas del material. Sin embargo, la disponibilidad del P en el FD anhidro se puede incrementar con el uso de dietas que contienen pasta de soya, ya que según Scott *et al.* (1982), éste ingrediente de origen vegetal contiene un factor relacionado con su porción fibrosa que está involucrado en la mejor utilización del P, debido al estímulo del proventrículo para producir suficiente ácido clorhídrico para disolver el FD anhidro el cual es menos soluble que el dihidratado.

4.1.5. Fuentes inorgánicas de fósforo

Según Rodehutschord (2011), la cantidad de P agregada en una dieta para cubrir sus necesidades, es variable y no sólo depende de factores ligados al animal como la especie, edad y rendimiento planeado sino también de las materias primas utilizadas en la elaboración del alimento.

Existen diversos compuestos fosfatados utilizados en la producción avícola, como son los fosfatos mono y dicálcicos, los fosfatos mono y disódicos y el ácido fosfórico entre otros, sin embargo el fosfato dicálcico (CaHPO_4) es una fuente de fósforo con un valor biológico bastante aceptable (95-100 teniendo como estándar de referencia al Beta-fosfato tricálcico), y con un alto grado de utilización (FEDNA, 2010).

4.1.5.1. Fosfatos de calcio

Todos los fosfatos de calcio contienen principalmente tres elementos químicos: calcio (estado de oxidación +2), fósforo (estado de oxidación +5) y oxígeno (estado de oxidación -2), como parte de aniones ortofosfato. Existe una gran variedad de fosfatos de calcio, los cuales son distinguidos por el tipo de anión fosfato:

Orto (PO_4^{-3})
Meta (PO_3^-)
Piro ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)
Poli ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$)

Algunos factores como la temperatura, presión parcial del agua e impurezas pueden determinar la fase cristalina de un fosfato de calcio (Dorozhkin, 2009). Los diferentes fosfatos de calcio se mencionan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ortofosfatos de calcio existentes (modificado de Dorozhkin, 2009).

Ca:P (Relación iónica)	Compuesto	Fórmula química	pH (rango de estabilidad en solución acuosa a 25° C)
0.5	Fosfato monocálcico monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0-2.0
0.5	Fosfato monocálcico anhidro	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	^[b]
1.0	Fosfato dicálcico dihidratado, brushita	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.0-6.0
1.0	Fosfato dicálcico anhidro, monetita	CaHPO_4	^[b]
1.33	Fosfato octálcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5.5-7.0
1.5	α - Fosfato tricálcico	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	^[a]
1.5	β - Fosfato tricálcico	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	^[a]
1.2-2.2	Fosfato de calcio amorfo	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	~5-12
1.5-1.67	Hidroxiapatita deficiente en calcio	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	6.5-9.5
1.67	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9.5-12
1.67	Fluorapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	7-12
2.0	Fosfato tetracálcico, Hilgenstockita	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	^[a]

^[a] Estos compuestos no pueden ser precipitados de soluciones acuosas.

^[b] Estables a temperaturas cercanas a 100°C.

4.2. Nanotecnología

Sin lugar a dudas, estamos en el umbral de una revolución en la forma de fabricar materiales y productos. La convergencia de la química, la física, la biología y la ingeniería ha dado lugar a un nuevo campo, el de la nanotecnología, que se ocupa de la creación y el uso de partículas increíblemente pequeñas y cuya unidad de medición es el nanómetro (Tegart, 2005). La palabra “nano” viene del latín “*nanus*” que significa “enano” y el término de nanotecnología fue usado por primera vez por Norio Taniguchi, investigador japonés en la Tokyo University of Science durante una conferencia en 1974. Sin embargo, el discurso impartido por el físico norteamericano y premio Nobel de Física Richard P. Feynman en un congreso de la Sociedad Americana de Física en 1959 en la Universidad del Sur de California, es considerado por muchos como el iniciador de las ideas revolucionarias que llevarían eventualmente al desarrollo de la Nanociencia y la Nanotecnología (Kakade, 2003). En el decenio de los 80’s, la nanotecnología es popularizada por Eric Drexler quien a través de su libro “Motores de la Creación” generó un gran interés social por el

tema, aunque varias de sus ideas (como la de la *plata gris*) puedan considerarse polémicas o incluso absurdas (Verma *et al.*, 2012). La nanotecnología se define como un campo de las ciencias aplicadas dedicada al control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro, es decir, a nivel de átomos y moléculas y en su definición más estricta de la Iniciativa Nacional de Nanotecnología, ésta se refiere a estructuras más o menos en el régimen de 1-100 nanómetros (nm) de tamaño en al menos una dimensión.

Los investigadores y tecnólogos han abordado la nanotecnología desde tres áreas científicas: la física, la química y la biología (Tegart, 2005) y por lo tanto se considera como una tecnología potencial para revolucionar diversos campos, entre ellos la medicina veterinaria, salud animal y otras áreas de la producción animal (Sekhon, 2012), ya que se puede alterar la forma en el modo de producción, transformación, envasado e incluso el uso del producto final. También puede ser útil para desarrollar materiales a nanoescala, sistemas de liberación controlada, detección de contaminantes y creación de nanodispositivos para su uso en la biología celular y molecular (Verma *et al.*, 2012).

4.2.1. Diseño y preparación de NPs

Existen diferentes métodos de preparación de NPs y la selección de cualquiera de estos métodos depende de los objetivos y condiciones particulares del uso al cual se destinen éstas. Sin embargo, es importante tener algunas consideraciones como la estabilidad física y química del agente activo, así como su toxicidad y su perfil de liberación, entre otras cosas (Ramírez y Hernández, 2010).

Según Rao *et al.* (2004) y Schmid (2004), los métodos de síntesis de NPs, se pueden agrupar en dos categorías:

“De arriba hacia abajo” (Top-Down): la cual consiste en la división de sólidos de un tamaño mayor a uno menor por medio de métodos como la molienda o

desgaste, métodos químicos o la volatilización de un sólido seguido de su condensación. Algunos métodos son:

- Evaporación térmica
- Depósito químico en fase de vapor
- Preparación de clusters gaseosos
- Implantación de iones
- Molienda

“De abajo hacia arriba” (*Bottom-Up*): consiste en la síntesis de NPs a través de la condensación de átomos o moléculas en una fase gaseosa o en solución. Esta categoría de clasificación suele ser la más utilizada en los procesos de síntesis. Algunos métodos son:

- Método coloidal
- Reducción fotoquímica y radioquímica
- Irradiación con microondas
- Utilización de dendrímeros
- Síntesis solvotermal
- Método sol-gel

Bajo este criterio de clasificación, Zanella (2012) menciona que varios de los métodos de síntesis de “arriba hacia abajo”, salvo la molienda, resultan costosos ya que requieren de instrumentación compleja y complicada, haciendo más viable la utilización de métodos de “abajo hacia arriba”, en específico los que utilizan procedimientos químicos, ya que éste método es el más conveniente para la obtención de partículas uniformes y pequeñas.

Sin embargo, Agnihotri *et al.* (2004) comentan sobre algunos métodos comunes para la preparación de NPs tales como:

Emulsión: en éste método, se prepara una emulsión a través de la emulsificación de una solución acuosa en una fase oleosa, la cual es agitada vigorosamente y que produce la separación de las partículas.

Precipitación: en este caso, las partículas son producidas por la disolución del agente de interés en una solución alcalina. Posteriormente, se lleva a cabo una separación y purificación de las partículas por medio de la centrifugación y filtrado, seguido de un lavado con agua caliente y fría.

Secado por aspersión: es una de las técnicas más conocidas y usadas para producir polvos, gránulos o aglomerados. Se basa en el secado de gotas esparcidas con aire comprimido caliente y se requiere del uso de un solvente el cual es instantáneamente evaporado, permitiendo la formación de NPs.

4.2.2. Caracterización de NPs

El desarrollo de sistemas cada vez más pequeños presenta nuevos desafíos en la investigación como consecuencia de las dificultades que existen en la fiabilidad, comparabilidad y reproducibilidad de los materiales a una pequeña escala. Sin embargo, los avances en cuanto al tema de caracterización, han comenzado a evolucionar y hoy en día existe la posibilidad de determinar las características fisicoquímicas de las NPs como son: tamaño de partícula, distribución de tamaño, superficie, carga y topografía de la superficie, composición y pureza, hidrofobicidad y solubilidad, reactividad química y bioactividad, dispersión, entre otras (FSAI, 2008).

4.2.2.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

El SEM (*Scanning Electron Microscopy*), produce imágenes amplificadas de alta definición utilizando un haz de electrones en lugar de un haz de luz en la formación de la imagen. Se produce un rayo de electrones en la parte más alta del microscopio por medio de un filamento, el cual viaja a través del cañón de electrones. El rayo de electrones sigue un camino vertical a través del microscopio,

el cual se encuentra al vacío. El haz atraviesa campos electromagnéticos y lentes, los cuales enfocan el haz hacia la muestra. Una vez que el haz golpea la muestra, electrones y rayos X son emitidos por la muestra, los detectores recolectan los rayos X, electrones dispersados y electrones secundarios y los convierte en una señal, la cual es mandada a una pantalla para producir la imagen final (Purdue University, 2014). En la Figura 2 se muestra el diagrama de un microscopio electrónico de barrido.

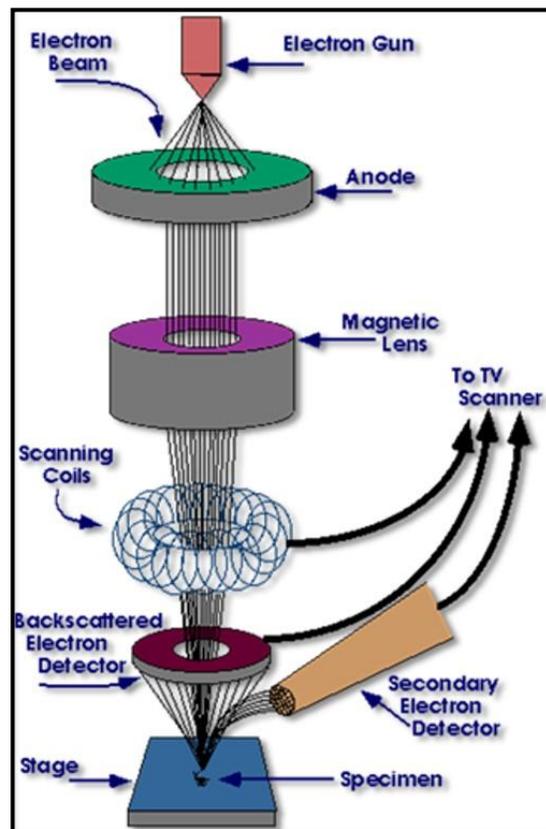


Figura 2. Diagrama de un equipo SEM (Purdue University, 2014).

El TEM (*Transmission Electron Microscopy*) opera con los mismos principios básicos que el SEM utilizando electrones en lugar de luz, ya que los electrones tienen una menor longitud de onda haciendo posible obtener una resolución mucho mejor que con un microscopio de luz. Se pueden observar objetos en el rango de los angstroms, esta posibilidad convierte al TEM en una herramienta útil en la

investigación de materiales, biología y medicina. Su funcionamiento se basa en los electrones emitidos en la fuente de luz en la parte alta del microscopio, los cuales viajan a través de vacío por la columna del microscopio. La diferencia con otros microscopios es que este usa lentes electromagnéticas para enfocar los electrones en un haz muy delgado. El haz viaja a través de la muestra a estudiar y dependiendo de su densidad algunos electrones son dispersos. En la base del microscopio los electrones que no fueron dispersos impactan una pantalla fluorescente, la cual se encarga de elaborar una imagen de la muestra mostrando diferentes contrastes dependiendo a la densidad del material (Nobel Prize Organization, 2015). En la Figura 3 se ejemplifica la estructura de un microscopio TEM.

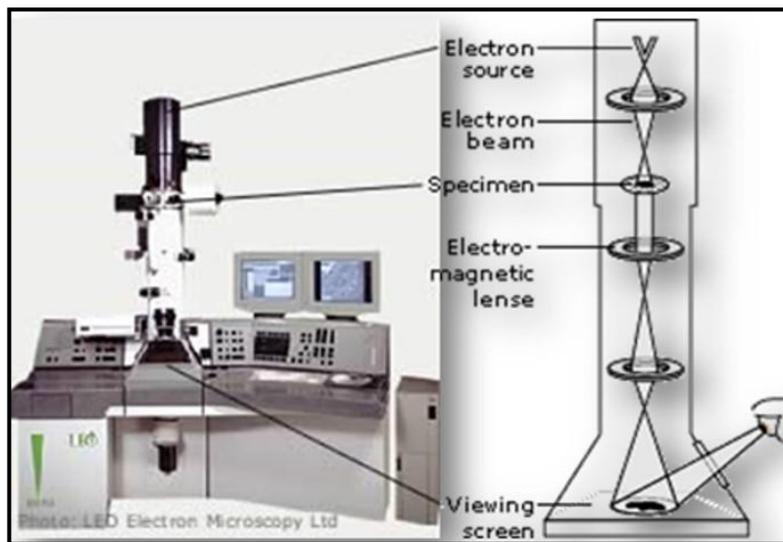


Figura 3. Diagrama de un equipo TEM (Nobel Prize Organization, 2015).

4.2.2.2. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de DLS es usada para determinar la distribución de tamaño de partículas pequeñas en suspensión. Se utiliza un láser el cual impacta las partículas provocando que la luz se disperse en todas direcciones siempre y cuando la partícula sea de un tamaño comparado con la longitud de onda. Al ser un láser la fuente de luz (monocromática y coherente) se observa una fluctuación en la intensidad de dispersión. Estas fluctuaciones se deben a que las moléculas en

solución están sometidas a un movimiento browniano por lo que las distancias entre las dispersiones en la solución cambian con el tiempo. La luz dispersa pasa por interferencia constructiva o destructiva por las partículas en el medio y dentro de la intensidad de fluctuación se encuentra la información acerca de la escala del tiempo del movimiento de las dispersiones.

El tamaño medido con DLS cuantifica el movimiento de un líquido, al cual se le llama “radio hidrodinámico”. Si existe una capa de moléculas alrededor de la superficie de la partícula será más lenta la velocidad de difusión, por lo tanto el radio hidrodinámico se verá afectado por las moléculas de solvente, así como otras especies (iones, solutos) presentes en solución (Mattison *et al.*, 2013).

En la Figura 4 se ejemplifica el concepto de radio hidrodinámico que es la magnitud medida indirectamente (a través de la determinación del coeficiente de difusión) por el equipo de DLS.

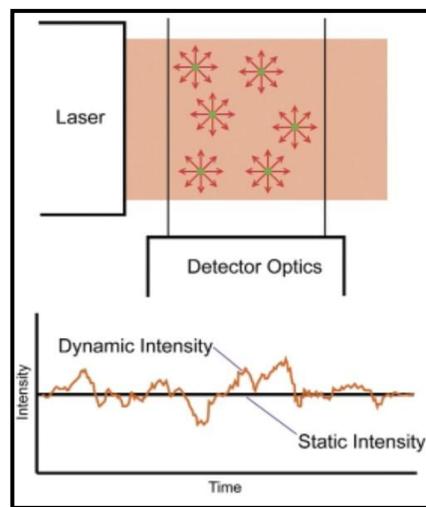


Figura 4. Esquema que detalla el radio hidrodinámico de una partícula y las subsecuentes intensidades de dispersión de luz estática y dinámica (Mattison *et al.*, 2013).

4.2.2.3. Espectroscopia de energía dispersa (EDS)

EDS (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) es una técnica analítica útil para identificar y cuantificar la composición elemental de una muestra. El material contenido en la muestra, el cual se prepara de igual manera que en el método de SEM es bombardeado por electrones de éste equipo y los rayos X producidos son medidos con un espectroscopio de rayos X. Cada elemento en la muestra analizada, emite una longitud de onda característica el cual permite ser identificado por ésta (Garrat-Reed y Bell, 2003).

4.2.2.4. Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo es útil para dar información de los grupos funcionales en la molécula y depende de las transiciones entre los estados de energía vibracionales de las moléculas, por ejemplo vibraciones de estiramiento y flexión. La región más útil del infrarrojo es entre 4000-670 cm^{-1} . Este tipo de espectroscopia es clave para la determinación de la estructura del compuesto y su naturaleza química e identidad ya que cada grupo funcional como carbonilos, aminas, hidroxilos, etc. tienen diferente número de onda y se pueden identificar en el espectro de IR. En la Figura 5, se muestra un esquema de un espectrofotómetro basado en la transformada de Fourier en el que se observa que el rayo infrarrojo es generado en la fuente de radiación (A) y después colimado y dirigido al interferómetro (C) a través de un espejo fijo (B). Posteriormente, el rayo láser de Helio-Neón sigue a la radiación infrarroja a través del interferómetro con el fin de determinar el desplazamiento del espejo móvil y así conocer la longitud de onda a la que se produce la absorción de radiación (Curia, 2010).

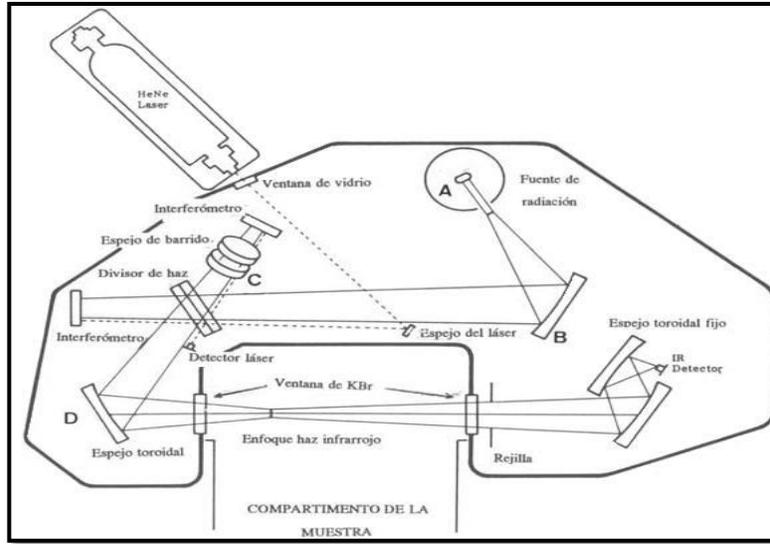


Figura 5. Esquema de un espectrofotómetro por transformada de Fourier (Curia, 2010).

4.2.2.5. Difracción de rayos X de polvos (pDRX)

La pDRX es una técnica que se emplea para el estudio y análisis de materiales basado en el fenómeno de difracción por sólidos en estado cristalino o incluso sólidos policristalinos. Los rayos X interactúan con los electrones que rodean los átomos. El haz de rayos emergente después de la interacción contiene la información sobre la posición y el tipo de átomos encontrados en su camino. En el caso de un cristal los haces de rayos X dispersados por los átomos en diferentes direcciones resultan amplificados por el fenómeno de interferencia constructiva, lo cual da lugar a un patrón de difracción. Los rayos difractados se colectan por detectores para poder analizar su intensidad y posición por medio de métodos matemáticos y así obtener una representación de las moléculas del material estudiado. La caracterización de difracción de rayos X para muestras policristalinas, se basa en las interferencias constructivas cuando se hace incidir un haz de rayos X de una cierta longitud de onda del orden de las distancias interatómicas del sólido que se quiere estudiar y en la ley de Bragg. Los ángulos de desviación están íntimamente relacionados con la distancia entre planos de las redes cristalinas por lo que el difractograma de una sustancia es característico de la disposición u

ordenamiento de los átomos que la componen. La señal de difracción emitida por un sólido cristalino es una evidencia de su estructura y la intensidad de las líneas de difracción en función de la concentración de las diferentes fases cristalinas. En la Figura 6 se muestra un esquema del proceso de difracción de rayos X.

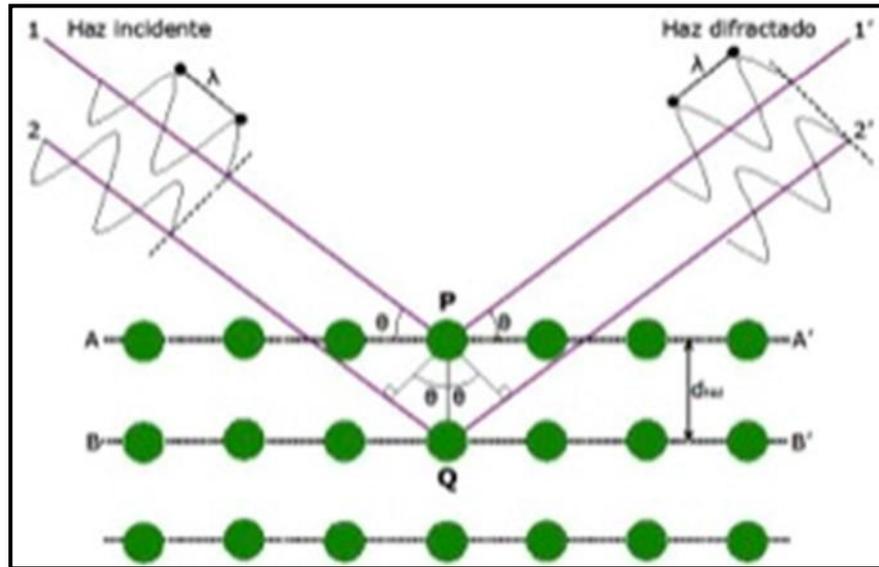


Figura 6. Esquema de difracción de rayos X (Cañada, 2011).

4.2.3. Aplicaciones de la nanotecnología en la producción animal

Recientemente, ha incrementado la investigación de los usos de la nanotecnología en el área de la biología, especialmente en la administración de fármacos para seres humanos, y existe la necesidad de aplicar dichos conocimientos en el de zootecnia, particularmente lo que concierne a salud animal, con el objeto de facilitar y optimizar los procesos de producción de alimentos de origen animal. Sin embargo, existe poca o nula investigación al respecto, a pesar que gran parte de la investigación enfocada a la salud humana se realiza con modelos animales. Esto es de particular interés al considerarse animales destinados a consumo humano, donde deben de tenerse en cuenta factores éticos, ambientales y de seguridad alimentaria. En este sentido, Scott (2005) señala cuatro posibles aplicaciones de la nanotecnología en los animales:

- 1) La administración de medicamentos, nutrientes, probióticos, suplementos y otras sustancias.
- 2) Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades con NPs que permiten la detección y eliminación de la causa de la enfermedad sin necesidad de cirugía.
- 3) Registro de identidad que permite un seguimiento de la historia de un animal y sus productos (carne, leche, huevos, principalmente).
- 4) La reproducción se facilita con el uso de inmunosensores hormonales.

Actualmente existen algunas investigaciones realizadas con animales de interés zootécnico, aunque el número de estudios es todavía muy reducido, Romero-Pérez *et al.* (2010) diseñaron y evaluaron, *in vitro*, NPs de selenito de sodio para su uso en rumiantes utilizando copolímeros de metacrilato, sensibles al pH, de manera que no fueran degradadas en el rumen (cerca de pH neutro), pero sí en abomaso, sus resultados muestran que la máxima liberación de estas partículas se dio en un pH ácido (menor que 4), lo cual puede representar una mejor disponibilidad del mineral en el intestino delgado.

González-Eguía *et al.* (2009) encontraron que la suplementación dietética de cobre en tamaño nanométrico tiene efectos benéficos tanto en cerdos en crecimiento como en lechones al destete en comparación con el CuSO₄, ya que se mejoró la disponibilidad de cobre y por lo tanto se redujo el nivel de excreción fecal de este mineral.

Por otra parte, las NPs de plata (con fines antibacterianos) se evaluaron en varias investigaciones y Andi *et al.* (2011) y Shabani *et al.* (2010) encontraron mejoras en la ganancia de peso y conversión alimenticia en pollos de engorda, en tanto que, Ahmadi y Kurdestani (2010) no encontraron ningún efecto. Ahmadi *et al.*

(2009) reportaron un aumento de peso en el borde de cepillo del tracto gastrointestinal de pollos alimentados con NPs de plata.

Recientemente, Vijayakumar y Balakrishnan (2014) estudiaron el efecto de la adición de NPs de fosfato de calcio en el crecimiento de pollos de engorda y concluyen que la adición a la dieta de 50% de estas y 50% de fosfato de calcio comercial mejora la ganancia de peso y la conversión alimenticia.

4.2.4. Absorción, distribución y toxicidad de NPs

A pesar de los riesgos que pueden existir sobre el uso de NPs, es escasa la información disponible sobre la absorción, distribución y toxicidad de éstas.

Como se mencionó anteriormente, las NPs presentan una mayor superficie (Figura 7), la cual permite una mayor área de contacto con las membranas celulares, así como una mayor capacidad para la absorción (FSAI, 2008).

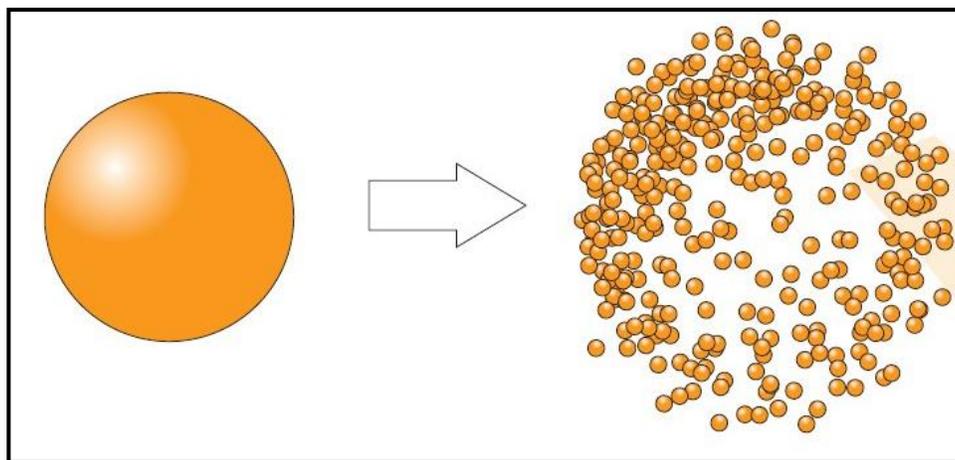


Figura 7. Esquema del cambio en la superficie cuando la partícula se hace más pequeña (FSAI, 2008).

Una vez en el tracto gastrointestinal (TGI) después de la exposición oral, la absorción se produce diversamente por difusión pasiva a través de las células de la mucosa, por medio de mecanismos de transporte y vía intracelular (O'Hagan,

1996). Cuando las NPs entran al TGI, éstas se absorben a través del moco y el contacto con las células intestinales. Cuanto menor sea el diámetro de partícula, será más rápida la difusión a través de la membrana plasmática de las células del TGI, para penetrar al torrente sanguíneo y distribuirse a todos los órganos del cuerpo. Se considera que la distribución de las NPs en todos el organismo es semejante a la distribución que se da con partículas de tamaño convencional; sin embargo, las NPs insolubles (materiales poliméricos artificiales principalmente inorgánicos) pueden tener una distribución en el organismo muy restringida (FSAI, 2008).

Para considerar si un material en tamaño nanométrico es tóxico o no, se puede suponer que éste tendrá peligros similares a los del mismo material en tamaño micrométrico o macrométrico, de tal forma que si la sustancia a evaluar, tiene un perfil toxicológico inocuo debido a la inercia biológica y biodegradabilidad, el nanomaterial similar puede predecirse como de bajo peligro (FSAI, 2008). En contraparte, algunos materiales que por naturaleza son tóxicos como algunos compuestos de metales de partículas inorgánicas, pueden mostrar la misma toxicidad o mayor si se producen en un tamaño nanométrico como lo indican algunos autores (Meng *et al.*, 2007; Papageorgiou *et al.*, 2007 y Singh *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos estudios sugieren que las NPs pueden ser menos tóxicas que las partículas de tamaño macrométrico, como lo informa Jia (2005) en un estudio en el que reporta que las NPs de selenio son menos tóxicas para las ratas que la selenito de sodio.

5. LITERATURA CITADA

- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna N. N. and Aminabhavi T. M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 100:5-28.
- Ahmadi, F. and Kurdestani A. H. 2010. The impact of silver nanoparticles on growth performance, lymphoid organs and oxidative stress indicators in broiler chicks. *Global Veterinaria*. 5:366-370.

- Ahmadi, J., Mehrdad I. and Mahdi C. 2009. Pathological study of intestine and liver in broiler chickens after treatment with different levels of silver nanoparticles world Journal Applied Sciences. 7:28-32.
- Andi, M. A., Mohsen H. and Farhad A. 2011. Effects of feed type with /without nanosil on cumulative performance, relative organ weight and some blood parameters of broilers. Global Veterinaria. 7:605-609.
- Arnaud, C. D. and Sánchez S. D. 1996. Calcium and phosphorous. Present Knowledge on Nutrition. Vol. 7.
- Beltrán, L. J., Cuca G. M., González A. M. J. y Pro M. A. 2000. Estimación del nivel de fósforo con y sin adición de fitasa en pollos de engorda en iniciación. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 8(1):1-7.
- Cañada, P. 2011. Unidad Difracción de Rx. Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación. En: <http://www.scai.uma.es/servicios/agcm/drx/drx.html>. Consulta: 04 de mayo de 2015.
- Cornejo, S., Pokniak J., González J., Salazar J. y Contreras E. 2005. Evaluación de un fosfato dicálcico importado en dietas de pollos broiler. Archivos de Medicina Veterinaria. 37(2):125-132.
- Cuca, G. M., De la Rosa C. G., Pro M. A y Baeza L. J. 2003. Disponibilidad del fósforo de la pasta de soya y sorgo-gluten de maíz, adicionadas con fitasa en pollos de engorda en iniciación. Técnica Pecuaria de México. 41(3):295-306.
- Cuca, G. M., Ávila G. E. y Pro M. A. 2009. Alimentación de las aves. Universidad Autónoma Chapingo. 276 pp.
- Curia, M. V. 2010. Estudio fisicoquímico y catalítico del sistema Mn-OV. Capítulo IV. Técnicas de Caracterización. Conceptos Generales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. En: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2681/IV_-_Técnicas_de_caracterización_Conceptos_generales.pdf?sequence=8 Consulta: 07 de mayo de 2015.
- Dorozhkin, S. V. 2009. Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine. Materials. 2(4):1975-2045.
- De Blass, C., Mateos G. G. y García-Rebollar P. 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal. 3a. edición. Madrid. 502 pp.

- FEDNA. 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal. En: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/fuentes-de-f%C3%B3sforo
- Fernandes, J. I. M., Lima F. R., Mendonça C. X. Jr., Mabe I., Albuquerque R. and Leal P. M. 1999. Relative bioavailability of phosphorus in feed and agricultural phosphates for poultry. *Poultry Science*. 78:1729-1736.
- FSAI. 2008. Food Safety Authority of Ireland. The relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries. Dublin I: Food Safety Authority of Ireland. 82 pp.
- Garrat-Reed, A. J. and Bell D. C. 2003. Energy-dispersive X-Ray analysis in the electron microscope. *RMS Microscopy handbooks*. No. 49. Oxford. BIOS Scientific publishers Ltd.
- Gillis, M. B., Norris L. C. and Heuser G. F. The utilization by the chick of phosphorus from different sources. *Journal of Nutrition*. 35:195-207.
- Gonzales-Eguia, A., Ming F. Ch., Yin L. F. and Fa L. T. 2009. Effects of nanocopper on copper availability and nutrients digestibility, growth performance and serum traits of piglets. *Livestock Science*. 126:122-129.
- Hernández, G., Godoy S. y Chicco C. F. 2006. Biodisponibilidad del fósforo de cereales en aves. *Revista Científica FCV-LUZ*. 16(2):149-154.
- Jia, X., Li N. and Chen J. 2005. A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats. *Life Sciences*. 76(17):1989-2003.
- Kakade, N. 2003. Nanotechnology: New challenges. *Elect. You*. 35:3-36.
- Kebreab, E., France J., Kwakkel R. P., Lesson S., Darmani Kuhi H. and Dijkstra J. 2009. Development and evaluation of a dynamic model of calcium and phosphorus flows in layers. *Poultry Science*. 88:680-689.
- Keshavarz, K. and Austic R. E. 2004. The use of low-protein, low-phosphorous, aminoacid- and phytase- supplemented diets on laying hen performance and nitrogen and phosphorous excretion. *Poultry Science*. 83:75-83.
- Leeson, S. and Summers J. D. 2005. *Commercial Poultry Nutrition*. Third Edition. University Books. Guelph, Ontario. 406 pp.
- Lima, F. R., Mendonça Jr. C. X., Álvarez J. C., Ratti G., Lenaro S. L. R., Kahn H. and Garzillo J. M. F. 1995. Chemical and physical evaluations of comercial

dicalcium phosphates as sources of biologically available phosphorus for broiler chicks. *Poultry Science*. 74:1659-1670.

Mattison, K., Morfesis A. and Kaszuba M. 2013. A primer on particle sizing using dynamic light scattering. *American Biotechnology Laboratory*. 1:20-22.

Mc Dowell, L. R. 2003. *Minerals in animal and human nutrition*. 2^a. Edition. Elsevier Science B. V. 644 pp.

Meng, H., Chen Z., Xing G., Yuan H., Chen C., Zhao F., Zhang C. and Zhao Y. 2007. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: Explanation of oral toxicity of nano-copper particles. *Toxicology Letters*. 175:102-110.

Nobel Prize Organization. 2015. The transmission Electron Microscope. <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/>. Consulta el 04 de Mayo de 2015.

NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. Ninth revised edition. National Research Council. National Academy Press, Washington, D. C. USA. 155 p.

O'Hagan, D. T. 1996. The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. *Journal of Anatomy*. 189:477-482.

Papageorgiou, I., Brown C., Schins R., Singh S., Newson R., Davis S., Fisher J., Ingham E. and Case C. P. 2007. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt- chromium alloy on human fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials*. 28:2946-2958.

Purdue University. 2014. Scanning Electron Microscope. <https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>. Consulta el 04 de mayo de 2015.

Ramírez, M. M. and Hernández M. O. 2010. Nanotechnology on animal production. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12:423-429.

Rao, C. N. R., Muller, A. and Cheetman A. K. 2004. *The Chemistry of Nanomaterials* (Vol. 1 y 2). Weinheim: Wiley-VCH.

Rebollar, P. G. y Mateos G. G. 1999. El fósforo en nutrición animal. Necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. XV Curso de especialización FEDNA. *Avances en nutrición animal*. 19-64.

Rodehutschord, M. 2011. Avances en la valoración del fósforo en aves. XVII Curso de especialización FEDNA. 237-246. XXVII Curso de especialización FEDNA. Madrid. 237-246.

- Rohner, F., Ernst F. O., Arnold M., Hilbe M., Biebinger R., Ehrensperger F., Pratsinis S. E., Langhans W., Hurrell R. F. and Zimmermann M. B. 2007. Synthesis, characterization, and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles. *The Journal of Nutrition*. 137(3):614-619.
- Romero-Pérez, A., García G. E., Zavaleta M. A., Ramírez B. J. E., Revilla V. A., Hernández C. L. M., López A. R. and Cruz M. R. G. 2010. Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles *in vitro* to improve selenium absorption in ruminants. *Veterinary Research Communications*. 34(1):71-79.
- Schmid, G. 2004. *Nanoparticles. From theory to application*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Scott, M. L., Nesheim M. C. and Young R. J. 1976. *Nutrition of the chicken*. 2a edición. M. L. Scott & Associates. Ithaca, New York. 555 pp.
- Scott, M. L., Nesheim M. C. and Young R. J. 1982. *Nutrition of the chicken*. 3a edición. M. L. Scott & Associates. Ithaca, New York. 562 pp.
- Scott, N R. 2005. Nanotechnology and animal health. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. 24:425-432.
- Sekhlon, B. S. 2012. Nanoprobes and their applications in veterinary medicine and animal health. *Res. J. Nanosci. Nanotechnol.* 2:1-16.
- Shabani, A., Dastar B., Khomeiri M., Shabanpur B. and Hassani S. 2010. Effects of zeolite hydrocolloidal silver nanoparticles on the performance and serum biochemical parameters in broiler during experimental aflatoxicosis. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*. 28:98.
- Sharpley, A. 1999. Symposium: Reducing the environmental impact of poultry production: Focus on phosphorus. *Poultry Science*. 78:660-673.
- Sibbald, I. R. 1987. Estimation of bioavailable amino acids in feedingstuffs for poultry and pigs: a review with emphasis on balance experiments. *Canadian Journal of Animal Science*. 67:221-301.
- Silos, A. J. S. 1968. Costos e ingresos en la producción de huevo en la Comarca Lagunera. *Primer Ciclo de Conferencias Internacionales sobre avicultura*. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México, D. F.
- Singh, S., Shi T., Duffin R., Albrecht C., Van Berlo D., Höhr D., Fubini B., Martra G., Fenoglio I., Borm P. J. A. and Schins R. P. F. 2007. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222:141-151.

- Tegart, G. 2005. El fascinante mundo de lo pequeño. Dialnet. 10(3):88-98.
- Ternouth, J. H. and Coates D. B. 1997. Phosphorus homeostasis in grazing breeder cattle. The Journal of Agricultural Science. 128(3):331-337.
- Underwood, E. J. 1981. Los minerales en la nutrición del ganado. 2ª Edición. Acribia. 210pp.
- Vallardi, G. M., Morales L. R. y Ávila G. E. 2002. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. Técnica Pecuaria de México. 40(2):181-186.
- Verma, O. P., Kumar R., Kumar A. and Chand S. 2012. Assisted reproductive techniques in farm animal - from artificial insemination to nanobiotechnology. Veterinary World. 5(5):301-310.
- Vieira, F. O. L., Koetz P. R., Santos S. M. e Nunes W. A. 2006. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). Ciência e Tecnologia de Alimentos. 26(2):309-317.
- Vijayakumar, M. P. and Balakrishnan V. 2014a. Effect of calcium phosphate nanoparticles supplementation on growth performance of broiler chicken. Indian Journal of Science and Technology. 7(8):1149-1154.
- Waldroup, P. W., Kersey J. H., Saleh E. A., Fritts C. A., Yan F., Stilborn H. L., Crum Jr. R. C. and Raboy V. 2000. Nonphytate phosphorus requirement and phosphorus excretion of broiler chicks fed diets composed of normal or high available phosphate corn with and without microbial phytase. Poultry Science. 79:1451-1459.
- Wang, X., Dai J., Chen Z., Zhang T., Xia G., Nagai T. and Zhang Q. 2004. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A-loaded pH-sensitive nanoparticles for oral administration. Journal of Controlled Release. 97:421-429.
- Zanella, R. 2012. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. Mundo Nano. 5(1):69-81.

CAPITULO I.

RESUMEN

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DICÁLCICO PARA SU APLICACIÓN EN LA NUTRICIÓN AVICOLA

Diana Angélica Gutiérrez Arenas, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

El fosfato dicálcico (FD) es comúnmente utilizado como fuente de fósforo (P) en la alimentación avícola y una posible mejora en la disponibilidad del FD, puede resultar del uso de nanopartículas de FD (NPF), por lo que en el presente estudio se empleó el método de coprecipitación para la obtención de estas. La síntesis se llevó a cabo mediante el uso de dos precursores: fosfato de sodio (Na_2HPO_4) y cloruro de calcio (CaCl_2) a temperatura ambiente, con agitación constante y pH controlado. Se utilizó como agente disgregante el polímero polivinilpirrolidona (PVP) y se llevó a cabo un lavado de sales por centrifugación. La obtención de sólidos se realizó por liofilización a -46°C y se caracterizaron por Microscopia Electrónica de Barrido y de Transmisión, Dispersión dinámica de Luz, Espectroscopia de energía dispersa, Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier y Difracción de rayos X. Se obtuvieron nanopartículas de forma prismática con un diámetro de 20 a 80 nm compuestas en su mayoría de fosfato de calcio en su fase monetita (FD anhidro) con algunos restos de hidroxiapatita. Las NPF cumplen con la estequiometría Ca:P de 1:1.1, lo cual confirma la sustancia obtenida con fórmula CaHPO_4 . Estos resultados dan a las NPF buenas características fisicoquímicas para ser utilizadas en la alimentación avícola.

Palabras clave: Nanotecnología, fosfato de calcio, innovación tecnológica, avicultura.

ABSTRACT
SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF DICALCIUM PHOSPHATE
NANOPARTICLES FOR APPLICATION IN POULTRY NUTRITION

Diana Angélica Gutiérrez Arenas, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

Dicalcium phosphate (DAP) is commonly used as a source of phosphorous (P) in the poultry feed and a possible improvement in the availability of the FD can result from use of nanoparticles FD (NPF), so in this study the method used coprecipitation to obtain these. The synthesis was carried out using two precursors: sodium phosphate (Na_2HPO_4) and calcium chloride (CaCl_2) at room temperature with constant stirring and controlled pH. It was used as the disintegrating agent polyvinylpyrrolidone polymer (PVP) and is carried out by centrifugation washed salt. The solid obtained was performed by lyophilization to -46°C and they were characterized by transmission and Scanning Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering, energy dispersive spectroscopy, infrared spectroscopy characterized with Fourier transform and X-ray diffraction. Prismatic nanoparticles were obtained with a diameter of 20 to 80 nm composed mostly of calcium phosphate in its phase monetite (FD anhydrous) with some traces of hydroxyapatite. NPF meet the stoichiometric Ca: P of 1: 1.1, which confirms the substance obtained with formulated CaHPO_4 . These results give the NPF good characteristics for use in poultry feed.

Keywords: Nanotechnology, poultry nutrition, calcium phosphate, technological innovation, poultry farming.

1.1. Introducción

Según Hu *et al.* (2010), las NPs de fosfato de calcio juegan un papel muy importante en diversas áreas biológicas como son, la ingeniería de tejidos y algunas otras aplicaciones médicas debido a sus características biológicas únicas, por lo que hoy en día, la posibilidad de sintetizar éste tipo de partículas a un tamaño nanométrico, ha despertado el interés de muchos investigadores para desarrollar diversos métodos de síntesis que permitan controlar tanto sus propiedades físicas, químicas y mecánicas, como forma, tamaño, biocompatibilidad, bioactividad, entre otras.

El FD es comúnmente utilizado como fuente de P en la alimentación avícola. Por lo que el uso de NPFDF puede mejorar la disponibilidad de este nutriente, ya que la reducción en el tamaño de partícula, puede mejorar la eficiencia de absorción en el tracto gastrointestinal de las aves.

Existe una gran variedad de técnicas, materiales y factores que influyen en la elaboración de NPs. Distintos métodos se utilizan para sintetizar NPs de fosfato de calcio como: síntesis sol-gel, co-precipitación, reacción hidrotérmica, síntesis mecanoquímica, vibro-fresado de hueso natural, etc., (Kuriakose *et al.*, 2004; Tas, 2000a; Tas, 2000b y Ruksudjarit *et al.*, 2008). En el caso de NPFDF, algunos autores (López-Macipe *et al.*, 1998; Boanini *et al.*, 2006; Sokolova *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010) sugieren el suministro de diferentes precursores tanto para Ca [CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCO_3 o $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$], como para P [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, KH_2PO_4 , N_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4]; así como algunos compuestos que favorecen las características deseadas de cada producto en particular como son: ácido poliacrílico, ácido cítrico, aminoácidos, ácido etilendiaminotetraacético, entre otros.

De toda la variedad de métodos de síntesis de NPs de fosfato de calcio, el método de coprecipitación es el más sencillo y que se puede llevar a cabo a una

escala industrial (Tamuly and Saxena, 2012), por lo que la elección de este método puede cubrir las expectativas de aplicación práctica en la industria avícola.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Instituciones participantes

Las siguientes instituciones facilitaron el uso de sus instalaciones y equipos analíticos para la realización de la presente investigación:

- Laboratorio de Nutrición Animal, Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.
- Laboratorio de NanoBioinorgánica (CI-017), Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de las Américas Puebla.
- Laboratorio de Difracción de Rayos X, Instituto de Física, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Laboratorio Universitario de Nanotecnología ambiental. Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Central de Instrumentación de Microscopia. Instituto Politécnico Nacional.
- Instituto Nacional de Cancerología. Secretaría de Salud.

1.2.2. Síntesis de NPFD

Las pruebas iniciales para la síntesis de NPFD se realizaron en el Laboratorio de NanoBioinorgánica del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad de las Américas Puebla y en el Laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados. Todos los reactivos empleados, fueron de grado analítico y obtenidos de fuentes comerciales.

1.2.2.1. Reactivos e instrumental utilizado

- Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) marca J. T. Baker. PM 141.96 (Solución a 10.8mM)
- Cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) marca J. T. Baker PM 110.99 (Solución a 18mM)
- Polivinilpirrolidona PV40T-500G marca Sigma-Aldrich® (Solución al 1%)
- Ácido clorhídrico (HCl) marca J. T. Baker. PM. 36.46 (Solución al 20%)
- Agua destilada
- Parrilla-agitador 5''X 7'' 120V
- Pipeta de 10 ml
- Jeringas de 5ml
- Espátula
- Goteros
- Vaso de precipitado de 1000 ml, 2000 ml
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz aforado de fondo redondo
- Embudo
- Soporte universal
- Pluma láser
- Centrifuga
- Estufa
- Balanza analítica
- Liofilizadora

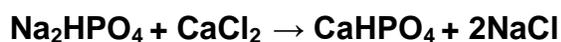
1.2.2.2. Cálculos para la preparación de soluciones

Para la preparación de los nanomateriales, se prepararon las siguientes soluciones acuosas de los precursores necesarios:

- Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) (10.8mM)
 $50 \text{ ml Na}_2\text{HPO}_4 \times (10.8 \text{ mM}/1000 \text{ ml}) \times (1\text{M}/1000 \text{ mM}) \times (141.96\text{g}/1 \text{ Mol}) = 0.07666\text{g}.$
- Cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) (18mM)
 $50 \text{ ml CaCl}_2 \times (18 \text{ mM}/1000 \text{ ml}) \times (1\text{M}/1000 \text{ mM}) \times 110.98\text{g}/1 \text{ Mol} = 0.09988\text{g}$
- Ácido Clorhídrico (HCl) (20%)
 Se agregaron 20 ml de HCl concentrado, en 80 ml de agua destilada
- Polivinilpirrolidona (PVP) PV40T-500G (Sigma-Aldrich®) (1%)
 Se agregaron 0.5g en 50 ml de agua destilada

1.2.2.3. Síntesis de nanopartículas

Las NPFs fueron sintetizadas acorde a la siguiente reacción química:



Cantidades estequiométricas tanto de fosfato de sodio (Na_2HPO_4) y cloruro de calcio (CaCl_2) se disolvieron en dos soluciones separadas de agua destilada a temperatura ambiente. Las soluciones de estos precursores se fijaron a 108 mM de Na_2HPO_4 y 180 mM de CaCl_2 con la finalidad de incrementar la concentración diez veces más, para aumentar el volumen de producción en menor tiempo. La síntesis de NPFs se realizó mediante el método de coprecipitación en donde la solución de Na_2HPO_4 se adicionó gota a gota a la solución de CaCl_2 , la mezcla se mantuvo en constante agitación, temperatura ambiente y pH controlado. Por último se agregó gota a gota el polímero PVP como agente disgregante para evitar la aglomeración de las NPs y se dejó en agitación durante cinco minutos. Después de la mezcla, la solución obtenida se lavó por medio de centrifugación dos veces (cinco minutos en cada una a 8000 rpm) con la finalidad de remover lo más posible la sal (NaCl)

producida como subproducto de la reacción. La recuperación del producto sólido se realizó por medio de liofilización a -46°C para obtener las NPFD en polvo (Figura 8).

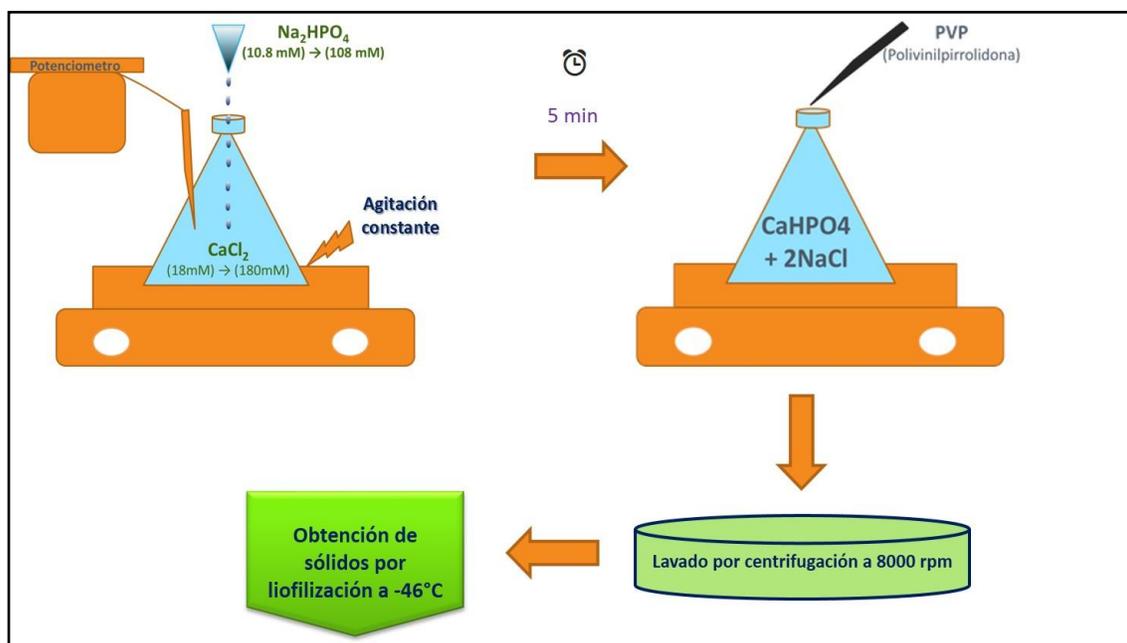


Figura 8. Esquema de la síntesis de nanopartículas de fosfato dicálcico.

1.2.3. Caracterización de NPFD

Los nanomateriales preparados se caracterizaron a través de distintas técnicas de análisis instrumental. Para la caracterización de la morfología y medición de tamaño promedio se utilizaron técnicas como SEM y TEM; para la determinación de la distribución de tamaño de partícula en solución y radio hidrodinámico se empleó la técnica de DLS; para la determinación de la composición química y estequiometría Ca:P se hizo uso de EDS; mediante FTIR se identificaron los modos vibracionales asociados con los grupos funcionales característicos de la composición química del material. Finalmente, empleando pDRX se identificó con precisión la fase cristalina a la que el material preparado pertenece, con el fin de identificar si éste corresponde al tipo de fosfato de calcio que se deseaba sintetizar.

1.2.3.1. Morfología y tamaño promedio

1.2.3.1.1. TEM y SEM

Las NPDF estabilizadas con PVP se depositaron sobre un portamuestras de cobre con cinta doble adhesiva de carbono mediante la aplicación de una pequeña gota de la muestra; el disolvente se removió en condiciones supercríticas y la muestra recubierta con una delgada capa de oro mediante la técnica de depósito de capa delgada por *sputtering* (ionizadora JEOL, Fine Coat). Posteriormente, las muestras fueron analizadas empleando un SEM (JEOL, JSM 35 C, operando a 15 Kv). Ambos equipos están disponibles en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados (COLPOS-Montecillo).

De igual manera, el tamaño y forma se analizaron empleando un TEM empleando un equipo JEM 1010 60 kV, marca JEOL en la Central de Instrumentación de Microscopía del Instituto Politécnico Nacional. Una gota de una suspensión de NPs dispersas en agua se montó en una rejilla de cobre (malla 200) recubierta con formvar. Posteriormente se observó la morfología y tamaño de dichas partículas.

1.2.3.1.2. DLS

El tamaño de partícula (radio hidrodinámico) y distribución de tamaño de partícula en solución se determinó a través de DLS, empleando un equipo Zeta-sizer Nano (Malvern Nano-ZS, láser: $\lambda = 532$ nm) y un Nanotracs Wave de Microtracs (USA), con un láser heterodino de 654 nm. Aproximadamente 0.005 g de NPDF se dispersaron en 10 ml de agua, según las recomendaciones del manual del Zeta-sizer, el cual se calibró indicando un índice de refracción de 1.5394 y absorbancia de 0.01. Posteriormente, se ultrasonizó la dilución y se procedió a la medición en ambos equipos.

1.2.3.2. Composición química

1.2.3.2.1. EDS

La composición química de las NPFd, fue analizada por medio del SEM ubicado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados (COLPOS-Montecillo), el cual tiene integrado un sistema de microanálisis por EDS, Inca-X-act pentaFET Oxford Instruments.

1.2.3.2.2. FTIR

Las muestras de NPFd fueron analizadas mediante el uso de un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier Varian Scimitar FTIR-800 con el cual se obtuvieron los espectros vibracionales necesarios para analizar y comparar respecto a los datos reportados en la literatura o con muestras estándar originales (muestras comerciales, en éste caso Fosfato dicálcico grado analítico marca Baker). Los espectros se obtuvieron en estado sólido, empleando un detector de reflectancia total atenuada (ATR), con una ventana de cristal de germanio y registrando los datos en la región entre 4000 y 400 cm^{-1} .

1.2.3.2.3. pDRX

El análisis de la fase cristalina del nanomaterial se realizó mediante pDRX empleando un difractómetro Bruker-AXS D5000 disponible en el Instituto de Física de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las muestras se pulverizaron finamente y se depositaron en un portamuestras de cuarzo; se empleó la línea $K\alpha$ de una fuente emisiva de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), en el modo 2θ , con intervalos de medición de $10\text{--}80^\circ$ y pasos de barrido de 0.02° y un tiempo de paso de 0.6 segundos.

1.3. Resultados y discusión

1.3.1. Morfología y tamaño promedio

1.3.1.1. SEM y TEM

Se obtuvieron partículas cristalinas de fosfato dicálcico estabilizadas superficialmente con PVP, con forma prismática (Figura 9).

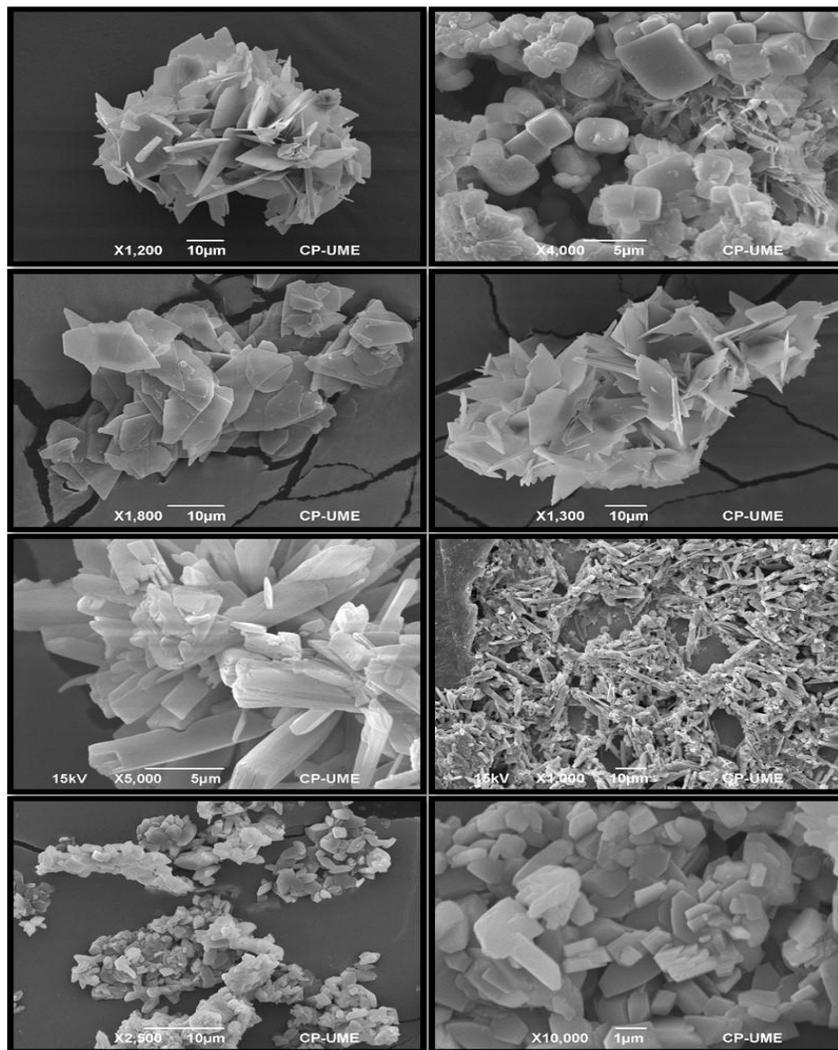


Figura 9. Micrografías de SEM de nanopartículas de fosfato dicálcico en forma prismática.

Los tamaños promedio de las partículas sintetizadas y medidas por TEM indican valores entre 20 y 80 nm (Figura 10).

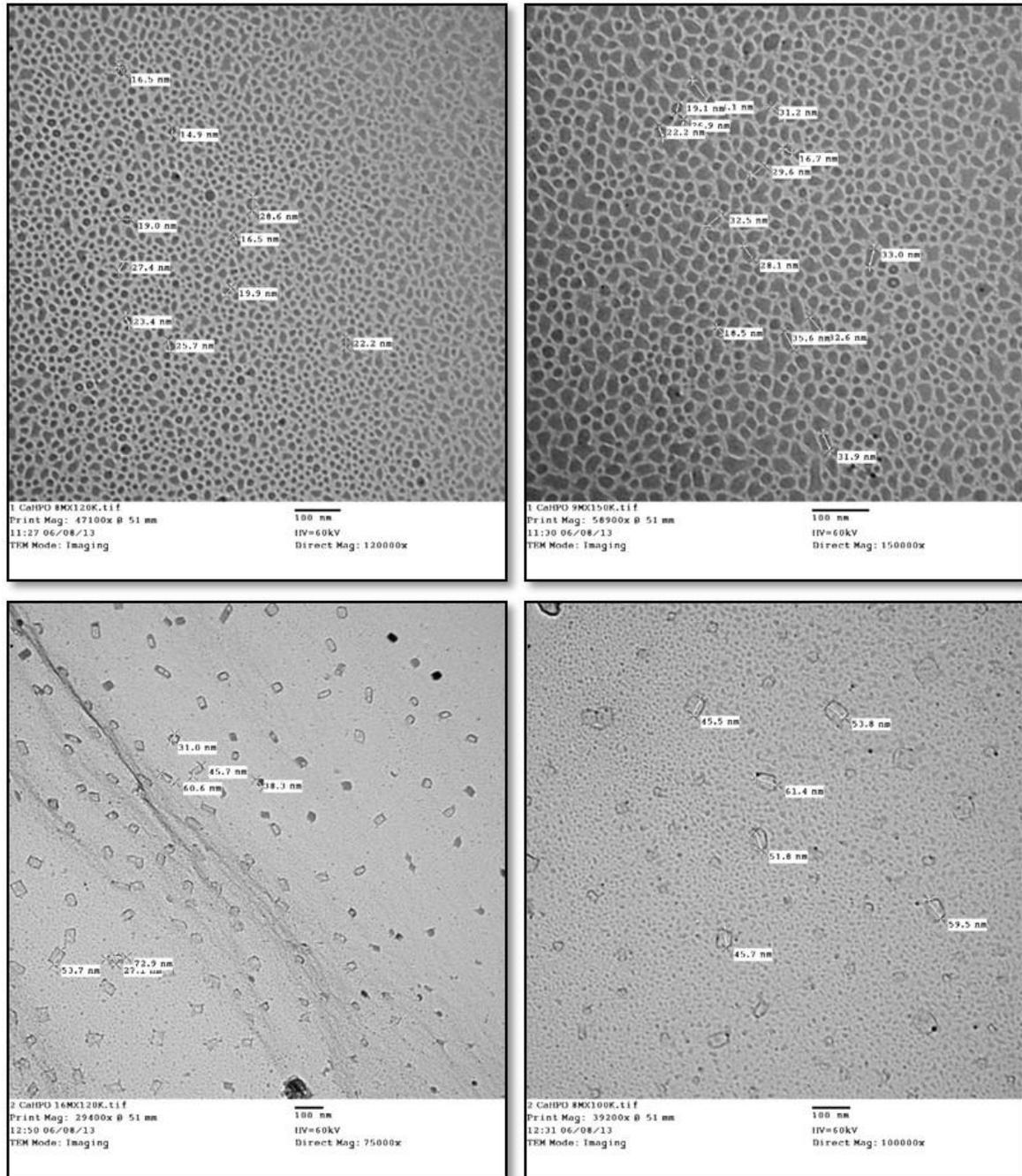


Figura 10. Micrografías de TEM de nanopartículas de fosfato dicálcico.

Estos resultados son similares a los reportados por Hu *et al.* (2010) quienes sintetizaron NPFs con el uso de dos surfactantes que regulan la síntesis de las partículas con una distribución de tamaño uniforme como son: el Bromuro de hexadecil (cetil) trimetil amonio (CTAB) y el Ácido poliacrílico (PAA); los autores reportan tamaños de partículas en un rango aproximado de 5-60 nm y con alta cristalinidad. Así mismo Hagemeyer *et al.* (2011) diseñaron NPFs unidas a un aminoácido (tirosina) como vehículos capaces de liberar fármacos y observaron en TEM partículas con un diámetro de 60-100 nm pero de forma esférica; sin embargo, el análisis en SEM reflejó partículas en un rango aproximado entre 200 y 300 nm. En el caso de Sokolova *et al.* (2010), mencionan el desarrollo de partículas esféricas con un diámetro aproximado de 50 nm que pueden servir como acarreadores de oligonucleótidos inmunoactivos dentro de las células dendríticas para su activación. Partículas de mayor tamaño reportan algunos autores como Xu *et al.* (2011), quienes sintetizaron fosfato de calcio amorfo con la técnica de secado por aspersion (spray-drying) y encontraron en TEM partículas esféricas de un tamaño aproximado de 116 nm.

1.3.1.2. DLS

El diámetro promedio de partícula de dispersión dinámica de luz con el Zeta-sizer Nano, fue alrededor de 141 nm con una distribución de tamaño unimodal (Figura 11).

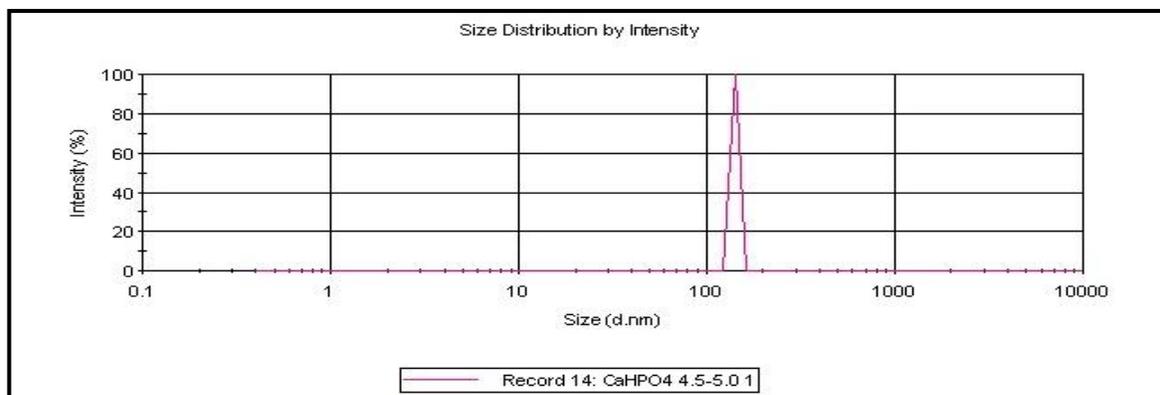


Figura 11. Distribución de tamaño por medio de DLS en Zeta-sizer Nano.

Sin embargo, el tamaño promedio de las NPFs a través del Nanotrak Wave fue de entre 23.5 nm y 2.477 μm , con una distribución de tamaño bimodal (Figura 12).

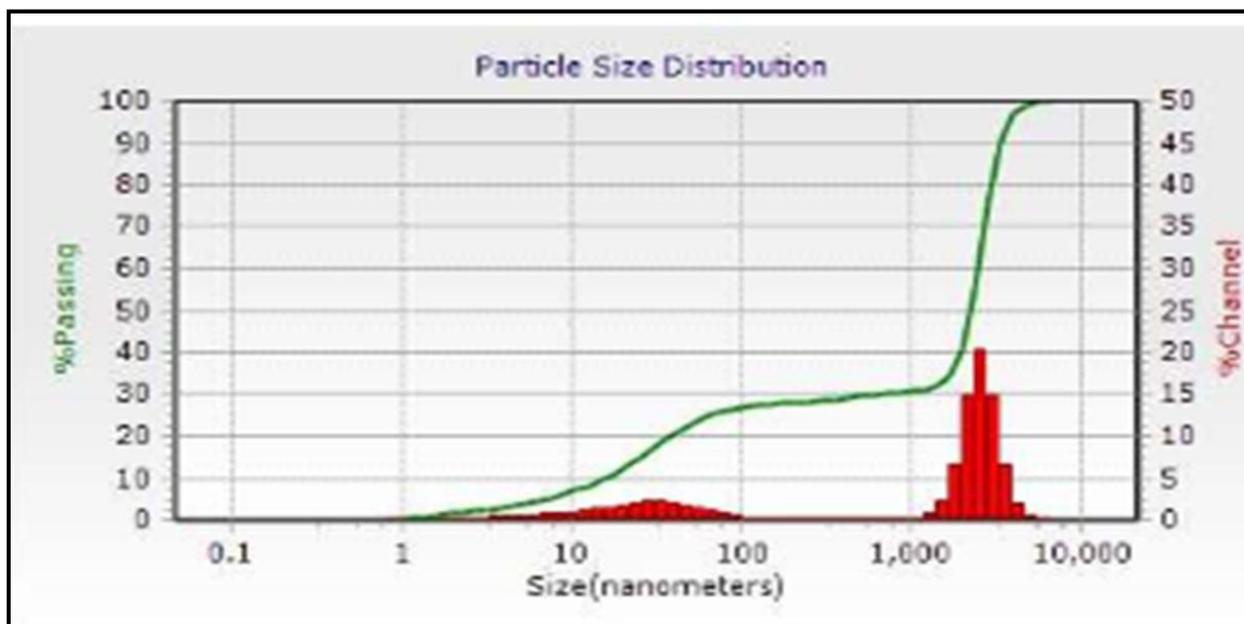


Figura 12. Distribución de tamaño por medio de DLS en Nanotrak Wave.

La diferencia de los resultados de dispersión dinámica de luz (>100 nm, en ambos equipos) y microscopía electrónica de transmisión (<80 nm) se debe a que DLS registra tanto el diámetro hidrodinámico de cada partícula como el de algunas aglomeraciones de éstas, como lo expresan Sokolova *et al.* (2010) en su investigación, ya que reportan tamaños mayores de partícula en DLS en comparación con la medición a través de TEM (170 nm y 50 nm, respectivamente). La FSAI (FSAI, 2008), indica que la tendencia de las nanopartículas a agregarse, puede ser resultado de la etapa de secado durante el proceso de síntesis, como sucedió en ésta investigación.

1.3.2. Composición química

1.3.2.1. EDS

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos por DLS y se exhiben dos zonas (1 y 2), para asegurar que los resultados de estequiometría Ca:P sean homogéneos en toda la extensión de la muestra. Los dos cuadros que incluyen el porcentaje de cada elemento, nos indican que hay una relación Ca:P (1: 1.11 y 1:1.12), la cual es acorde a la estequiometría que se busca en cuanto a éstos dos minerales.

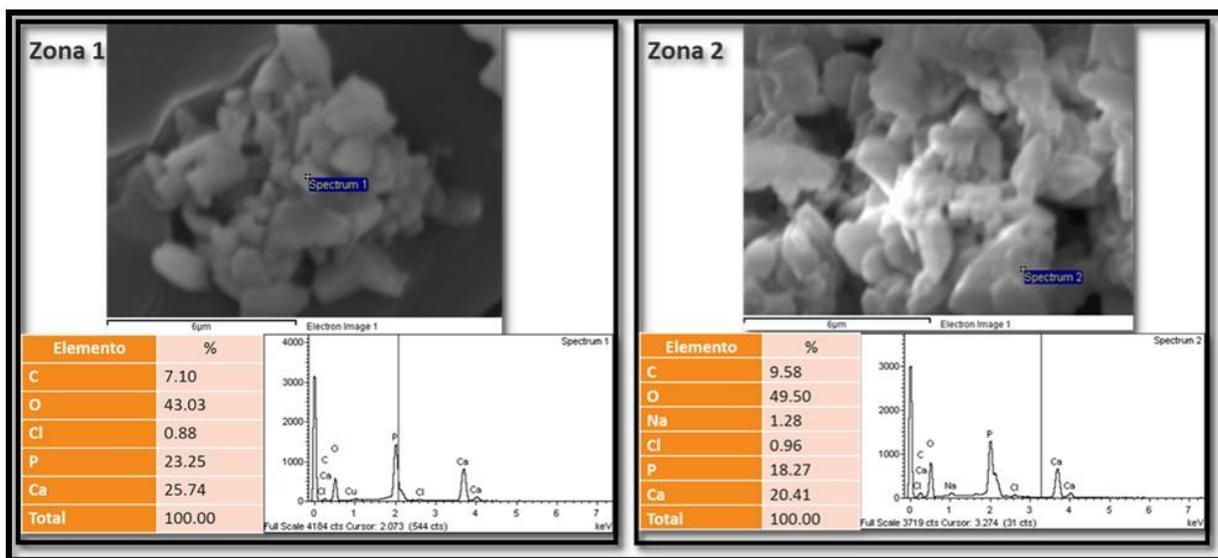


Figura 13. Resultados del análisis de EDS a muestras de nanopartículas de fosfato dicálcico.

1.3.2.2. FTIR

Los espectros de infrarrojo con transformadas de Fourier para las NPFd sintetizadas, muestran las típicas bandas asociadas a las vibraciones P-O, características de los grupos fosfato. El patrón simétrico de 3 bandas entre 1120 y 980 cm^{-1} como se muestra en la Figura 14, es característico para la fase de brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o monetita (CaHPO_4).

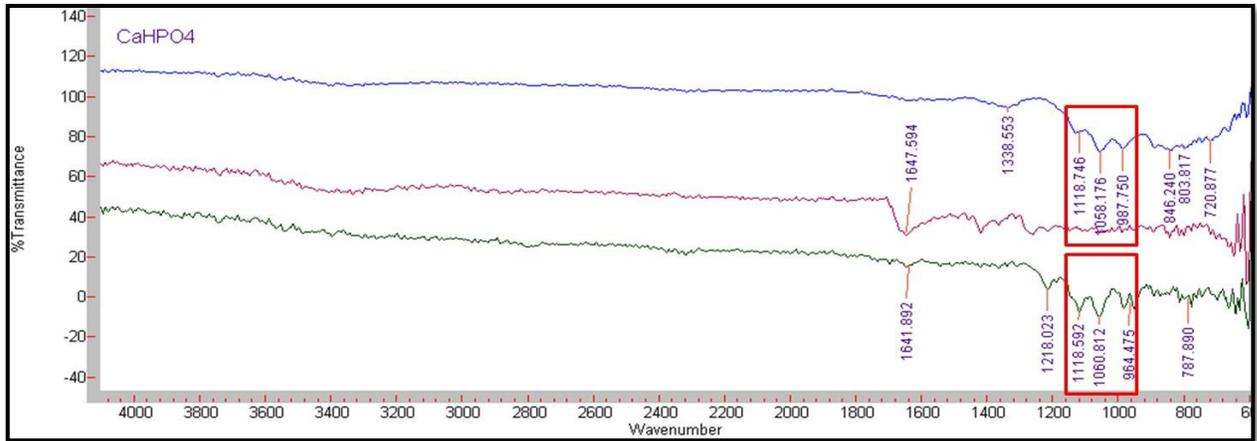


Figura 14. Gráfica de FTIR que muestra el comparativo de las nanopartículas de fosfato dicálcico sintetizadas (abajo), con el PVP (medio) y el CaHPO_4 de grado analítico (arriba).

1.3.2.3. pDRX

El análisis de los difractogramas de rayos X para las muestras obtenidas mediante la técnica de co-precipitación a partir de la reacción controlada estequiométricamente entre fosfato dibásico de sodio y cloruro de calcio (Figura 15), indica que en todos los casos el producto mayoritariamente obtenido es fosfato de calcio en fase monetita, con algunos picos residuales correspondientes a hidroxiapatita. Estos resultados confirman que el material presenta una fórmula química del tipo CaHPO_4 , en la cual la estequiometría Ca:P es 1:1.

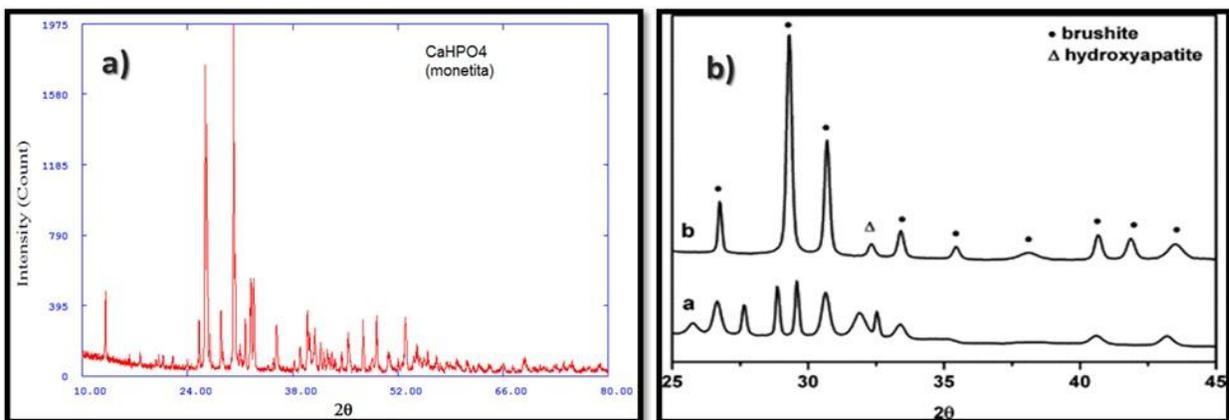


Figura 15. Difractogramas de rayos X: a) Nanopartículas de fosfato dicálcico; b) Brushita- Hidroxiapatita reportadas en la literatura.

1.4. Conclusiones

Se prepararon NPFDF por el método de coprecipitación con polivinilpirrolidona como agente disgregante. Las partículas son de forma prismática con un diámetro aproximado de 20 a 80 nm y constan de fosfato de calcio en su fase monetita con algunos restos de hidroxiapatita. Las NP cumplen con la estequiometría Ca:P de 1:1.1, la cual confirma la sustancia obtenida con fórmula CaHPO_4 .

1.5. Literatura citada

- Boanini, E., Fini M., Gazzano M. and Bigi A. 2006. Hydroxyapatite nanocrystals modified with acidic amino acids. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 23:4821-4826.
- FSAI. 2008. Food Safety Authority of Ireland. The relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries. Dublin I: Food Safety Authority of Ireland. 82 pp.
- Hagmeyer, D. Ganesan K., Ruesing J., Schunk D., Mayer Ch., Dey A., Sommerdijk N. A. J. M. and Epple M. 2011. Self-assembly of calcium phosphate nanoparticles into hollow spheres induced by dissolved amino acids. *Journal of Materials Chemistry*. 21(25):9219-9223.
- Hu, Q., Ji H., Liu Y., Zhang M., Xu X. and Tang R. 2010. Preparing nano-calcium phosphate particles via a biologically friendly pathway. *Biomedical Materials*. 5(4):1-8.
- Kuriakose, T. A., Kalkura S. N., Palanichamy M., Arivuoli D., Dierks K., Bocellif G. and Betzel C. 2004. Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature. *Journal of Crystal Growth*. 263(1): 517-523.
- López-Macipe, A., Gómez-Morales, J. and Rodríguez-Clemente, R. 1998. Nanosized hydroxyapatite precipitation from homogeneous calcium/citrate/phosphate solutions using microwave and conventional heating. *Advanced Materials*. 10(1): 49-53.
- Ruksudjarit, A., Pengpat K., Rujjanagul G. and Tunkasiri T. 2008. Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite from natural bovine bone. *Current Applied Physics*. 8(3):270-272.

- Sokolova, V., Knuschke T., Kovtun A., Buer J., Epple M. and Westendorf A. M. 2010. The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation. *Biomaterials*. 31(21):5627-5633.
- Tamuly, S. and Saxena, M. K. 2012. Preparation of calcium phosphate nanoparticles and evaluation of their effects on muscle cells of rat. *Current Science*. 102(4):610-612.
- Tas, A. C. 2000a. Combustion synthesis of calcium phosphate bioceramic powders. *Journal of the European Ceramic Society*. 20(14):2389-2394.
- Tas, A. C. 2000b. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials*. 21: 1429-1438.
- Xu, H. H. K., Moreau J. L., Sun L. and Chow L. C. 2011. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. *Dental Materials*. 27:762-769.

CAPITULO II.

RESUMEN

EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DICÁLCICO EN POLLOS DE ENGORDA EN INICIACIÓN

Diana Angélica Gutiérrez Arenas, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

El uso de nanopartículas de fosfato dicálcico (NPF) puede mejorar la disponibilidad de este nutriente, para su utilización como fuente de fósforo (P) en la alimentación avícola. Por lo que en el presente estudio, se evaluó su efecto productivo y su acumulación en tejidos en pollos de engorda en iniciación. Se utilizaron 100 pollitos machos de la línea Ross de un día de edad y se evaluaron tres fuentes de P: fosfato de calcio comercial, fosfato dicálcico grado analítico (anhidro) y fosfato dicálcico en nanopartículas (anhidro). Cada fosfato se proporcionó a las concentraciones de: 0.24, 0.35 y 0.46% de la dieta, por lo que se tuvieron nueve tratamientos y una dieta testigo con 0.13% de fósforo disponible. Se midió ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad, digestibilidad aparente del P, P total en pechuga e hígado, contenido de cenizas en tibias, P total en tibias y algunas mediciones en la tibia como: longitud, diámetro proximal, diámetro medio y diámetro distal. El uso de NPF no mejoró la respuesta productiva y fisiológica ($P > 0.05$) con respecto a las demás fuentes de fósforo inorgánico utilizadas, por lo que es conveniente realizar más investigación que permita el uso de esta tecnología en ciclos completos de engorda.

Palabras clave: Nanotecnología, nutrición avícola, producción avícola, fosfato de calcio.

ABSTRACT
EVALUATION *IN VIVO* OF DICALCIUM PHOSPHATE NANOPARTICLES (NPFD)
IN BROILERS AT INITIATION

Diana Angélica Gutiérrez Arenas, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

The use of dicalcium phosphate nanoparticles (NPFd) can improve availability of this nutrient, for use as a source of phosphorus (P) in the poultry feed. So in this study, their productive effect *in vivo* and its accumulation in tissues in broilers at initiation was assessed. 100 Ross male chicks line day old were used and three sources of P were evaluated: a commercial calcium phosphate, analytical grade dicalcium phosphate (anhydrous) and nanoparticle dicalcium phosphate (anhydrous). Each phosphate is provided concentrations: 0.24, 0.35 and 0.46% of the diet, so that nine treatments and a control diet with 0.13% available phosphorus were taken. Weight gain, feed intake, feed conversion, mortality, apparent digestibility of P, total P in breast and liver, ash content in tibia, total P in tibia, some measurements on the tibia as measured: length, proximal diameter, average diameter and distal diameter. Using NPFd not improve the productive and physiological responses ($P > 0.05$) compared to other sources of inorganic phosphorus used, thus requiring to carry out more research to allow the use of this technology in complete cycles of poultry production.

Keywords: Nanotechnology, poultry nutrition, poultry production, calcium phosphate.

2.1. Introducción

El P es un componente mineral de la dieta de las aves importante para las funciones vitales en el organismo animal. La cantidad y disponibilidad del fosfato de la dieta, son factores críticos en etapas como la ganancia de peso y resorción ósea en los animales en producción. Por lo que existe potencial para optimizar el uso de fuentes de P en el sector avícola (Cabrera *et al.*, 2002; Rodehutschord, 2011).

La composición química de un alimento indica su contenido de nutrimentos, mas no de su disponibilidad para el animal. Las pruebas ordinarias de digestibilidad tienen un valor limitado porque las heces constituyen una vía importante y variable para la excreción de muchos minerales que previamente habían sido absorbidos y metabolizados, además de la proporción que no ha sido absorbida en el tracto gastrointestinal (Underwood, 1981) y aunque existen varios métodos para medir la digestibilidad, en general todos consisten en proporcionar al animal cantidades predeterminadas de un alimento de composición conocida, para después analizar la composición de las heces en términos de la composición del alimento ingerido, ésta digestibilidad es aparente.

El desarrollo y metabolismo del hueso son esenciales para la salud y productividad de las aves (Korver y Torres, 2014). Según Rodehutschord (2011), aproximadamente 80% del P absorbido se retiene en los huesos por lo que la composición ósea es muy utilizada como indicador de la disponibilidad del P, en el caso de las aves, la tibia y los dedos de las patas son usados con este propósito, en ellos se analiza además del contenido de Ca y P, la cantidad de cenizas; sin embargo, existen otros criterios indirectos de valoración como la resistencia a la rotura, densidad, longitud, etc.

Un número considerable de fuentes inorgánicas de P son utilizadas en producciones avícolas de todo el mundo (Leeson y Summers, 2005) en especial los fosfatos dicálcicos a los cuáles se les atribuye una alta disponibilidad del P (Cabrera *et al.*, 2002), sin embargo, el precio y el efecto nocivo que puede causar al medio

ambiente lo hace parte de diversas investigaciones, por lo que existe la necesidad de eficientizar su suministro en las dietas para aves. Mejoras en la absorción en el tracto gastrointestinal provocadas por incrementos en el área superficial de las partículas de FD pueden llevarse a cabo por medio del uso de la nanotecnología, por lo que el uso de NPFDF puede ser una opción para la utilización eficiente del P que permita reducir la cantidad suministrada en las dietas y así disminuir tanto los costos por concepto de alimentación como el P excretado en heces; por lo que la evaluación de las NPFDF *in vivo* (sintetizadas como parte de esta investigación) en comparación con partículas convencionales de FD comercial y analítico, tuvo como objetivo determinar el efecto productivo del fósforo en pollos en iniciación, a través de la ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, mortalidad y acumulación del P en tejidos como: pechuga, hígado) y tibias.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Localización

La fase *in vivo* de esta investigación se realizó en la granja experimental del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Estado de México; ubicada a 19° 27' 39.3" Latitud Norte y a 98° 54' 30.1" Longitud Oeste, Altitud 2250 msnm.

2.2.2. Fase experimental y manejo de los animales

Se utilizaron 100 pollitos machos Ross de un día de edad, éstos se pesaron y se distribuyeron aleatoriamente en 10 tratamientos, con cinco repeticiones de dos pollitos cada una. Los pollitos fueron alojados por pares en criadoras eléctricas en batería con control de temperatura, bien ventiladas y con luz artificial. El experimento duró 21 días; el agua y el alimento se suministraron *ad libitum*.

2.2.3. Dietas experimentales

Se evaluaron tres fuentes de P: fosfato de calcio comercial (mezcla de varios ortofosfatos) fabricado por la empresa "Tecamac Ultra Plus S.A de C.V." y adquirido

en la empresa Productores Agropecuarios Tepexpan, S.A. de C.V.; fosfato dicálcico grado analítico (anhidro) y marca J. T. Baker; fosfato dicálcico en nanopartículas (anhidro), cuyas características ya fueron descritas anteriormente (Cuadro 2). Cada fosfato se proporcionó a las concentraciones de: 0.24, 0.35 y 0.46% de la dieta, por lo que se tuvieron nueve tratamientos y una dieta testigo con 0.13% de fósforo disponible.

Cuadro 2. Tratamientos y proporción de la fuente mineral utilizada con su respectiva concentración de Ca y Pd.

Tratamiento	Fuente Mineral	Fosfato de calcio	% de inclusión	% Pd	% Ca
1	-	-	-	0.13	1.00
2	Comercial	Fosfato de Ca*	0.52	0.24	1.00
3	Comercial	Fosfato de Ca*	1.05	0.35	1.00
4	Comercial	Fosfato de Ca*	1.57	0.46	1.00
5	Nanopartículas	FDanhidro**	0.61	0.24	1.00
6	Nanopartículas	FDanhidro**	1.22	0.35	1.00
7	Nanopartículas	FDanhidro**	1.87	0.46	1.00
8	Analítico	FDanhidro**	0.50	0.24	1.00
9	Analítico	FDanhidro**	1.00	0.35	1.00
10	Analítico	FDanhidro**	1.50	0.46	1.00

* Fosfato de calcio: La fuente comercial presenta una mezcla de varios ortofosfatos de calcio.

** FDanhidro: Tanto las NPs como la fuente de grado analítico presentan una composición de fosfato dicálcico anhidro.

Se realizó el análisis en laboratorio del carbonato de calcio utilizado, en las tres fuentes minerales de fosfato dicálcico, sorgo y pasta de soya. Los resultados fueron: carbonato de calcio con 36% de Ca, el ortofosfato de calcio comercial con 21% de P y 21% de Ca, el fosfato dicálcico en NPs con 18% de P y 24% de Ca y el fosfato dicálcico grado analítico marca J.T. Baker con 22% de P y 30% de Ca. Los análisis de Ca y P para el sorgo indican un contenido de 0.28% de P total (30% disponibilidad) y 0.25% de Ca; para la pasta de soya 0.64% de P total (40% disponibilidad) y 0.49% de Ca (ingredientes analizados por Evonik, México; los porcentajes de disponibilidad fueron calculados a partir del fósforo fítico analizado en los dos ingredientes).

El alimento se mezcló en una mezcladora industrial tipo pastelera y posteriormente se determinó la cantidad de Ca y P total, algunos resultados fueron diferentes de la concentración de Ca y P disponible (Pd) calculada en la formulación;

por lo que la discusión de los resultados se hace con base a las concentraciones de Ca y Pd del alimento determinadas en el laboratorio. Las dietas fueron isoprotéicas e isoenergéticas (Cuadro 3) y cubrieron los requerimientos sugeridos por el NRC (1994) y Cuca *et al.* (2009) para pollitos en iniciación, excepto en P.

Cuadro 3. Composición y análisis nutrimental de las dietas experimentales para pollos de engorda.

Ingrediente	TRATAMIENTOS									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
	%									
Sorgo	58.64	58.21	57.74	57.31	58.22	57.81	57.38	58.48	58.30	58.14
Pasta de soya	31.90	31.99	32.09	32.18	31.99	32.07	32.16	31.93	31.97	32.00
Aceite de soya	5.35	5.48	5.62	5.75	5.48	5.60	5.73	5.40	5.45	5.50
CaCO ₃ *	2.52	2.21	1.91	1.60	2.11	1.70	1.30	2.10	1.69	1.27
Com-Ortofosfato de Ca**	0.00	0.52	1.05	1.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Nano-CaHPO ₄ ***	0.00	0.00	0.00	0.00	0.61	1.22	1.84	0.00	0.00	0.00
Ana-CaHPO ₄ ****	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	1.00	1.50
L-Lisina	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
DL-Metionina	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
L-Treonina	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
L-Triptofano	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Prem. vit. y min.	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Sal	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Aporte nutrimental calculado										
EM (Mcal kg ⁻¹)	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200
Proteína cruda, %	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00
Lisina, %	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Met + Cis, %	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94
Treonina, %	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
Triptofano, %	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
Ca, %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Pd, %	0.13	0.24	0.35	0.46	0.24	0.35	0.46	0.24	0.35	0.46
PT, %	0.37	0.48	0.59	0.70	0.48	0.59	0.70	0.48	0.59	0.70
PT analizado, %	0.36	0.50	0.60	0.72	0.48	0.59	0.68	0.50	0.59	0.71

* Carbonato de calcio (36% Ca); ** Ortofosfato de calcio de uso comercial (21% P, 21% Ca); *** Fosfato dicálcico en nanopartículas (18% P, 24% Ca); **** Fosfato dicálcico grado analítico (22% P, 30% Ca).

Pd= Fósforo disponible; PT= Fósforo total

2.2.4. Características estudiadas

Ganancia de peso (GP; g ave⁻¹ semana⁻¹): Se obtuvo calculando la diferencia de pesos entre semanas contiguas.

Consumo de alimento (CAL; g ave⁻¹ día⁻¹): Cada semana se pesó el alimento, y el consumo se calculó mediante la diferencia entre alimento ofrecido y alimento

rechazado en cada repetición. Para el cálculo del consumo de alimento, se consideró el alimento total consumido entre el número de pollos por repetición (considerando la mortalidad), teniendo así el consumo por ave por semana. Al dividir el consumo por semana entre siete, se obtuvo el consumo por ave por día. También se calculó el consumo total (21 días).

Conversión alimenticia (CA): Se obtuvo al dividir el consumo de alimento (g) por ave por semana, entre la ganancia de peso (g) por ave por semana.

Mortalidad (M; %): Se obtuvo al registrar los pollos muertos durante todo el experimento.

Digestibilidad aparente del fósforo (Dap; %): Se colectaron las heces de los pollos de cada tratamiento y repetición acumuladas a los 10 días (mitad del experimento) y a los 11 días siguientes (final del experimento), las cuales se analizaron en el laboratorio para determinar la cantidad de fósforo excretado; así mismo, se midió el consumo de P para calcular la Dap por medio de la siguiente fórmula:

$$\%Dap = \frac{P \text{ ingerido } g - P \text{ excretado } (g)}{P \text{ ingerido } (g)} \times 100$$

Donde:

%Dap = Porcentaje de Digestibilidad aparente del P

P ingerido = (Concentración de P en la dieta) (g de alimento consumido)

P excretado = (Concentración de P en las heces) (g de heces)

Fósforo total en pechuga e hígado (PP, PH; %): Se sacrificaron todas las aves al final del experimento (21 días) por dislocación cervical de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres (DOF, 2014). Posteriormente se extrajeron las pechugas e hígados de las

aves sacrificadas para su posterior análisis en laboratorio para obtener el contenido de fósforo total.

Contenido de cenizas en tibias (CT, %): Una vez sacrificados los pollos, se extrajeron los huesos de las tibias izquierdas y se retiró el músculo y tejido conectivo. Las tibias se hirvieron en agua durante tres a cuatro min para remover restos de sangre y tejido conectivo. Se realizó la extracción de grasa de los huesos con éter durante seis horas y se secaron en una estufa de aire forzado a 105°C durante una h. Después, se registró el peso y se incineraron en una mufla durante 24 h a 600°C. Por último se pesaron las cenizas y se hicieron los cálculos pertinentes para determinar el contenido de las mismas.

La preparación de los huesos para análisis de cenizas, se basó en el Manual de Procedimientos de Nutrición de no rumiantes del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Nebraska-Lincoln (1991).

Fósforo total en tibias (PTT; %): Se tomó una muestra de las cenizas obtenidas de las tibias izquierdas y se analizaron en el laboratorio para obtener el contenido de fósforo total.

Los análisis correspondientes para la determinación de fósforo total en heces, pechugas, hígados y tibias, se basaron en los métodos empleados por la AOAC (1990) y se utilizó un espectrofotómetro de luz *Model CARY IE-UV-Visible-Spectrofotometer* Marca *Varian*, Estados Unidos de Norte América.

Mediciones de la tibia (longitud de la tibia <LT>, diámetro proximal <DPT>, diámetro medio <DMT>, diámetro distal <DDT>; mm): Se extrajeron las tibias derechas de las aves sacrificadas y se descarnaron de la misma manera que las izquierdas. Posteriormente, se registró LT, DPT, DMT y DDT de las tibias con un calibrador digital marca Truper.

2.2.5. Análisis estadístico

Se utilizó un modelo estadístico con mediciones repetidas en el tiempo. Para cada característica se realizó un análisis de varianza con el procedimiento MIXED (SAS, Windows 9.4, 2012), así como pruebas de comparación de medias empleando la prueba de Tukey. Los datos de mortalidad, se transformaron con la función arcoseno para su análisis estadístico.

2.2.5.1. Modelo estadístico

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + R_{j(i)} + S_k + (TS)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} = Es la repetición j-ésima del i-ésimo tratamiento, de la k-ésima semana.
 μ = Constante común.
 T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (i= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).
 $R_{j(i)}$ = Efecto de la j-ésima repetición anidada en el i-ésimo tratamiento (j= 1, 2, 3, 4, 5).
 S_k = Efecto de la k-ésima semana (k= 1, 2, 3)
 $(TS)_{ik}$ = Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con la k-ésima semana.
 ε_{ijk} = Error experimental.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Consumo de alimento

Los resultados de CAL de las aves se presentan en el Cuadro A del apéndice. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por efecto de la fuente mineral, la semana y la interacción fuente mineral*semana (Figura 16).

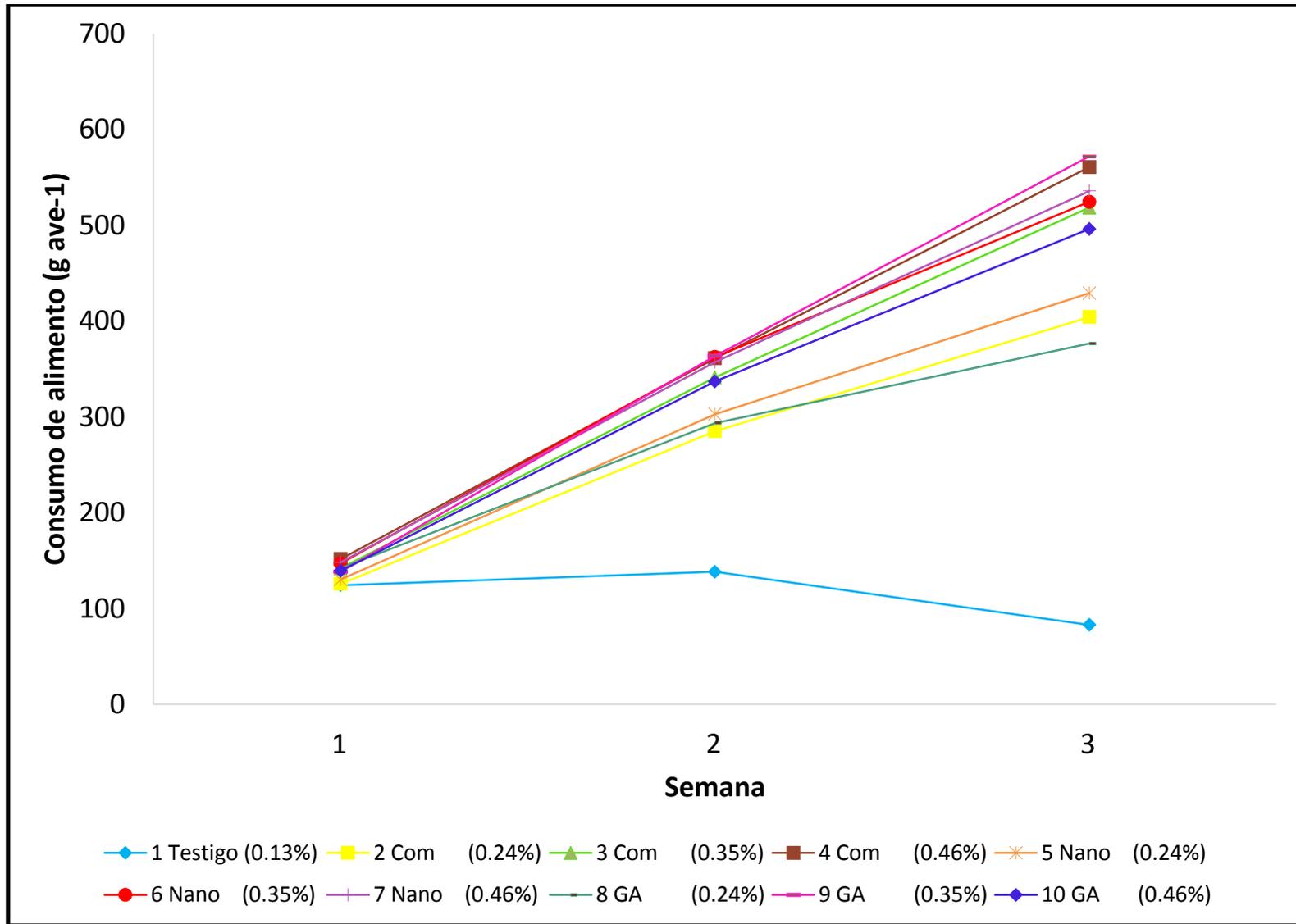


Figura 16. Consumo de alimento en pollos de engorda ($\text{g ave}^{-1} \text{ semana}^{-1}$) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

No se encontraron diferencias entre tratamientos en la primer semana ($P>0.05$). En la segunda y tercera semana el consumo de alimento de los pollos del testigo fue menor ($P\leq 0.05$) con respecto a los demás, probablemente debido a que el Pd consumido no fue suficiente para el mantenimiento corporal y para ganar peso, por lo que éstas se postraban durante más tiempo acercándose menos veces al comedero, en relación a las aves de los demás tratamientos. Los mayores consumos en la tercer semana se presentaron en las aves que consumieron 0.35 y 0.46% de Pd de las tres fuentes minerales.

El CAL total de las aves que cubrieron el requerimiento de fósforo (0.46%) con NPDF fue de 1041.03 g (datos no mostrados) mientras que Vijayakumar y Balakrishnan (2014a), quienes también evaluaron la respuesta de la adición de NPs de fosfato de calcio en el crecimiento de pollos de engorda reportan un consumo de alimento acumulado a los 21 días de edad de 955.30 g en los pollitos que consumieron 0.45% de Pd aportado por NPs de fosfato de calcio, el cuál es menor al que se observó en ésta investigación. El CAL de las aves que ingirieron NPDF fue similar al consumo de las aves alimentadas con fosfato comercial y analítico, independientemente del nivel de Pd en la dieta, aun cuando la ingestión voluntaria del alimento se ve afectada por el tamaño y la textura del alimento (Oviedo-Rondón, 2012); según la FSAI (FSAI, 2008), el consumo de NPs puede mejorar el sabor o palatabilidad de los alimentos; sin embargo, probablemente el bajo porcentaje de inclusión de NPDF como parte de la dieta de los pollos no influyó en una mejora en el sabor o palatabilidad para incrementar los CAL con respecto a los de los pollos que recibieron las otras fuentes de fosfato de calcio con partículas de tamaño normal.

2.3.2. Ganancia de peso

Los resultados de GP se muestran en el Cuadro B del apéndice. Se encontraron diferencias significativas ($P\leq 0.05$) por efecto de la fuente mineral, la semana y la interacción fuente mineral*semana (Figura 17).

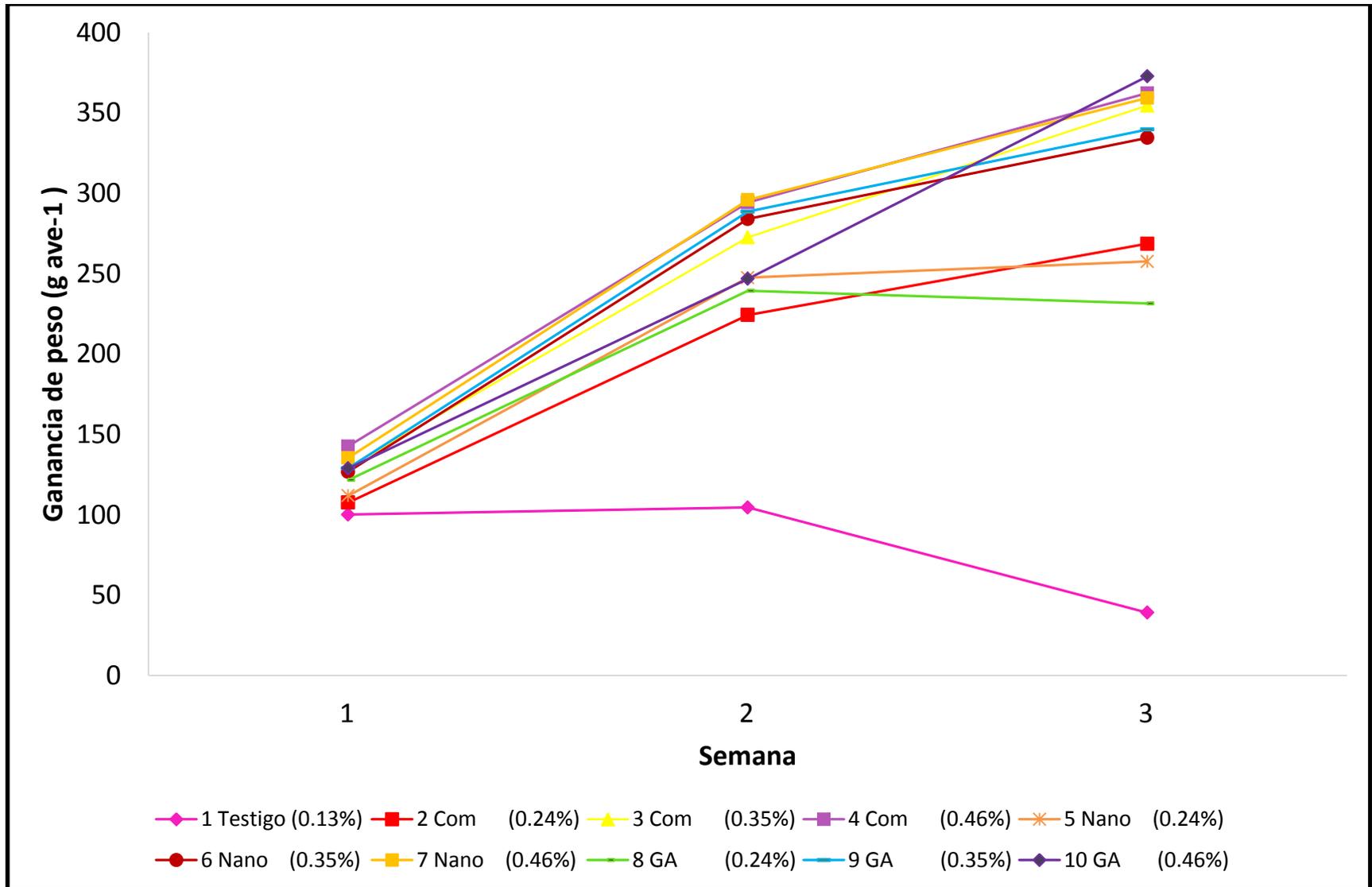


Figura 17. Ganancia de peso en pollos de engorda ($\text{g ave}^{-1} \text{ semana}^{-1}$) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

La GP promedio sin importar la fuente mineral se mejoró en cada semana ($P \leq 0.05$). No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos en la primer semana; sin embargo, los pollos alimentados con todas las fuentes inorgánicas de P ganaron más peso ($P \leq 0.05$) con respecto al tratamiento testigo durante la segunda y tercera semana de edad.

Los resultados de la GP de los pollitos que consumieron las NPFd a 0.35 y 0.46% de Pd, muestran que a cualquiera de éstos dos niveles de P, el ave es capaz de ganar el mismo peso; similarmente sucede con los mismos niveles en las otras fuentes de P, ya que la tasa de ganancia de peso, se ha incrementado debido a la selección genética y a los avances en la nutrición de las aves en la actualidad (Denbow, 2000).

Probablemente los resultados de ganancia de peso de las aves alimentadas con NPFd no sean mayores a los de los pollitos que consumieron fosfato grado analítico con partículas de tamaño convencional, como se esperaba al inicio de la investigación como respuesta en la eficiencia del ave a una mayor disponibilidad de las partículas a un tamaño nanométrico, éste comportamiento puede deberse a la pureza de ambos fosfatos (NPFd, 18% y analítico, 22%) o al polímero utilizado como disgregante en la preparación de las NPs (PVP), el cual pudo degradarse en la molleja (antes del sitio de absorción) a consecuencia de su bajo pH (Denbow, 2000) y provocar la agregación de las NPs, hasta la formación de partículas de mayor tamaño. Sin embargo, se observó que las GP de los pollitos son similares si comparamos NPFd contra el fosfato comercial a un nivel de 0.46% de Pd, aun cuando teóricamente existe una diferencia en la disponibilidad del P para cada tipo de fosfato, esa mejora en la ganancia de peso y que puede ser reflejo de la disponibilidad del P, probablemente se deba al uso de pasta de soya en la dieta como lo indica Scott *et al.* (1982), quienes mencionan que tanto la pasta de soya como otros ingredientes de origen vegetal, contienen un factor que está involucrado en la utilización del P del FD anhidro, ya que la porción fibrosa de éste ingrediente

estimula el proventrículo para producir suficiente ácido clorhídrico para disolver el FD anhidro quien es menos soluble que la forma hidratada.

En los resultados presentados por Vijayakumar y Balakrishnan (2014a), quienes evaluaron dos dietas que contenían 0.45% de Pd, con el uso de dos fuentes minerales de P (FD comercial y NPs de fosfato de calcio), reportan ganancias acumuladas a las tres semanas de 569.90 y 713.10 g, respectivamente. Estas ganancias de peso, son más bajas que las encontradas en esta investigación a esa edad y con esas cantidades de Pd (0.46%), utilizando FD comercial y NPs (799.20 y 790.60 g, respectivamente), ya que los resultados más bajos de ganancia de peso con respecto a los de esta investigación son un reflejo de los menores consumos de alimento reportados por estos autores.

2.3.3. Conversión alimenticia

Los resultados de CA se muestran en el Cuadro C del apéndice. No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) por efecto de la fuente mineral, pero si por efecto de la semana y en la interacción fuente mineral*semana (Figura 18). Se observó que no hubo diferencia significativa ($P>0.05$) entre tratamientos en la primera y segunda semana de edad de los pollitos. Sin embargo, en la tercera semana el tratamiento testigo tuvo la mayor CA la cual fue significativamente diferente ($P\leq 0.05$) y mucho más alta que la de los demás tratamientos. En cuanto a la conversión total, no se encontraron diferencias por efecto de los tratamientos ($P>0.05$).

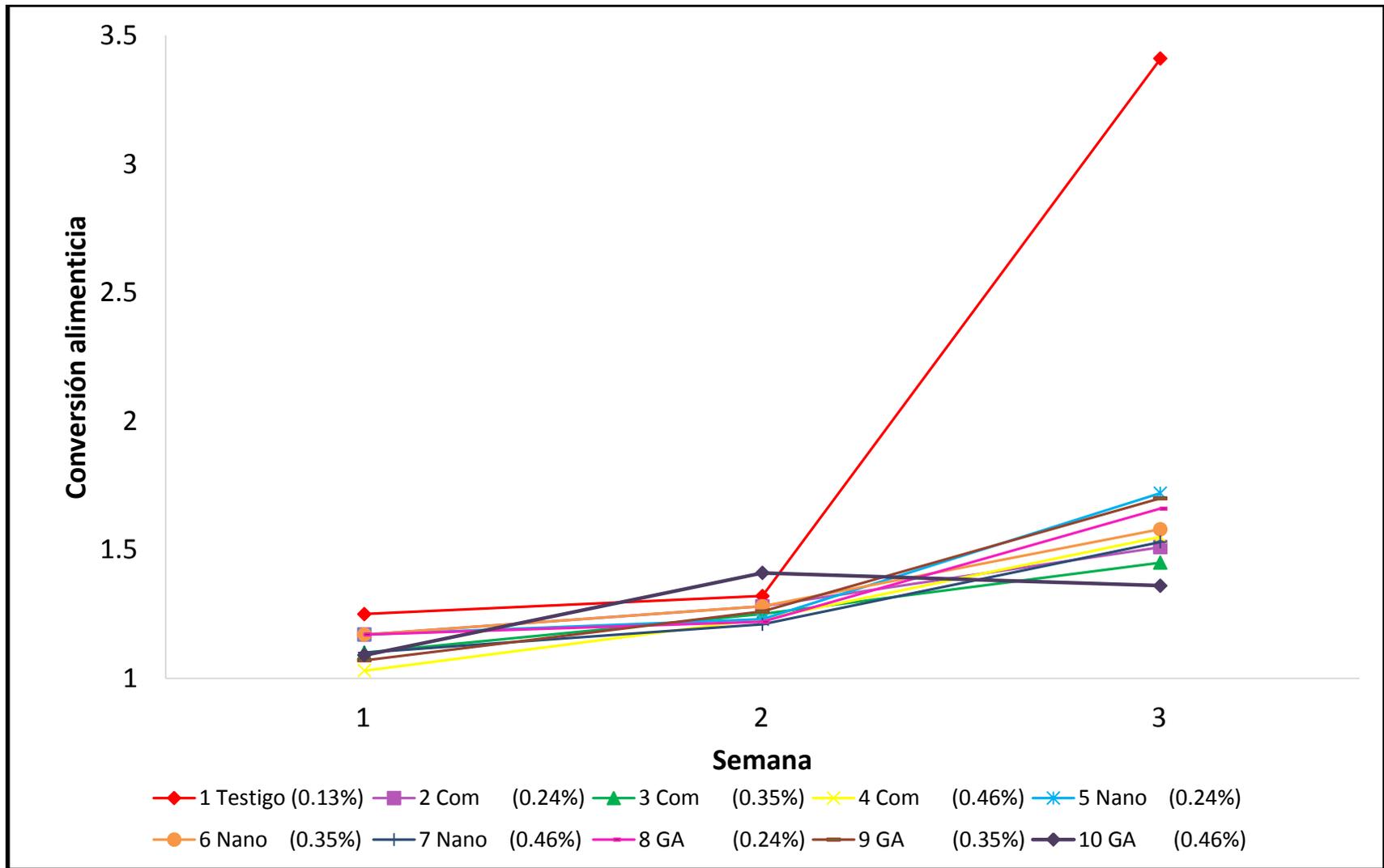


Figura 18. Conversión alimenticia en pollos de engorda en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Vijayakumar y Balakrishnan (2014a), indican una CA de 1.34 con el uso de NPs de fosfato de calcio cubriendo un requerimiento de 0.45% de Pd, valor semejante al que se observó en éste estudio con el tratamiento 7 (1.33). Ambas conversiones son más bajas a las reportadas en investigaciones en las que se usaron fosfatos de calcio comerciales (1.52 con 0.51% de Pd; Beltrán-López *et al.*, 2000) o de grado analítico (1.83 con 0.23% de Pd; Fernandes *et al.*, 1999). En general, las conversiones alimenticias que se observaron en este estudio, son más bajas a las reportadas por estos autores lo cual puede deberse a la eficiencia de las aves en la actualidad para convertir el alimento en carne (Denbow, 2000).

2.3.4. Mortalidad

En la Figura 19, se observan los porcentajes de M de las aves. Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en esta variable, en donde los pollitos del tratamiento 1 (0.13% Pd) presentaron la mayor mortalidad (70%) con respecto al resto de las aves.

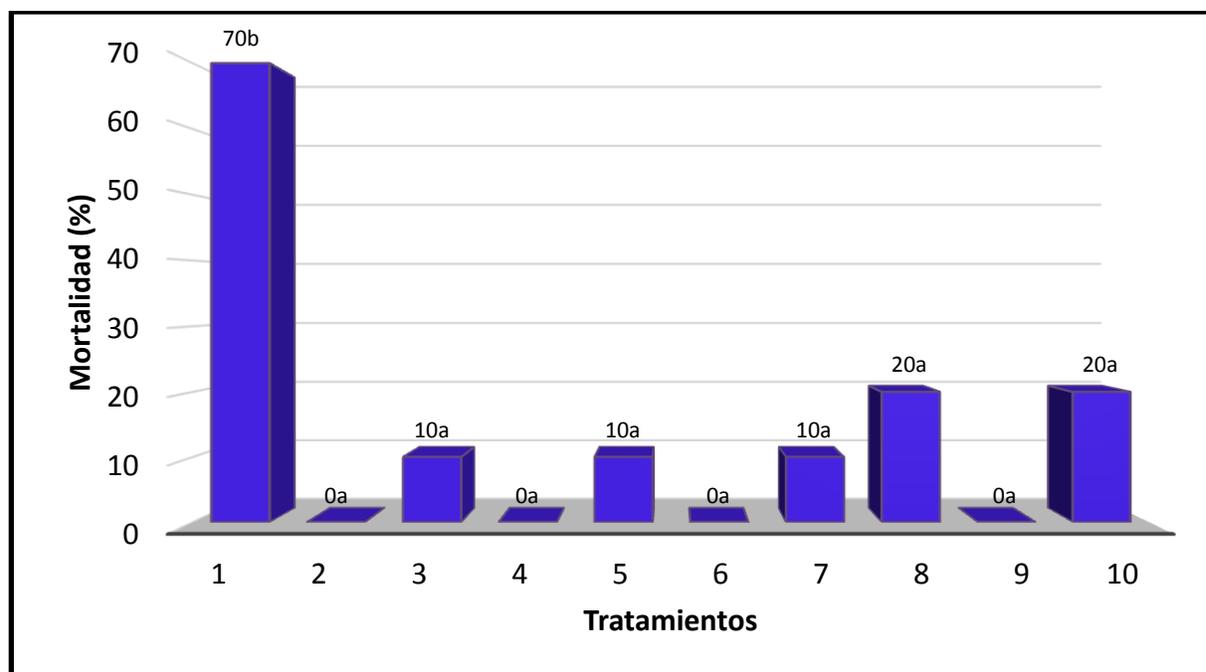


Figura 19. Mortalidad de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible.

^{ab} Indica diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$).

Un porcentaje de M más bajo al de esta investigación en cuanto al tratamiento 1 con 0.13% de Pd reportan Cuca *et al.* (2003), quienes indican 56.8% en aves que consumieron solo 0.12% de Pd sin el uso de alguna fuente de fósforo inorgánica. Probablemente, la alta M en las aves del tratamiento 1 pudo ser provocada por el bajo contenido de P en la dieta, ya que este mineral juega un papel importante en una gran variedad de funciones esenciales en el metabolismo del animal; así mismo, puede provocar una baja mineralización ósea, la cual puede conducir al dolor y reducción en el bienestar del ave (Bradshaw *et al.*, 2013; Caplen *et al.*, 2013), tal situación impide la locomoción y las aves son incapaces de alcanzar el agua y el alimento, resultando en descarte o muerte como lo mencionan Korver y Torres (2014). La máxima mortalidad en las aves que consumieron 0.13% de Pd, se dio entre el día 10 y 16 de edad como lo menciona Scott *et al.* (1982) quienes indican que la pérdida de peso, debilidad y muerte pueden ocurrir a los 10 o 12 días cuando existe una deficiencia severa de P.

2.3.6. Digestibilidad aparente del fósforo

Los resultados de la Dap, se observan en el Cuadro 4. Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por efecto del fósforo total ingerido (FTI), fósforo total excretado (FTE) y fósforo total absorbido (FTA), pero no por la Dap ni en la interacción fuente mineral*Dap ($P > 0.05$).

En el día 10, sólo el PTI de las aves del tratamiento 1 fue diferente con respecto a las demás ($P \leq 0.05$). En la respuesta de PTE y Dap no se observaron diferencias por efecto del tratamiento y el PTA fue similar entre niveles dentro de la misma fuente mineral ($P > 0.05$).

Cuadro 4. Fósforo total ingerido (FTI), excretado (FTE), absorbido (PTA) y digestibilidad aparente del fósforo (Dap) en pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	PT Analizado en dieta	Día 10				Día 21			
			PTI	PTE	PTA	Dap	PTI	PTE	PTA	Dap
1	-	0.36	0.68 ^b	0.31	0.35 ^b	58.43	0.57 ^d	0.19 ^b	0.38 ^c	64.06
2	Comercial	0.50	1.17 ^a	0.41	0.79 ^{ab}	65.46	2.90 ^c	0.87 ^b	2.04 ^b	70.17
3	Comercial	0.60	1.70 ^a	0.70	0.99 ^{ab}	59.79	4.82 ^{ab}	1.44 ^{ab}	3.39 ^a	70.32
4	Comercial	0.72	2.12 ^a	0.77	1.37 ^a	64.01	5.66 ^a	2.36 ^a	3.30 ^a	58.72
5	Nanopartículas	0.48	1.21 ^a	0.49	0.75 ^{ab}	61.39	2.97 ^c	0.91 ^b	2.06 ^b	69.25
6	Nanopartículas	0.59	1.68 ^a	0.54	0.99 ^{ab}	66.93	4.56 ^b	1.75 ^{ab}	2.81 ^{ab}	61.52
7	Nanopartículas	0.68	1.94 ^a	0.73	1.16 ^{ab}	62.31	5.25 ^{ab}	1.90 ^{ab}	3.34 ^a	63.86
8	Analítico	0.50	1.29 ^a	0.55	0.72 ^{ab}	55.65	2.75 ^c	0.81 ^b	1.94 ^b	70.67
9	Analítico	0.59	1.67 ^a	0.64	0.84 ^{ab}	57.35	4.69 ^b	1.78 ^{ab}	2.91 ^{ab}	62.29
10	Analítico	0.71	1.92 ^a	1.00	1.27 ^{ab}	53.68	4.68 ^b	1.39 ^{ab}	3.29 ^a	71.32

Fuente de variación	P
PTI	<0.0001
PTE	<0.0001
PTA	<0.0001
Dap	0.6018
P.mineral* Dap	0.5060

^{a,b,c,d} Indica diferencia entre la misma columna ($P \leq 0.05$).

Para el cálculo de la Dap se consideró el PTI, proveniente de cada fuente y relacionado con el consumo de alimento, y el PTE, calculado a partir del porcentaje de P total en las heces y la cantidad de heces, según materiales y métodos.

En el día 21, los resultados obtenidos indican que no hubo mejora en la PTI, PTE, PTA y Dap en las aves que consumieron partículas nanométricas con respecto a las que consumieron la fuente de grado analítico con partículas de tamaño normal, aun cuando Desai *et al.* (1997) mencionan que al incrementar el área de superficie puede aumentar la absorción; Cabrera *et al.* (2002) mencionan que las partículas finas no son retenidas lo suficiente para ser solubilizadas y Powell *et al.* (2010) mencionan que una vez que las NPs se encuentran en el lumen intestinal, estas pueden aglomerarse o permanecer dispersas, por lo que las NPDF consumidas por las aves de los tratamientos 5, 6 y 7, pudieron aglomerarse debido a la degradación del polímero utilizado (PVP, disgregante) por el bajo pH de la molleja (2.5; Denbow, 2000) la cual se encuentra antes del sitio de absorción en el intestino como se mencionó en los resultados de GP y de ésta manera, las NPDF se absorbieron como las partículas de tamaño normal, por lo que sería importante probar otros polímeros o métodos de encapsulación que cumplan con las características adecuadas para que se lleve a cabo la liberación del nutriente en el lugar adecuado para su absorción.

2.3.6. Fósforo total en pechuga e hígado

En el Cuadro 5 se observan los resultados de porcentaje de PP y PH de los pollos.

Cuadro 5. Fósforo total en pechuga e hígado de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	Pd (%)	Fósforo Total (%)	
			Pechuga	Hígado
1	-	0.13	0.40	0.33
2	Comercial	0.24	0.34	0.51
3	Comercial	0.35	0.35	0.39
4	Comercial	0.46	0.33	0.43
5	Nanopartículas	0.24	0.31	0.49
6	Nanopartículas	0.35	0.38	0.41
7	Nanopartículas	0.46	0.39	0.35
8	Analítico	0.24	0.42	0.47
9	Analítico	0.35	0.30	0.35
10	Analítico	0.46	0.30	0.48

^{a,b} Indica diferencia entre la misma columna ($P \leq 0.05$).

Las NPs son lo suficientemente pequeñas para penetrar a través de las células, ya que pueden pasar a través de las membranas biológicas y afectar la fisiología celular de tejidos y órganos importantes (Brooking *et al.*, 2001; Borm and Kreylling, 2004); por lo tanto, se puede considerar que el uso de NPs en la alimentación del ganado, puede tener un efecto toxicológico por acumulación en musculo u otros tejidos; sin embargo, el análisis de PP y PH que se realizó en esta investigación, indica que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para ninguno de los dos tejidos en esta variable por efecto de la disminución en el tamaño de partícula, en comparación con otras fuentes minerales. Aunado a esto, el Centro de información nutricional de carne de pollo (CINCAP, 2010), reporta un porcentaje menor de este mineral en carne de pollo (0.15%) con respecto a los obtenidos en la pechuga de los pollos que consumieron NPFD (0.35, 0.41 y 0.49% de P) al igual que Menchú y Méndez (2012) quienes indican que la carne de pollo e hígado contienen 0.17% y 0.30% de P, respectivamente.

2.3.7. Contenido de cenizas en tibias

Los resultados del CT en tibias se muestran en el Cuadro 6, e indican que las aves que consumieron las dietas de los tratamientos con 0.35 y 0.46% de Pd de las tres fuentes minerales, presentaron mayor porcentaje con respecto a los demás tratamientos ($P \leq 0.05$).

Cuadro 6. Contenido de cenizas en tibias de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	Pd (%)	Cenizas (%)
1	-	0.13	34.27 ^c
2	Comercial	0.24	44.03 ^b
3	Comercial	0.35	50.06 ^a
4	Comercial	0.46	51.98 ^a
5	Nanopartículas	0.24	45.95 ^b
6	Nanopartículas	0.35	49.99 ^a
7	Nanopartículas	0.46	50.11 ^a
8	Analítico	0.24	44.36 ^b
9	Analítico	0.35	50.60 ^a
10	Analítico	0.46	53.07 ^a

^{a,b,c} Indica diferencia entre la misma columna ($P \leq 0.05$).

Las tibias de las aves alimentadas con NPF a diferentes niveles, tuvieron el mismo CT que el resto de las aves al compararlas con las que consumieron el mismo nivel de Pd utilizando fosfato comercial y grado analítico como fuente de P ($P>0.05$); de igual manera, Vijayakumar y Balakrishnan (2014b) reportan que la adición de NPs de fosfato de calcio a diferentes niveles, no afecta el contenido total de cenizas en tibias de pollos.

El CT en las tibias de los pollos disminuyó, conforme el porcentaje de Pd fue menor en la dieta, ya que según McDowell (2003) el principal síntoma clínico de la deficiencia de P en aves en crecimiento, es la reducción en la mineralización del hueso. Así mismo, Korver y Torres (2014) comentan que la mineralización del hueso ocurre por la deposición de los minerales (en éste caso P) obtenidos en la dieta. Sin embargo, McDowell (2003) indica que los niveles de P que resultan en una máxima ganancia de peso no son necesariamente adecuados para máxima mineralización del hueso.

2.3.8. Fósforo total en tibias

Los porcentajes de PTT en tibias se observan en el Cuadro 7. No se encontraron diferencias significativas ($P\leq 0.05$) por efecto de la fuente mineral utilizada en la dieta a los tres niveles probados (0.24, 0.35 y 0.46% de Pd).

Cuadro 7. Fósforo total en tibias de pollos de engorda (%) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	Pd (%)	Fósforo Total (%)
1	-	0.13	14.97 ^b
2	Comercial	0.24	17.43 ^{ab}
3	Comercial	0.35	19.48 ^a
4	Comercial	0.46	19.48 ^a
5	Nanopartículas	0.24	17.20 ^{ab}
6	Nanopartículas	0.35	17.69 ^{ab}
7	Nanopartículas	0.46	19.07 ^a
8	Analítico	0.24	17.24 ^{ab}
9	Analítico	0.35	18.35 ^a
10	Analítico	0.46	17.31 ^{ab}

^{a,b} Indica diferencia entre la misma columna ($P\leq 0.05$).

Debido a las características similares en cuanto a tamaño entre los componentes inorgánicos de tejidos calcificados, los fosfatos de calcio a tamaño nanométrico tienden a tener mejor bioactividad comparada con materiales convencionales (Stupp y Ciegler, 1992); sin embargo, las tibias de los pollos que consumieron NPDF, no presentaron mayor concentración de P con respecto al resto de las aves, probablemente debido a la composición química de éstas, ya que según Chen *et al.* (2012) la actividad de un fosfato de calcio en el organismo está determinada por su composición; Dorozhkin (2010) considera que los fosfatos de calcio con una relación Ca:P menor a uno y mayor que dos, no son adecuados para implantarse en el cuerpo entre los que se encuentran el fosfato monocálcico monohidratado y anhidro, fosfato dicálcico dihidratado y anhidro, entre otros.

2.3.9. Mediciones de la tibia

En el Cuadro 8 se muestran los resultados de las mediciones de la tibia analizadas en esta investigación. Se observa que el tratamiento 1 presentó menor tamaño de LT, DPT, DMT y DDT, con respecto al resto de los tratamientos ($P \leq 0.05$). Así mismo, las LT de las aves que consumieron 0.35 y 0.46% de Pd fueron más altas ($P \leq 0.05$) con respecto a las que consumieron 0.24 y 0.13% de Pd, ya que a medida que éste mineral se incrementa en la ración de los pollos, se da un mayor crecimiento del tejido óseo como lo mencionan Korver y Torres (2014). Según Yan *et al.* (2005), las aves que tienen una restricción de P en su dieta, pueden limitar su habilidad para compensar el tamaño del hueso.

Cuadro 8. Longitud (LT), diámetro proximal (DPT), diámetro medio (DMT) y diámetro distal (DDT) de tibias de pollos de engorda (mm) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	Pd (%)	Mediciones (mm)			
			LT	DPT	DMT	DDT
	-	0.13	52.74 ^c	11.94 ^c	4.27 ^c	10.82 ^c
2	Comercial	0.24	61.96 ^b	16.19 ^b	5.55 ^b	13.96 ^b
3	Comercial	0.35	69.32 ^a	17.60 ^{ab}	6.35 ^{ab}	15.20 ^a
4	Comercial	0.46	69.87 ^a	18.26 ^{ab}	6.19 ^{ab}	15.17 ^a
5	Nanopartículas	0.24	62.81 ^b	16.47 ^{ab}	5.60 ^b	14.25 ^{ab}
6	Nanopartículas	0.35	69.27 ^a	18.46 ^a	6.18 ^{ab}	15.40 ^a
7	Nanopartículas	0.46	69.41 ^a	18.10 ^{ab}	6.44 ^a	14.90 ^{ab}
8	Analítico	0.24	61.92 ^b	16.19 ^b	5.69 ^{ab}	14.35 ^{ab}
9	Analítico	0.35	69.45 ^a	17.87 ^{ab}	6.26 ^{ab}	15.46 ^a
10	Analítico	0.46	68.49 ^a	17.67 ^{ab}	5.99 ^{ab}	14.67 ^{ab}

^{a,b,c} Indica diferencia entre la misma columna (P≤0.05).

El uso de nanopartículas en la dieta, no mejoró la LT, DPT, DMT y DDT con respecto a los demás tratamientos quizás por el tipo de fosfato de calcio que se utilizó en esta investigación y que según Dorozhkin (2010), se encuentra dentro de los fosfatos menos adecuados para fijarse a algunos tejidos del cuerpo, como a lo largo de la tibia en éste caso.

2.4. Conclusiones

El uso de NPFDF en pollos de engorda en iniciación no mejoraron la respuesta productiva y fisiológica con respecto a las demás fuentes de fósforo inorgánico utilizadas, por lo que requieren estudiarse más a fondo, tomando en cuenta el aspecto fisiológico en cuanto a su paso por la membrana intestinal, para así crear las condiciones adecuadas en su diseño y que estas puedan cubrir las expectativas de su utilización en la nutrición de aves.

2.5. Literatura citada

AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 15th Edition. Arlington, Virginia. USA.

Beltrán-López, J., Cuca-García M., González-Alcorta M. J. y Pró-Martínez A. 2000. Estimación del nivel de fósforo con y sin adición de fitasa en pollos de

- engorda en iniciación. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 8(1):1-7.
- Bradshaw, R. H., Kirken R. D. and Broom D. M. 2002. A review of the aetiology and pathology of leg weakness in broilers in relation to welfare. Avian and Poultry Biology Reviews. 13:45-103.
- Brooking, J., Davis S. S. and Illum L. 2001. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. Journal of drug targeting. 9(4):267-279.
- Borm, P. J. and Kreyling W. 2004. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles potential implications for drug delivery. Journal of nanoscience and nanotechnology. 4(5):521-531.
- Cabrera, M. C., Del Puerto M., Ramos A., Saadoun A. y Marchesoni A. 2002. Evaluación de la biodisponibilidad del fósforo orgánico e inorgánico a través de la solubilidad *in vitro* y utilización *in vivo*. Agrociencia. 6(1):69-78.
- Caplen, G., Baker L., Hothershall B., McKeegan D. E. F., Sandilands V., Sparks N. H. C., Waterman-Pearson A. E. and Murrell J. C. 2013. Thermal nociception as measure of non-steroidal anti-inflammatory drug effectiveness in broiler chickens with articular pain. The Veterinary Journal. 198:616-619.
- Chen, F., Zhu Y., Wu J., Huang P and Cui D. 2012. Nanostructured calcium phosphates: Preparation and their applications in biomedicine. Nano Biomedicine and Engineering. 4(1):41-49.
- CINCAP. 2010. Centro de Información Nutricional de la Carne de Pollo. En: http://www.cincap.com.ar/informacion_nutricional.php. Fecha de consulta: 9 de mayo de 2015.
- Cuca, G. M., Ávila G. E. y Pro M. A. 2009. Alimentación de las aves. Universidad Autónoma Chapingo. 276 pp.
- Cuca, G. M., De la Rosa C. G. R., Pró M. A. y Baeza L. J. 2003. Disponibilidad del fósforo de la pasta de soya y sorgo-gluten de maíz, adicionadas con fitasa en pollos de engorda en iniciación. Técnica Pecuaria de México. 41(3):295-306.
- Denbow, D. M. 2002. In Gastrointestinal Anatomy and Physiology. In Sturkie's Avian Physiology. Fifth Edition
- DOF. 2014. Diario Oficial de la Federación. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
- Dorozhkin, S. V. 2010. Bioceramics of calcium orthophosphates. Biomaterials, 31(7):1465-1485.

- Fernandes, J. I. M., Lima F. R. Mendonça C. X. Jr., Mabe I., Albuquerque R. and Leal P. M. 1999. Relative bioavailability of phosphorus in feed and agricultural phosphates for poultry. *Poultry Science*. 78:1729-1736.
- FSAI. 2008. Food Safety Authority of Ireland. The relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries. Dublin I: Food Safety Authority of Ireland. 82 pp.
- Hernández, G., Godoy S. y Chicco C. F. 2006. Biodisponibilidad del fósforo de cereales en aves. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 16(2):149-154.
- Korver, D. R. y Torres C. A. 2014. Mineralización y desarrollo del hueso: Desempeño del pollo de engorde. *Memorias Seminario Internacional Manejo y Sistemas Operativos en Pollos de engorde-AMEVEA*. Bogotá, Colombia.
- Lesson, S. and Summers J. D. 2005. Commercial poultry production. University Books, Guelph, Ontario.
- McDowell, L. R. 2003. Minerals in animal and human nutrition. Second Edition. Elsevier Science B. V. Amsterdam, The Netherlands.
- Menchú, M. T. y Méndez H. 2012. Tabla de Composición de alimentos de Centroamérica. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 2a. Edición. 3a. reimpresión.
- NRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. Ninth revised edition. National Research Council. National Academy Press, Washington, D. C. USA. 155 p.
- Oviedo-Rondon, E. O. 2012. Factores para mejorar la eficiencia nutricional en pollos de engorda. 5ª Reunión de la Asociación de Especialistas en Ciencias Avícolas del Centro de México. Querétaro, Méx.
- Powell, J. J., Faria N., Thomas-McKay E. and Pele L. C. 2010. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *Journal of Autoimmunity*. 34:226-233.
- Rodehutschord, M. 2011. Avances en la valoración del fósforo en aves. XVII Curso de especialización FEDNA. 237-246. XXVII Curso de especialización FEDNA. Madrid. 237-246.
- SAS. 2012. Statistical Analysis System. The SAS system for Windows 9.4. U.S.A.
- Scott, M. L., Nesheim M. C., and Young R. J. 1982. Nutrition of the chicken. M. L. Scott and Associates. Ithaca, New York. 555 p.

- Stupp, S. I. and Ciegler G. W. 1992. Organoapatites: materials for artificial bone. I. Synthesis and microstructure. *Journal of biomedical materials research*. 26(2):169-183.
- Underwood, E. J. 1981. *Los minerales en la nutrición del ganado*. 2ª Edición. Acribia. 210p.
- University of Nebraska-Lincoln. 1991. *Manual of Procedures. Nonruminant Nutrition Research*. Department of Animal Science.
- Vijayakumar, M. P. and Balakrishnan V. 2014a. Effect of calcium phosphate nanoparticles supplementation on growth performance of broiler chicken. *Indian Journal of Science and Technology*. 7(8):1149-1154.
- Vijayakumar, M. P. and Balakrishnan V. 2014b. Evaluating the bioavailability of calcium phosphate nanoparticles as mineral supplement in broiler chicken. *Indian Journal of Science and Techology*. 7(10):1475-1480.
- Yan, F., Angel R., Ashwell C., Mitchell A. and Christman M. Evaluation of the broiler's ability to adapt to an early moderate deficiency of phosphorus and calcium. 2005. *Poultry Science*. 84:1232-1241.

CONCLUSIÓN GENERAL Y RECOMENDACIONES

En el proceso de síntesis de nanopartículas de fosfato dicálcico por medio del método de coprecipitación, se generaron partículas de tamaño nanométrico en el orden de 20 a 80 nm de forma prismática, éstas se compararon con fosfato dicálcico comercial y fosfato dicálcico grado analítico y no se encontraron diferencias en las variables productivas y fisiológicas, por efecto de la fuente mineral suministrada en la dieta de las aves.

No existe suficiente información publicada con respecto a la evaluación de éste tipo de sistemas a pequeña escala, se piensa que es poco probable que la nanotecnología sea utilizada de forma significativa en el desarrollo de ingredientes de alimentos para animales, debido al costo que implica. Sin embargo, es importante el desarrollo de más estudios sobre ésta nueva tecnología, ya que el periodo de iniciación no es suficiente para observar el fenómeno productivo a lo largo de todo el ciclo de engorda. Se sugiere la exploración de otras formulaciones que permitan incrementar la biodisponibilidad de las NPFD, tales como el uso de otras fuentes de P, mismas que tal vez puedan mejorar la absorción y asimilación del nanonutriente.

APÉNDICE

Cuadro A. Consumo de alimento en pollos de engorda (g ave⁻¹ semana⁻¹) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	Pd (%)	Semana			Total
			1	2	3	
1	-	0.13	124.40	138.46 ^b	82.96 ^d	345.82 ^c
2	Comercial	0.24	125.80	285.10 ^a	404.20 ^{bc}	815.10 ^b
3	Comercial	0.35	142.00	341.20 ^a	518.49 ^a	1001.69 ^{ab}
4	Comercial	0.46	151.60	361.10 ^a	560.70 ^a	1073.40 ^a
5	Nanopartículas	0.24	130.30	302.90 ^a	429.14 ^{bc}	862.34 ^b
6	Nanopartículas	0.35	147.30	362.50 ^a	524.50 ^a	1034.30 ^{ab}
7	Nanopartículas	0.46	148.20	357.13 ^a	535.70 ^a	1041.03 ^{ab}
8	Analítico	0.24	142.10	293.61 ^a	376.60 ^c	812.31 ^b
9	Analítico	0.35	138.50	363.60 ^a	571.90 ^a	1074.00 ^a
10	Analítico	0.46	139.40	337.00 ^a	496.09 ^{ab}	972.49 ^{ab}
x ± EE			138.96 ± 6.26^z	314.26 ± 6.26^y	450.03 ± 6.26^x	
Fuente de variación			P			
F. mineral			<0.0001			
Semana			<0.0001			
F. mineral*Semana			<0.0001			

Semana 1= 7 días de edad. Semana 2= 14 días de edad. Semana 3= 21 días de edad. Total= 0 a 21 días de edad.

EE= Error estándar.

^{a,b,c,d} Indica diferencia entre la misma columna (P≤0.05); ^{x,y,z} Indica diferencia entre la misma hilera (P≤0.05).

Cuadro B. Ganancia de peso en pollos de engorda (g ave⁻¹ semana⁻¹) en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	Pd (%)	Semana			TOTAL
			1	2	3	
1	-	0.13	100.10	104.50 ^b	39.10 ^c	243.70 ^c
2	Comercial	0.24	107.60	224.30 ^a	268.60 ^b	600.50 ^b
3	Comercial	0.35	129.60	272.60 ^a	354.60 ^a	756.80 ^a
4	Comercial	0.46	142.60	294.30 ^a	362.30 ^a	799.20 ^a
5	Nanopartículas	0.24	111.80	247.50 ^a	257.60 ^b	616.90 ^b
6	Nanopartículas	0.35	126.70	284.00 ^a	334.50 ^{ab}	745.20 ^{ab}
7	Nanopartículas	0.46	135.40	295.90 ^a	359.30 ^a	790.60 ^a
8	Analítico	0.24	121.60	239.30 ^a	231.40 ^b	592.30 ^b
9	Analítico	0.35	128.90	288.60 ^a	339.70 ^{ab}	757.20 ^a
10	Analítico	0.46	128.80	246.80 ^a	372.80 ^a	748.40 ^{ab}
x ± EE			123.31 ± 4.84^z	249.78 ± 4.84^y	293.90 ± 5.19^x	
Fuente de variación			P			
F. mineral			<0.0001			
Semana			<0.0001			
F. mineral*Semana			<0.0001			

Semana 1= 7 días de edad. Semana 2= 14 días de edad. Semana 3= 21 días de edad. Total= 0 a 21 días de edad.

EE= Error estándar.

^{a,b,c} Indica diferencia entre la misma columna (P≤0.05); ^{x,y,z} Indica diferencia entre la misma hilera (P≤0.05).

Cuadro C. Conversión alimenticia en pollos de engorda en respuesta a diferentes concentraciones y fuentes de fósforo disponible (Pd).

Tratamiento	Fuente mineral	Pd (%)	Semana			TOTAL
			1	2	3	
1	-	0.13	1.25	1.32	3.41 ^b	1.55 ± 0.05 ^a
2	Comercial	0.24	1.17	1.28	1.51 ^a	1.35 ± 0.05 ^a
3	Comercial	0.35	1.10	1.25	1.45 ^a	1.31 ± 0.05 ^a
4	Comercial	0.46	1.03	1.23	1.55 ^a	1.34 ± 0.05 ^a
5	Nanopartículas	0.24	1.17	1.23	1.72 ^a	1.40 ± 0.05 ^a
6	Nanopartículas	0.35	1.17	1.28	1.58 ^a	1.39 ± 0.05 ^a
7	Nanopartículas	0.46	1.10	1.21	1.53 ^a	1.33 ± 0.05 ^a
8	Analítico	0.24	1.17	1.22	1.66 ^a	1.37 ± 0.05 ^a
9	Analítico	0.35	1.07	1.26	1.70 ^a	1.42 ± 0.05 ^a
10	Analítico	0.46	1.09	1.41	1.36 ^a	1.30 ± 0.05 ^a
<i>x</i> ± EE			1.13 ± 0.04 ^y	1.27 ± 0.04 ^{yz}	1.75 ± 0.04 ^z	
Fuente de variación			P			
F. mineral			0.0905			
Semana			<0.0001			
F. mineral*Semana			<0.0001			

Semana 1= 7 días de edad. Semana 2= 14 días de edad. Semana 3= 21 días de edad.

EE= Error estándar.

^{a,b} Indica diferencia entre la misma columna (P≤0.05); ^{y,z} Indica diferencia entre la misma hilera (P≤0.05).