UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del efecto antioxidante del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* kunth sobre la estabilidad de lípidos y proteínas de la yema de huevo

Erika Natalia Durán Cruz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2015

Evaluación del efecto antioxidante del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* kunth sobre la estabilidad de lípidos y proteínas de la yema de huevo

Erika Natalia Durán Cruz

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Química

Directora: Yadi Adriana Umaña Pérez
Química MSc Doctor en Ciencias

Codirectora: Olga Lucía Mayorga Mogollón
Química MSc Bioquímica, PhD Ciencias Rurales

Línea de Investigación:
Bioquímica de la Nutrición
Grupo de Investigación en Hormonas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2015

A Dios que me ha dado fortaleza para hacer todo esto posible…

“El éxito no es un accidente, es trabajo duro, perseverancia, aprendizaje, estudio, sacrificio y lo más importante de todo, amor por lo que estás haciendo o aprendiendo a hacer”.

Pelé

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Claudia Ariza Ph.D y directora del Grupo de Investigación en Nutrición Animal – Corpoica por haberme permitido trabajar en este proyecto tan enriquecedor y del cual aprendí muchas cosas, además de su patrocinio y asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

A la División de Investigación Bogotá (DIB) por el apoyo económico otorgado (Proyecto: 23591); a Colciencias por permitirme ser Joven Investigadora a través del proyecto código HERMES: 21201 y a la Universidad Nacional de Colombia por haber reconocido mi esfuerzo durante 3 semestres consecutivos con la beca de exención de derechos académicos.

A la profesora Myriam Sánchez de Gómez, líder del Grupo de Investigación en Hormonas por permitir mi formación de Maestría en el grupo y por su apoyo académico.

A la profesora Adriana Umaña Pérez, por su asesoría científica, su amistad y apoyo incondicional de principio a fin como directora de este trabajo.

A la Dra. Olga Lucia Mayorga Ph.D del Grupo de Investigación en Nutrición Animal por toda su asesoría y consejo, tanto a nivel académico como personal.

A los integrantes del Grupo de Investigación en Nutrición Animal, por su amistad durante estos años, por su apoyo y sus orientaciones desinteresadas.

A Ronnal y Jaime Ortiz Cuadros por su ayuda con el análisis estadístico y otras labores del bioensayo.

A todos los integrantes del Grupo de Investigación en Hormonas, por su cariño y apoyo, por el tiempo compartido, por sus valiosas sugerencias durante los espacios de discusión, ya que, me ayudaron a crecer académica y profesionalmente.

A mi familia por contribuir de una forma u otra con su respaldo en todos los proyectos que he emprendido, por soportar con paciencia mi ausencia en algunos momentos y por su amor infinito.

A Simón mi amigo por hacerme compañía permanentemente durante la elaboración de este escrito, ya que, con su ternura y gracia me refresca la mente para seguir adelante.

Resumen

El efecto antioxidante del aceite esencial de orégano (AEO) *Lippia origanoides* Kunth sobre componentes de la yema de huevo susceptibles a oxidación por periodos largos de almacenamiento ha sido poco estudiado. El objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta de la adición de un producto micronizado de aceite esencial de orégano *L. origanoides* K. (MAEO) sobre la estabilidad en el tiempo de los lípidos y proteínas de la yema de huevo. El estudio se realiza en gallinas ponedoras alimentadas con dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) provenientes de aceite de pescado y con aceite de palma. En las dietas enriquecidas con AGPI se evalúa la inclusión de tres niveles de MAEO y vitamina E libre. Los tratamientos son: dieta + aceite de palma (T1); dieta + AGPI (T2); dieta + AGPI + T3 (T3); dieta + AGPI + 250 ppm de MAEO (T4); dieta + AGPI + 500 ppm de MAEO (T5) y dieta + AGPI + 750 ppm de MAEO (T6); analizados bajo un diseño completo al azar con comparación de medias por contrastes ortogonales. La presencia de AEO en la yema se determina por la cuantificación de timol. La estabilidad oxidativa se evalúa en huevos frescos y después de un periodo de almacenamiento de 60 días, mediante la determinación de la peroxidación lipídica medida a través de la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el efecto sobre el perfil de ácidos grasos se cuantifica por cromatografía de gases (CG). La respuesta antioxidante a nivel celular se mide por la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) extraídas de la yema. El cambio en el perfil de proteínas se observa por electroforesis bidimensional mediante el análisis comparativo de sus imágenes (Melanie 7.0). Los resultados indican presencia de timol en la yema en el rango entre 753 a 1068 ng/g yema seca y perdidas por almacenamiento entre 14.6% a 20.7% de acuerdo al nivel de inclusión. No se presentaron diferencias significativas por efecto de la adición en la dieta de MAEO o Vitamina E sobre lípidos y proteínas de la yema, pero si efectos significativos por la suplementación de AGPI en la dieta; con reducción significativa (P=0.018) en el contenido de AGS de 4.5%. La expresión diferencial de

proteínas no presento cambios por la suplementación en la dieta de AGPI, ni la adicción de MAEO o Vitamina E. Los mayores efectos significativos se observaron por el almacenamiento de los huevos; sobre la peroxidación lipídica se encontraron efectos significativos (P<0.001), siendo 97,3% más alto para T2 y controlada en un 49% por el T3 y seguido por el T4 en 40%. En general, los resultados no mostraron efectos significativos en el perfil lipídico con excepción del T5 que disminuyó significativamente en 16% en los AGS (P=0.0147) por efecto de T5 y aumentó 22.5% en los AGPI (P=0.0063). Los AGM se incrementaron significativamente (P<0,05) en los tratamientos con MAEO T2 (3.2%), T5 (2.3%), T4 (1.3%), y T6 (0.8%). La actividad SOD fue afectada significativamente (P<0,05) disminuyendo en T2 (75.7%), T6 (65.9%), T1 (58.7%), T4 (56.7%) y T3 (55.1%). La actividad CAT se incrementó significativamente (P<0,05) para T1 (1119%), T6 (185%) y T2 (147%) y disminuyó en T4 (54.7%). La actividad GSH-Px se incrementó significativamente (P<0,05) para T2 (113%), T6 (37%), T4 (22%) y disminuyó en T5 (25%). A nivel de expresión de proteínas todos los tratamientos mostraron cambios en el perfil (P<0.01), con incremento en el número de puntos de proteína únicos, siendo en su orden los de mayores diferencias T1 (49.4%), T4 (38.5%), T2 (38.1%), T5 (18.6%), T6 (18.6%) y T3 (14.8%). La suplementación con T3 y T4 redujo la peroxidación lipídica en la yema de los huevos enriquecidos AGPI durante el almacenamiento. La suplementación con sustancias antioxidantes retardó la perdida de actividad de la SOD durante el almacenamiento, con respecto a los tratamientos no suplementados. La suplementación con MAEO incrementó la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa en la yema. La inclusión de MAEO promovió a diferentes niveles la actividad antioxidante intrínseca en la yema y consecuentemente la protegió de la oxidación de lípidos y proteínas durante el almacenamiento del huevo.

Palabras clave: Huevo, timol, enzimas antioxidantes, peroxidación lipídica, proteómica diferencial, perfil de ácidos grasos, gallinas ponedoras.

Abstract

The antioxidant effect of the oregano essential oil *Lippia origanoides* Kunth (OEO) on egg yolk components susceptible to oxidation for long periods of storage has been little studied. The aim of this study was to evaluate the response of adding a micronized product of oregano essential oil (MOEO) on the stability of lipids and proteins of the egg yolk during storage. The study was conducted in laying hens fed polyunsaturated fatty acid enriched diets (PUFAs) from fish oil and palm oil. In the PUFA enriched diets including three levels of MOEO and free vitamin E is evaluated. The treatments are: diet + palm oil (T1); + PUFA diet (T2); diet + PUFA + T3 (T3); PUFA + diet + 250 ppm MOEO (T4); PUFA + diet + 500 ppm MOEO (T5) and PUFA + diet + 750 ppm MOEO (T6); analyzed under a completely randomized design with comparison of means by orthogonal contrasts. The presence of OEO in yolk is determined by quantifying thymol. Oxidative stability is evaluated in fresh eggs and after a storage period of 60 days, by determining lipid peroxidation as measured by the test of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) and the effect on the fatty acid profile It were quantified by gas chromatography (GC). Antioxidant response at the cellular level is measured by the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) extracted from the yolk. The change in the protein profile observed by two-dimensional electrophoresis through comparative analysis of their images (Melanie 7.0). The results indicate the presence of thymol in the bud in the range from 753 to 1068 ng/g dry yolk and storage losses between 14.6% to 20.7% according to inclusion level. No significant differences in effect of adding MOEO diet or vitamin E on lipid and yolk proteins were presented, but if significant effects PUFA supplementation in the diet; with significant reduction ($P = 0.018$) in the SAFA content 4.5%. The differential expression of proteins present changes in dietary supplementation of PUFAs, or addiction MOEO or Vitamin E. The greatest significant effects were observed for egg storage; on lipid peroxidation significant ($P <0.001$) were found to be 97.3% higher for T2 and 49% controlled by the T3 and T4 followed by 40%. Overall, the results showed no significant

effects on the lipid profile than the T5 which decreased significantly by 16% in the SFA (P=0.0147) due to increased 22.5% T5 and in PUFA (P = 0.0063). The MFA were significantly increased (P <0.05) in treatments with MAEO T2 (3.2%), T5 (2.3%), T4 (1.3%) and T6 (0.8%). SOD activity was affected significantly (P <0.05) decrease in T2 (75.7%), T6 (65.9%), T1 (58.7%), T4 (56.7%) and T3 (55.1%). CAT activity was significantly increased (P <0.05) for T1 (1119%), T6 (185%) and T2 (147%) and decreased T4 (54.7%). GSH-Px activity was significantly increased (P <0.05) for T2 (113%), T6 (37%), T4 (22%) and decreased in T5 (25%). At the level of protein expression all treatments showed changes in the profile (P <0.01), an increase in the number of protein spots unique, being in the order the greater differences T1 (49.4%), T4 (38.5%), T2 (38.1%), T5 (18.6%), T6 (18.6%) and T3 (14.8%). Supplementation with T3 and T4 decreased lipid peroxidation in the egg yolk enriched PUFA during storage. Supplementation with antioxidants delayed loss SOD activity during storage, compared to unsupplemented treatments. MOEO supplementation increased the activity of enzymes catalase and glutathione peroxidase in the bud. The inclusion of different levels MOEO promoted intrinsic antioxidant activity in the yolk and consequently protected from oxidation of lipids and proteins during egg storage.

Keywords: Egg, thymol, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, differential proteomics, fatty acid profile, layers.

Contenido

Resumen ..... **IX**

Abstract ..... **XII**

Contenido ..... **XV**

Lista de figuras ..... **XVII**

Lista de tablas ..... **XXI**

Lista de símbolos y abreviaturas ..... **XXIII**

Introducción **1**

1. Estado actual del tema **4**

1.2 Composición de los huevos de gallina 4
1.2.1 Yema de huevo 5
1.3 Enriquecimiento de huevos con ácidos grasos poliinsaturados 8
1.4 Estrés oxidativo y antioxidantes 10
1.4.1 Sistemas de defensa antioxidante 14
1.4.2 Antioxidantes suplementados en la dieta 18
1.5 Uso de aditivos en sistemas de alimentación de ponedoras 20
1.6 Orégano 21
1.6.1 Orégano *L. origanoides* Kunth y su aceite esencial 22

2. Hipótesis **25**

3. Objetivos **27**

3.1 General 27
3.2 Específicos 27

4. Metodología **28**

4.1 Evaluación de la adición de MAEO y Vitamina E en dietas suplementadas con AGPI y AGS sobre la estabilidad de lípidos y proteínas de la yema de huevo 28
4.1.1 Animales y dieta 28

4.1.2 Micronizado de aceite esencial de orégano..... 30
4.1.3 Recolección y preparación de huevos..... 31
4.1.4 Diseño experimental 32
4.2 Cuantificación de timol en la yema de huevo..... 33
4.3 Estabilidad de lípidos de la yema de huevo durante el almacenamiento 34
4.3.1 Cuantificación del contenido de malondialdehído en yema de huevo..... 34
4.3.2 Perfil de ácidos grasos de la yema de huevo 34
4.4 Estabilidad de proteínas de la yema de huevo durante el almacenamiento..... 37
4.4.1 Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes de la yema de huevo..... 37
4.4.2 Evaluación del perfil de proteínas de la yema de huevo 39
4.5 Análisis estadístico 46
4.5.1 Análisis de geles bidimensionales..... 47

5. Resultados y discusión 49

5.1 La suplementación con micronizado de aceite esencial de orégano produce huevos con antioxidante 49
5.2 Estabilidad de lípidos de la yema de huevo durante el almacenamiento 55
5.3 Estabilidad de proteínas de la yema de huevo durante el almacenamiento..... 60
5.3.1 Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes de la yema de huevo 60
5.3.2 Evaluación del perfil de proteínas de la yema de huevo..... 66

6. Conclusiones, perspectivas y recomendaciones 97

6.1 Conclusiones..... 97
6.2 Perspectivas y recomendaciones 98

7. Financiación 101

8. Producción 102

9. Referencias Bibliográficas 116

Lista de figuras

Figura 1-1: Componentes estructurales de la cáscara de huevo, membrana de la cáscara de huevo, albúmina y yema. 5
Figura 1-2: Principio del ensayo WST Formazán para cuantificación de actividad SOD. 16
Figura 1-3: Principio del ensayo para la medición de actividad Catalasa. 17
Figura 1-4: Estructura del timol y carvacrol. 23
Figura 4-1: Separación y homogenización de yemas 31
Figura 4-2: Diagrama de submuestreo para la obtención y análisis de proteínas de la yema de huevo. 40
Figura 4-3: Jerarquías para el análisis de imágenes por Melanie 7.0. 45
Figura 5-1: Contenido de timol en la yema de huevo. 49
Figura 5-2: Efecto de la inclusión de MAEO (*Lippia origanoides* Kunth) sobre la actividad catalasa de la yema de huevo. 62
Figura 5-3: Efecto de la inclusión de MAEO (*Lippia origanoides* Kunth) en la actividad glutation peroxidasa (GSH-Px) de la yema de huevo. 62
Figura 5-4: Perfiles electroforéticos de proteínas de yemas de huevo frescas en geles de poliacrilamida al 10%. MW: Marcador de peso molecular sin preteñir de rango amplio marca Thermo Scientific ® #26630. 1, 2 y 3 indican réplicas de un mismo tratamiento.. 68
Figura 5-5: Perfiles electroforéticos de proteínas de yemas de huevo almacenadas 60 días a 4ºC en geles de poliacrilamida al 10%. MW: Marcador de peso molecular sin preteñir de rango amplio marca Thermo Scientific ® #26630. 1, 2 y 3 indican réplicas de un mismo tratamiento. 69
Figura 5-6: Geles 2D representativos de los proteomas de yemas de huevo frescas. La carga de proteína fue 100 µg en buffer de IEF y separada por 2DE usando tiras IEF de 7 cm en gradiente lineal de pH 3-10 y SDS-PAGE al 10%. Los *spots* de proteína fueron visualizados por tinción con Coomassie coloidal G-250. El marcador de peso empleado fue de rango amplio, marca Thermo Scientific ® #26630 (MW). Las muestras corresponden con (A) T1, (B) T2, (C) T3, (D) T4, (E) T5 y (F) T6. 70
Figura 5-7: Geles 2D representativos de los proteomas de yemas de huevo almacenadas durante 60 días a 4ºC. La carga de proteína fue 100 µg en buffer de IEF y separada por 2DE usando tiras IEF de 7 cm en gradiente lineal de pH 3-10 y SDS-PAGE al 10%. Los *spots* de proteína fueron visualizados por tinción con Coomassie coloidal G-250. El

marcador de peso empleado fue de rango amplio, marca Thermo Scientific ® #26630 (MW). Las muestras corresponden con (G) T1, (H) T2, (I) T3, (J) T4, (K) T5 y (L) T6. 71
Figura 5-8: Detección de *spots* en los geles, emparejamiento de las imágenes y adición de un *landmark* (circulo verde-naranja). 73
Figura 5-9: Detección de *spots* en los geles, emparejamiento de las imágenes y adición de un marcador o *landmark* (circulo naranja) (Continuación). 74
Figura 5-10: Proyección de factores para geles de muestras de yemas de huevos frescas y almacenadas 60 días a 4 °C. 78
Figura 5-11: Proyección de factores para geles de muestras de yemas de huevos frescos. 81
Figura 5-12: Proyección de factores para geles de muestras de yemas de huevos almacenados 60 días a 4 °C. 82
Figura 5-13: Ejemplo de la expresión diferencial de algunas proteínas en los geles bidimensionales (Resaltados en color verde). A. *spot* 28, clase T2-DÍA 0 vs. T3-DÍA 0 (Anova 0.007, Kolmogorov-Smirnov 1). B. *spot* 70, clases T2-DÍA 0 vs. T4- DÍA 0 (Anova 0.009; Kolmogorov-Smirnov 1). 83
Figura 5-14: Vista en tres dimensiones del *spot* 70 (Resaltados en verde) encontrado en las clases T2-DÍA 0 vs. T4- DÍA 0 con expresión diferencial (Anova 0.009; Kolmogorov-Smirnov 1). 84
Figura 5-15: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación de los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos de los tratamientos T1 y T2. 85
Figura 5-16: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos. 86
Figura 5-17: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación 3 de los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos. 88
Figura 5-18: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación 4 de los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos. 89

Figura 5-19: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación 5 de los perfiles proteómicos de yemas de huevos frescos y almacenados. 93

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Composición de la yema de huevo. 6

Tabla 4-1: Composición de la dieta basal 29

Tabla 4-2: Perfil de ácidos grasos en la dieta de ponedoras 30

Tabla 4-3: Tiempos de retención cromatográficos para estándar de ácidos grasos *oil Rapeseed – 07456* 36

Tabla 4-4: Diseño de comparaciones planeadas entre tratamientos. 46

Tabla 5-1: Contenidos de timol obtenido después de la suplementación durante 4 semanas con MAEO. 52

Tabla 5-2: Efecto del nivel de inclusión de MAEO en la dieta sobre el porcentaje de humedad en la yema de huevo. 53

Tabla 5-3: Cambios en el porcentaje de humedad de la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento 54

Tabla 5-4: Efecto de la suplementación con MAEO sobre % E.E., composición de ácidos grasos (% cantidad relativa) y concentración de MDA en la yema (mg/Kg). 56

Tabla 5-5: Comparación del cambio en el porcentaje de extracto etéreo (EE) y la concentración de malondialdehído (MDA) en la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento en los tratamientos experimentales. 57

Tabla 5-6: Comparación del cambio en la composición de ácidos grasos en la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento en los tratamientos experimentales. ... 59

Tabla 5-7: Efecto del nivel de inclusión de MAEO en la dieta sobre la actividad de la SOD, CAT y GSH-Px en la yema de huevo. 61

Tabla 5-8: Comparación del cambio en la actividad de la SOD, CAT y GSH-Px en la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento. 64

Tabla 5-9: Cuantificación de proteínas en extractos proteicos de yema de huevos frescos. 66

Tabla 5-11: Parámetros seleccionados para la identificación de *spots* en los geles bidimensionales de proteína de yema de huevo. 72
Tabla 5-12: Conteo de *spots* emparejados entre los geles 2D de muestras de yema de huevos frescos por cada tratamiento. 75
Tabla 5-13: Conteo de *spots* emparejados entre los geles 2D de muestras de yema de huevos almacenados 60 días a 4ºC por cada tratamiento..... 76
Tabla 5-14: Correlaciones entre variables respuesta en la yema de huevos. 94
Tabla 8-1. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (> 0.01%) del AE de orégano *L. origanoides* Kunth extraído por arrastre con vapor..... 105
Tabla 8-2: Curva de calibración para la cuantificación de timol por HPLC. 107
Tabla 8-3: Curva de calibración de malondialdehído. 108
Tabla 8-4: Curva de inhibición de la SOD en el ensayo WSZ-1 con 20 minutos de incubación a 37 ºC. 109
Tabla 8-5: Curva de estándares de H_2O_2 para cuantificación de actividad catalasa en extractos de yema de huevo. 110
Tabla 8-6: Curva de calibración para la cuantificación de proteína en extractos enzimáticos de yema de huevo. 110
Tabla 8-7: Curva de calibración con Pearce 660 nm preparada en *buffer* de Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2 %, Anfolitos 0,2 % para la cuantificación de extractos proteicos. 111
Tabla 8-8: *Spots* con expresión diferencial en la yema de huevo por efectos de los diferentes tratamientos dietarios implementados. 112

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEO	Aceite esencial de Orégano *Lippia origanoides* Kunth
AGI/AGS	Relación de ácidos grasos insaturados sobre saturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ASB	Albúmina Sérica Bovina
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalasa
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosopentaenoico
DTT	(2S, 3S) -1,4-bis (sulfanil) butano-2,3-diol (Ditiotreitol)
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EE	Extracto etéreo
ERN	Especies reactivas de Nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FD	Factor de dilución
GP	Galato de propilo
GR	Glutation reductasa

GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
GSH-Px	Glutation peroxidasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía liquida de alta eficiencia
IAA	Yodoacetamida
IEF	Isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina G
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MAEO	Micronizado de aceite esencial de Orégano *Lippia origanoides* Kunth
MDA	Malondialdehído
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
$NADP^+$	β- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	β- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nm	Nanometro
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIBP	Producto Interno Bruto Pecuario
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TBHQ	Terbutilhidroquinona
UFFDA	Software User-Friendly Feed Formulation Program
µL	Microlitro
ω-3	Ácidos grasos omega 3
ω-6	Ácidos grasos omega 6

Introducción

Los huevos de gallina son uno de los alimentos de origen animal más versátiles y populares, debido a que son fuente importante de nutrientes como proteínas, vitaminas, minerales y lípidos (Huopalahti, et al., 2007). La producción y comercialización de huevos y carne de pollo son consideradas actualmente según la Federación Nacional de Avicultores de Colombia (Fenavi) como la segunda actividad agropecuaria más importante después de la ganadería, puesto que, el consumo per cápita anual de huevo en el año 2014 fue de 242 unidades y se mantiene una tendencia al incremento en el 2015 (Federación Nacional de Avicultores de Colombia, 2014).

En los últimos años, se ha incluido el enriquecimiento de los huevos con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) debido a los beneficios asociados al consumo de los omega 3 (ω-3) para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Dyerberg & Bang, 1974; Sparks, 2005). El contenido de AGPI en los huevos se ha aumentado a través de la suplementación de las dietas de las gallinas ponedoras con aceites de pescado (Aymond & Van Elswky, 1995), algas marinas (Marshall, et al., 1994), semillas vegetales (Bernal, et al., 2003), o aceites ricos en ω-3 y ω-6 (Galobart, 2001). Sin embargo, este incremento conduce a un mayor grado de insaturación en los lípidos del huevo y por consiguiente a una mayor susceptibilidad del producto a la oxidación durante el tiempo de almacenamiento.

La oxidación lipídica en los alimentos afecta negativamente la calidad global de los mismos, incluyendo el sabor, color, textura y el valor nutricional, lo cual, incide directamente sobre la calidad del producto y su valor comercial (Shahidi, et al., 1992; (Nadia, 2008; Betancourt, 2012). La auto oxidación de los AGPI produce compuestos como los ácidos grasos hidroperóxidos (Ramos, et al., 2009), ácidos grasos hidróxidos (Ramos,

et al., 2009), aldehídos como el malondialdehído (MDA) y algunos hidrocarburos (Hammershoj, 2002; Hidalgo, et al., 2006; Mourente, 1999).

Para prevenir este proceso, las células como el huevo producen antioxidantes de protección tales como las metaloproteínas, enzimas antioxidantes especializadas como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), las cuales, son capaces de transformar los productos derivados del estrés oxidativo en especies menos reactivas y tóxicas para la célula (Mourente, 1999; Sakanaka, 2004).

Para controlar y evitar la oxidación de los lípidos, la industria alimentaria y avícola ha empleado sustancias antioxidantes como el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA), los cuales han sido ampliamente utilizados por adición directa al producto final con el fin de prolongar la durabilidad de los huevos producidos. Dichas sustancias, si bien cumplen con eficacia el proceso de reducción de la oxidación en el huevo, se considera que son potencialmente cancerígenos y pueden representar un riesgo para quienes consumen el producto (Arango, 2012).

Por esta razón, los antioxidantes sintéticos están siendo sustituidos progresivamente por antioxidantes de origen natural como los tocoferoles (Galobart, 2001). Para ello, se ha optado por aumentar la concentración intrínseca de antioxidantes a través de la suplementación dietaría con estos. La suplementación de gallinas con tocoferoles ha mostrado un aumento en los contenidos de antioxidantes y ha evitado la oxidación de los lípidos en productos como la carne de pollo (Lopez-Bote, et al., 1998) los huevos (Marshall, et al., 1994), además de brindar mayor seguridad al consumidor.

Estudios recientes han centrado su atención en evaluar los efectos de la suplementación dietaria de las aves de corral con extractos de plantas como el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), la salvia (*Salvia officinalis* L.) y el orégano (*Origanum vulgare*) (Christaki, et al., 2011; Yesilbag, et al., 2013) teniendo en cuenta las propiedades biológicas que les han sido atribuidas, entre ellas la antioxidante.

El orégano es una planta aromática de la que se conocen varios quimiotipos y géneros. El género *Origanum* pertenece a la familia *Lamiaceae*; el *Vulgare Hirtum* a la familia *Labiatae;* y el *Lippia* a la *Verbenaceae*. El género *Lippia* es uno de los mayormente explotados e incluye alrededor de 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños; la mayoría se encuentran distribuidos en Centroamérica (Amadio, 2011), Suramérica (Quiroga, 2011) y en la zona tropical africana (Arcila-Lozano, 2004). El aceite esencial extraído de esta planta aromática contiene sustancias con actividades biológicas que incluyen actividad antioxidante (Muñoz, 2007), antimicrobiana (Baydar, et al., 2004) y antifúngica (Arcila-Lozano, 2004). Por esta razón, se ha ido introduciendo como un aditivo en la alimentación de pollos de engorde (Betancourt, 2012), peces (Rodríguez, 2011) con fines de mejoramiento en el rendimiento productivo (Amadio, 2011) y en bovinos para la disminución en la producción y emisión de gases de efecto invernadero (Canbolat, et al., 2010; Mohamed, et al., 2012; Rodríguez Quiroz, 2014). Recientemente, el aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth (AEO) se ha empezado a evaluar en los sistemas de producción de huevos, encontrándose que las yemas enriquecidas con AGPI muestran una reducción en los procesos de oxidación lipídica durante el tiempo de almacenamiento, con la ventaja adicional que no ocasiona efectos negativos sobre el desempeño productivo y tiene aceptación por parte del consumidor (Ortiz, et al., 2013).

Los estudios arriba mencionados demuestran los efectos positivos de la suplementación de AEO en la producción a causa de la reducción de la oxidación lipídica en el huevo. Sin embargo, no se ha reportado a la fecha sus efectos y funcionalidad sobre componentes susceptibles a oxidación cuando se suplementan las dietas con productos de alto contenido de AGPI, los cuales, incrementan la susceptibilidad del huevo al ataque de radicales libres. En este orden de ideas, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la suplementación de aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth en presentación micronizado[1] (MAEO) a diferentes dosis en dietas para ponedoras enriquecidas con AGPI y comparar sus efectos sobre la estabilidad de los lípidos y proteínas de la yema de huevo frente a un periodo de 60 días de almacenamiento.

[1] La micronización es un proceso físico para la reducción del tamaño de las partículas de una sustancia sólida (Diámetro menor a 50 micras).

1. Estado actual del tema

1.1 Producción de huevo en Colombia

La industria del huevo lleva más de 50 años en Colombia y se estima que contribuye con el 10,32% del producto interno bruto pecuario (PIBP) según lo reportado por Fenavi en el año 2014. De acuerdo con cifras oficiales, se consumen entre 10 y 12 mil millones de unidades de huevos al año y en la última década su demanda se incrementó un 30,7%, ya que en el año 2005 el consumo per cápita anual fue de 192 unidades y en la actualidad, asciende a 251 (Federación Nacional de Avicultores- Fenavi, 2015).

Los huevos de gallina constituyen un ingrediente importante para la elaboración de productos alimenticios, tales como pastas, tortas, mayonesa, entre otros (Raikos, et al., 2006). Se pueden consumir sin procesar, procesados o como componente de otros productos. La yema y la clara de huevo se han usado ampliamente por sus propiedades tecnológicas como coagulantes, agentes emulsionantes y espumantes (Campbell, et al., 2003, Kiosseoglou, 2000).

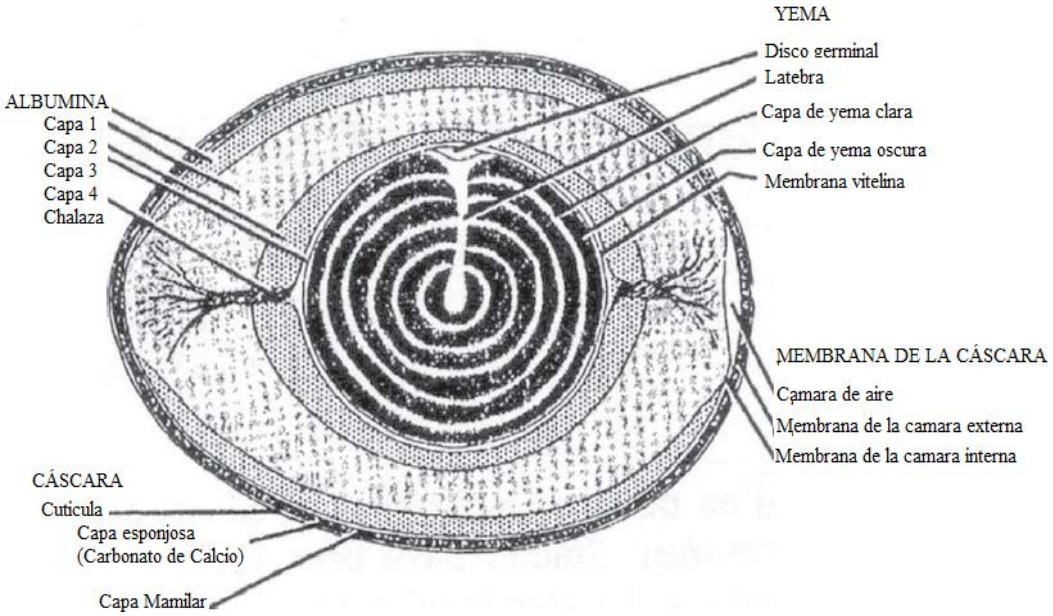
La polifuncionalidad del huevo en los sistemas alimentarios se ha correlacionado en gran medida con su composición química, ya que, el huevo es especialmente rico en ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas (A, D, E, K), los cuales le confieren un alto valor nutricional (Jhon Wiley & Sons, Inc., 2008).

1.2 Composición de los huevos de gallina

Los huevos de gallina están compuestos por tres partes principalmente; la cáscara con la membrana, la albúmina o clara y la yema. La yema está rodeada por albúmina, que es a

su vez envuelta por las membranas de la cascara y finalmente una cascara dura (Figura 1-1) (Toldrá & Nollet , 2013)**.**

Figura 1-1: Componentes estructurales de la cáscara de huevo, membrana de la cáscara de huevo, albúmina y yema[2].



1.2.1 Yema de huevo

La yema de huevo constituye alrededor del 36% del peso del huevo y la materia seca se ha establecido entre el 50 – 52% (Powrie & Nakaï, 1986). Los componentes principales de la yema son los lípidos con aproximadamente 65% del peso seco. La relación de lípidos y proteínas en la yema de huevo es de alrededor de 2:1. Los carotenoides representan menos del 1% de los lípidos de la yema y contribuyen con su color característico. La Tabla 1-1 presenta la relación de componentes de la yema.

[2] Tomado y adaptado de Toldrá & Nollet, 2013. *Food Microbiology and Food Safety.* New York: M.P. Doyle. Springer.

Tabla 1-1: Composición de la yema de huevo.

Componente	Yema fresca (%)	Yema seca (%)
Agua	51,1	-
Lípidos	3,6	62,5
Proteínas	16	33
Carbohidratos	0,6	1,2
Minerales	1,7	3,5

Tomado y traducido de Powrie, W.D. and Nakaï. The chemistry of eggs and egg products. [ed.] Avi Publishing. s.l.: W.J. Stadelman and O.J. Cotterill, 1986 (Powrie & NakaÏ, 1986)**.**

La yema es un complejo sistema que contiene una variedad de partículas dispersas en una solución proteínica encerrada dentro de una membrana vitelina. Las partículas incluyen esferas de yema, gránulos que flotan libres, glóbulos de lipoproteínas de baja densidad y de mielina (Toldrá & Nollet , 2013).

Las esferas son componentes menores que constituyen el 1% de la materia seca, tienen un diámetro entre 4 y 150 µm que aparecen como gotas apretadas de lípidos y lipoproteínas-proteínas. Los perfiles son partículas redondas de 12-48 nm de diámetro y se consideran como lipoproteínas de baja densidad (Toldrá & Nollet , 2013).

Los gránulos consisten en complejos circulares con diámetros entre 0,3 µm a 2 µm. Representan entre 19 -23 % de yema seca, equivalente al 50% de las proteínas de la yema de huevo y 7% de los lípidos totales. Los gránulos son constituidos principalmente por lipoproteínas de alta densidad (HDL) (70%) y fosvitina (16%) (Huopalahti, et al., 2007).

- **Lípidos de la yema de huevo**

Los lípidos son el principal componente de los sólidos de la yema de huevo (32-36%). La composición lipídica reporta cerca del 62% de triglicéridos, 33% de fosfolípidos y 5% de colesterol (Jhon Wiley & Sons, Inc., 2008). En los lípidos la composición de ácidos grasos basada en una alimentación estandarizada de gallinas ponedoras contiene

aproximadamente un 30-35% de ácidos grasos saturados (AGS), 40-45% de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y 20-25% de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Los ácidos grasos son los componentes característicos de muchos lípidos y rara vez se encuentran libres en las células. Son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal con un número par de átomos de carbono. El extremo de la cadena tiene un grupo carboxilo (-COOH) y pueden ser del tipo saturados o insaturados. En la yema de huevo se encuentran principalmente el ácido oleico (C18:1, 40-45%), palmítico (C16:0, 20-25%) y el ácido linóleico (C18:2, 15-20%). Sin embargo, esta composición presenta variaciones dependiendo de la edad del animal, el genotipo y los cambios en la dieta de la ponedora. Los ácidos grasos provenientes de la dieta pueden modificar especialmente las proporciones de AGPI y AGMI, mientras que los AGS son solo levemente afectados (Kuksis A., 1992).

El colesterol es el esterol que se encuentra en la yema de huevo y resulta en parte de la alimentación de la gallina y en otra parte de la síntesis en el hígado durante la elaboración de las lipoproteínas. Se presenta en forma libre (85 – 90%) o en forma esterificada (10-15%) (Bitman & Wood, 1980). Los ésteres de colesterol están presentes en el núcleo del LDL y contienen ácido oleico 35%, palmítico 33%, linoleico 12% y esteárico 11% (Kuksis A., 1992).

- **Proteínas de la yema de huevo**

Las proteínas están presentes como proteínas libres o apoproteínas. Las interacciones entre lípidos y proteínas conllevan a la formación de lipoproteínas que representan los mayores constituyentes de la yema. Los análisis de materia seca han mostrado que la yema está constituida por cinco componentes principalmente: 68% de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 16% de HDL, 10% de proteínas globulares (Livetinas), 4% de fosfoproteínas (Fosvitina) y 2% de proteínas de menor importancia (Ahn, et al., 2006).

Las lipovitelinas, fosvitinas altamente fosforiladas y las glicoproteínas de plasma de yema como YGP40 y YGP42, se sintetizan en el hígado y son transportadas al ovocito como los precursores de las vitelogeninas con pesos moleculares entre 210-260 kDa, las cuales son

constituyentes de las partículas de HDL en la sangre (Van het Schip, et al., 1987; Yamamura, et al., 1995). Algunos estudios han reportado que los fosfolípidos (King, et al., 1992) y la fosvitina (Lu & Baker, 1987) de la yema estarían muy relacionados con propiedades antioxidantes (Yamamoto, et al., 1990).

La separación e identificación de las proteínas en el huevo se ha realizado mediante el uso de técnicas cromatográficas (Awade & Efstathiou, 1999; Miguel, et al., 2005), electroforesis (Kitabatake, et al., 1988), inmunoquímica (Desert , et al., 2001; Holen & Elsayed, 1990) e isoelectroenfoque (Beeley, 1971). Recientemente, la espectrometría de masas ha permitido dar un salto, con lo cual se ha conducido al hallazgo de más de 100 proteínas tanto en la yema (Mann & Mann, 2007; Farinazzo, et al., 2009) como en la clara de huevo (Guerin-Dubiard, et al., 2006; Raikos, et al., 2006; D' Ambrosio, et al., 2008; Mann, 2007).

1.3 Enriquecimiento de huevos con ácidos grasos poliinsaturados

Los huevos comerciales contienen una alta proporción de AGPI ω-6 como el linoleico, araquidónico o γ-linólenico en la yema, sin embargo, son una fuente baja de AGPI ω-3 como el ácido α-linolénico, eicosapentaenoico (EPA), ácidos docosopentaenoico (DPA), docosahexaenoico (DHA), entre otros (Huopalahti, 2007). Se ha demostrado que los AGPI ω-3 o ácidos grasos esenciales son beneficios para la salud humana y se sugiere que el consumo regular en la dieta disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y ciertos trastornos autoinmunes (Dyerberg & Bang, 1974).

Los resultados de estudios recientes sugieren que los AGPI ω-3 como EPA y DHA, son importantes para el desarrollo del cerebro y crecimiento en los niños, evitan la agregación de plaquetas, reducen la cantidad de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad en el suero sanguíneo, y esto promueve la disminución en la obstrucción de las arterias. Bajo esta premisa, la demanda de alimentos con mayor contenido de AGPI ω-3 se ha incrementado en los consumidores en los últimos años.

Por esta razón, la industria avícola ha implementado dos estrategias principales para aumentar la concentración intrínseca de los AGPI ω-3 en la yema de huevo. La primera es el enriquecimiento de la dieta basal con aceite vegetal de fuentes como las semillas de lino y linaza, y la segunda, mediante la adición de cualquier fuente de EPA o DHA como la harina de pescado (Aymond & Van Elswky, 1995), el aceite de pescado (Galobart, 2001) y algunas algas (Huopalahti, et al., 2007; Marshall, et al., 1994). El suministro diario de estas dietas enriquecidas con este tipo de aceites y componentes, modifica el perfil de ácidos grasos en la yema de huevo, aumentando paulatinamente la relación de AGPI con respecto a los AGS. Los ácidos grasos que principalmente se ven afectados por la implementación de este tipo de estrategias son el oleico, linóleico y α- linólenico (Meynier, et al., 2014).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el enriquecimiento de la yema de huevo con AGPI proporciona múltiples beneficios en la salud del consumidor, sin embargo, el aumento en la cantidad de AGPI eleva la susceptibilidad del producto al deterioro oxidativo, debido a que los AGPI son más propensos al ataque de radicales libres por el número de insaturaciones en su cadena, por lo que el aumento de estos ácidos en las dietas de las aves, lleva a la disminución del tiempo de vida media del producto y a la perdida de las características de calidad y valor nutricional del producto (Meynier, et al., 2014).

- **Factores de calidad del huevo afectados por el tiempo de almacenamiento**

La calidad del huevo ha sido definida como todas aquellas características del huevo que influyen en la aceptación o rechazo del producto por parte del consumidor (Stadelman & Cotterill, 1995). Es un término que refiere a varios estándares impuestos al huevo, los cuales hacen referencia a la calidad interna y externa. En general estos estándares son enfocados a la limpieza y textura del cascarón, forma del huevo, viscosidad de la albúmina, forma y firmeza de la yema.

Se ha reportado que la calidad interna del huevo se ve afecta inmediatamente después de la puesta y durante el almacenamiento, ya que, varios cambios bioquímicos, físicos y mecánicos (Huyghebaert, 2006), se producen en los componentes del huevo. Estas modificaciones se refieren principalmente al aumento del volumen de la cámara de aire, la

licuefacción de la parte densa de la albúmina y el debilitamiento de la membrana vitelina que separa la yema y el albumen (Berardinelli, et al., 2008).

En referencia a las condiciones de almacenamiento, se conoce que las bajas temperaturas prolongan la calidad del huevo, sin embargo, en muchas regiones, la refrigeración y manipulación de los huevos no es controlada durante la distribución y comercialización (Bell & Weaver, 2001; Jones & Musgrove, 2005; Oliveira, et al., 2009)

1.4 Estrés oxidativo y antioxidantes

El estrés oxidativo es definido como una alteración del equilibrio entre especies prooxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

- **Especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres**

En los organismos aerobios, además de la radiación ionizante, la obtención de energía mediante la oxidación de substratos ricos en hidrógeno y carbono genera intermediarios reducidos del O_2, denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO). Algunas de ellas, como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e hidroxilo ($^{\cdot}OH$), son altamente reactivas al poseer uno o dos electrones desapareados. No obstante, aunque otros derivados como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete ($^1O_2$) y ácido hipocloroso (HOCl) también reciben este nombre, no son verdaderos radicales libres, ya que no poseen la configuración electrónica que define químicamente a estas especies.

Adicionalmente, de la reacción de ERO con compuestos como el óxido nítrico (NO), se originan radicales libres del nitrógeno (ERN) como el peroxinitrito ($ONOO^-$). La reactividad de estos compuestos es tal, que su generación se considera como una cascada de transición entre unas especies y otras.

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, capaces de existir de forma independiente (Cheeseman & Slater, 1993), que se producen en todas las células, y que presentan una gran inestabilidad. Son especies muy reactivas y con una elevada actividad como aceptores de electrones, lo cual les convierte en potenciales productores de daño a diferentes moléculas del organismo (Halliwell & Gutteridge , 2007).

Los radicales libres inorgánicos o primarios se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por lo tanto distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener un tiempo de vida media muy corta como el anión superóxido, el radial hidroxilo y el óxido nítrico (Diplock, 1991).

Los radicales libres orgánicos o secundarios se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí y poseen un tiempo de vida media un tanto más larga que los primarios.

En los sistemas biológicos, a pesar de poseer una vida media relativamente corta y diferente capacidad de difusión, los radicales libres causan una oxidación selectiva de componentes celulares tan importantes como lípidos, proteínas y ADN.

Los lípidos, en particular los AGPI, son biomoléculas altamente susceptibles de ser atacadas por radicales libres (Cheeseman & Slater, 1993) como el radical hidroxilo (HO^{*}), el peróxido (ROO^{*}), el alcóxido (RO^{*}) y el alquílico (R^{*}). El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica, esta comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Cheeseman & Slater, 1993). Esta reacción se produce principalmente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de AGPI, dado que los radicales formados se estabilizan por resonancia.

Los hidroperóxidos (ROOH) son considerados como uno de los productos de reacción más importantes en la oxidación de los lípidos; son especies de naturaleza transitoria y se someten a cambios y deterioro con los radicales, generando productos secundarios como

pentanal, hexanal, 4-hidroxinonenal y malondialdehído (Fernández, et al., 1997). La estabilidad oxidativa generalmente es evaluada con la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), por la medición de productos coloreados a través de espectrofotometría (Botsoglou, et al., 1994).

De otro lado, las proteínas tienen residuos susceptibles al ataque de radicales libres, principalmente el grupo carbonilo es sensible a la presencia del radical hidroxilo. Los aminoácidos con mayor predisposición a ser oxidados son tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína (Stadtman, 1992). La oxidación de las proteínas da lugar a cambios conformacionales en su estructura, que conllevan a una pérdida o modificación de sus funciones biológicas (Halliwell & Auroma, 1991).

El daño oxidativo a proteínas puede determinarse de varias formas, entre ellas por marcaje de los grupos carbonilo formados tras el ataque a las proteínas por parte de los radicales libres con reactivos como el borohidruro de sodio tritiado o por la reacción con fenilhidrazinas (Halliwell & Auroma, 1991). Por ejemplo, la técnica del *western blotting* se puede usar con proteínas oxidadas, una vez sean derivatizadas con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (Oliver & Ahn, 1987).

El ADN también es susceptible de daño oxidativo. El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose radicales como el peroxilo. Los subproductos generados como consecuencia de la oxidación del ADN son bien conocidos, entre ellos se encuentran la 8-oxoadenina, 8-oxoguanina, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 5-hidroxicitosina, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, timina glicol y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, entre otros (Halliwell & Auroma, 1991).

Una de las bases modificadas cuyo contenido se ve aumentado cuando el daño oxidativo afecta el ADN, es la 8-hidroxiguanina (Sies, 1986). La detección y cuantificación de este compuesto se hace especialmente con cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC) con detección electroquímica o por espectrometría de masas.

Adicionalmente, se ha reportado que los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilos, aunque los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa es un captador de radical superóxido, por su capacidad de retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, éstos son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos (Borel & Monboisse, 1988).

- **Señalización redox**

El término señalización redox, se ha utilizado para describir a las funciones reguladas por señales oxidativas que inducen respuestas protectoras contra el daño oxidativo. Muchas de las respuestas mediadas por las ERO protegen a las células contra el estrés oxidativo y restablecen la homeostasis redox. La utilización de ERO y ERN como moléculas de señalización dentro de los procesos fisiológicos, incluyen: regulación del tono vascular, monitoreo de la tensión de oxígeno en el control de la ventilación y en la producción de eritropoyetina, así como la transducción de señales de receptores membranales en diversos procesos. Otros procesos fisiológicos que involucran a los mecanismos de óxido-reducción y los radicales libres como: la renovación de las membranas y fenómenos plásticos celulares, la supervivencia celular en el sistema nervioso durante etapas embrionarias, mitosis, migración celular, síntesis y liberación de algunas hormonas y factores de crecimiento, aumento de la transcripción de citosinas durante los procesos inflamatorios, hasta señalización celular mediada por segundos mensajeros. Se ha encontrado que niveles bajos de ERO estimulan la proliferación celular, mientras que niveles más altos tienen una acción inhibitoria. Las ERO tienen una participación fundamental en la regulación del sistema inmune (Finkel, 1998; Joseph & Cutler, 1995).

Mientras que altas concentraciones de ERO pueden resultar en un daño oxidativo masivo e indiscriminado, es posible que bajas concentraciones de ERO sean suficientes para activar genes específicos. Las ERO pueden activar al factor de transcripción nuclear κB (NFκB), quien juega un papel fundamental en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria; muchas citosinas pro-inflamatorias, quimosinas, moléculas de adhesión

celular, factores estimulantes de colonias y enzimas inflamatorias son producto de genes regulados por NFκB (Joseph & Cutler, 1995).

Las ERO tienen un papel muy importante en la comunicación célula-célula, actúan como mensajeros celulares, activan la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en músculo liso, la adenilato ciclasa, y también activan a las proteínas reguladoras de Fe^{2+} (transferrina, ceruloplasmina, hemosiderina y ferritina). La regulación redox de la expresión génica se da a través de Oxy R (un activador de la transcripción inducida por peróxido de hidrógeno). La presencia de peróxido de hidrógeno, radiaciones ultravioleta y otras condiciones durante las cuales hay estrés oxidativo, induce la expresión de la oxidorreductasa tiorredoxina (Trx). La Trx, junto con el sistema de glutatión, se ocupa de mantener un estado intracelular reducido; la secuencia del gen humano para la Trx contiene sitios de unión para los factores de transcripción (Finkel, 1998).

1.4.1 Sistemas de defensa antioxidante

Un antioxidante puede ser definido como cualquier sustancia que retrasa, previene o inhibe el daño oxidativo de una molécula diana (Halliwell & Gutteridge , 2007). Las células vivas aeróbicas como el huevo están sujetas a sufrir de estrés oxidativo, por esta razón, el organismo ha desarrollado algunos mecanismos de defensa antioxidante que cumplen específicamente con las funciones de prevención de la formación de las ERO, entorpecimiento del ataque de las ERO, conversión de los metabolitos reactivos en moléculas menos reactivas y facilitar la reparación de los daños causados por las ERO, entre otras (Halliwell & Auroma, 1991).

Las enzimas antioxidantes son consideradas como el primer sistema de defensa de la célula. Dentro de este grupo se incluyen a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y algunas proteínas enlazadas a metales como la ferritina. La función principal de estas proteínas es la prevención de la formación de nuevas especies de radicales libres (Sies, 1986).

- **Superóxido dismutasa**

Es una enzima que cataliza la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a especies menos reactivas como el oxígeno molecular (O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Ecuación 1-1

$$2O^-_{2(ac)} + 2H^+(ac) \rightarrow O_{2(g)} + H_2O_{2(ac)}$$

La SOD (EC 1.15.1.1) juega un papel importante en la defensa de las células contra los efectos tóxicos de los radicales de oxígeno. La SOD compite con el óxido NO por los aniones superóxido, que reaccionan con NO para formar peroxinitrito. La SOD ha suprimido la apoptosis en los folículos ováricos de rata, líneas celulares neuronales, y ratones transgénicos mediante la prevención de la conversión de NO a peroxinitrato, un inductor de la apoptosis (Beckman, 1990).

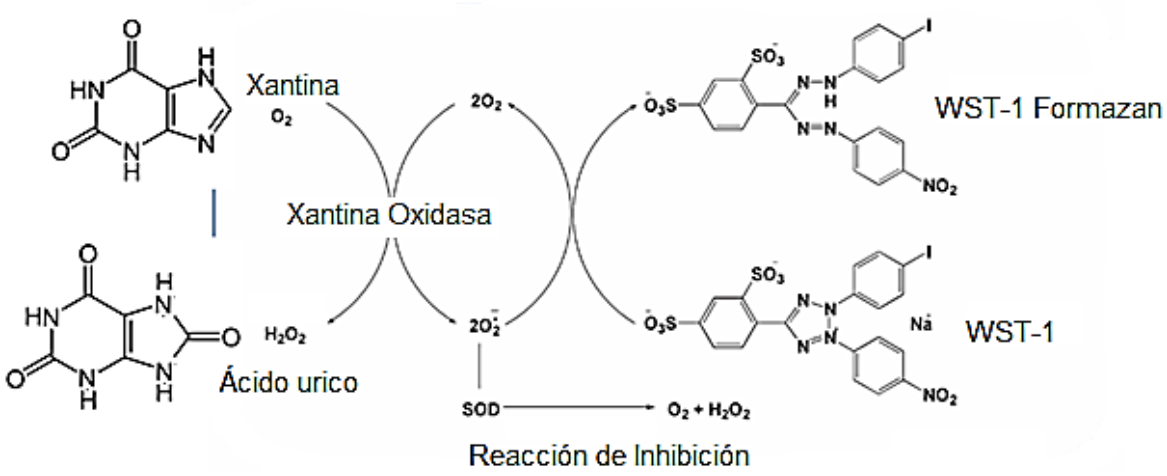
La SOD es una proteína homodimérica de peso molecular 32,5 kDa unida no covalentemente (interacciones hidrofóbicas y electrostáticas) a dos subunidades de 151 aminoácidos de 16,3 kDa cada una. Cada monómero tiene un disulfuro intracadena y un sulfhidrilo libre, un átomo de Cu^{2+} y un átomo de Zn^{2+} (Cass, 1985).

Hay tres formas de SOD diferenciadas por los iones metálicos en el sitio activo, se conocen con Cu^{2+}/Zn^{2+}, Mn^{2+}, y Fe^{2+}. En organismos vertebrados Cu/Zn-SOD se encuentra en el citoplasma y el espacio intermembranal mitocondrial (Mourente, 1999), mientras que Mn-SOD se encuentra en el espacio de la matriz mitocondrial (Marklund, 1984), la Fe-SOD se encuentra en procariotas y algunas plantas superiores (Sies, 1986).

Wawrzykowski y Kankofer en el 2011 reportaron la presencia de SOD acoplada a cobre-cinc y manganeso en la yema de huevo, y que la actividad antioxidante de la enzima disminuye durante el almacenamiento a 4°C luego de 6 días. Además, demostraron que la SOD extraída y purificada de la yema es capaz de proteger los ácidos grasos del aceite de cocina contra el daño oxidativo, y que previene el proceso de rancidez en alimentos con alto contenido de lípidos en una manera similar y mejorada con respecto a algunos antioxidantes sintéticos como el BHT (Wawrzykowski & Kankofer, 2014).

La actividad SOD se puede medir siguiendo el procedimiento de Ishiyama, 1995 (Ishiyama, et al., 1995) como actividad de inhibición de la oxidación de la sal monosódica del 2-(4-yodofenil)-3(4-nitrofenil)-5(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolio (WST-1) que produce formazán después de la reducción con el anión superóxido. La disminución en la absorbancia a 450 nm es proporcional a la cantidad de anión superóxido que no es estabilizado por la enzima (Figura 1-2).

Figura 1-2: Principio del ensayo WST Formazán para cuantificación de actividad SOD.



- **Catalasa**

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima presente en las plantas, animales y bacterias aeróbicas; está localizada en los peroxisomas y es muy eficiente en la conversión de H_2O_2 es una molécula estable, no radical y que se puede difundir a través de las membranas biológicas. Cada molécula de catalasa (CAT) es capaz de convertir al menos 6 millones de moléculas de H_2O_2 a agua y oxígeno por minuto (Aebi, 1984). La reacción catalítica (Ecuación 1-2) utiliza dos moléculas de H_2O_2 sin utilización de otro tipo de sustrato.

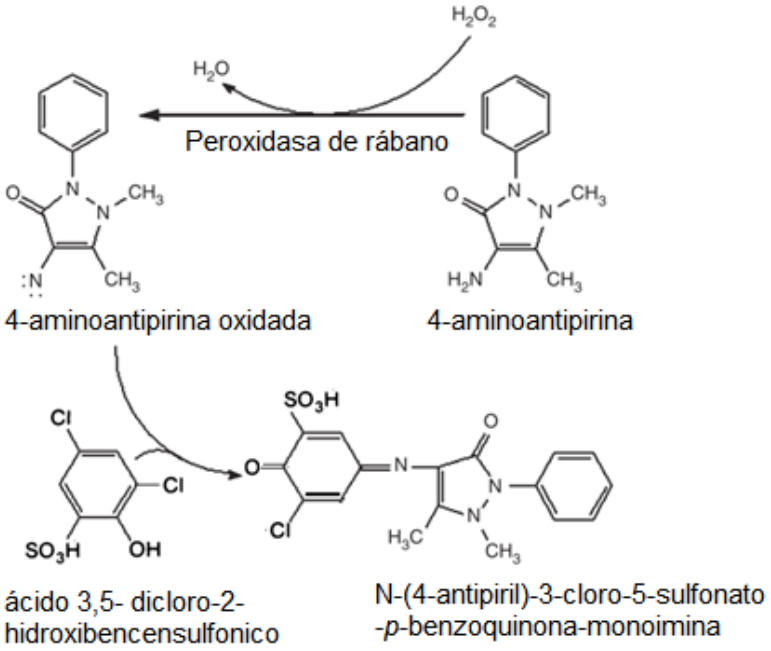
Ecuación 1-2

$$2H_2O_{2(ac)} \xrightarrow{Catalasa} 2H_2O + O_2$$

La actividad catalasa se puede determinar colorimétricamente de acuerdo con el procedimiento descrito por Fossati *et al*., 1980 (Fossati, et al., 1980) y Ogura *et al*., 1983 (Ogura & Yamazaki, 1983) siguiendo la descomposición del H_2O_2 a 25 ºC a una longitud de onda de 520 nm.

El principio del ensayo se basa en la medición del H_2O_2 como sustrato remanente después de la acción de la catalasa. El mecanismo de acción se basa en que la catalasa convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 por la vía catalítica. Luego, la reacción enzimática se detiene usando azida de sodio, y se toma una alícuota de la reacción anterior para evaluar la cantidad de H_2O_2 remanente. Mediante un método colorimétrico, el H_2O_2 en presencia de la peroxidasa de rábano oxida el amino de la 4-aminoantipirina, luego el fenol sustituido del ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfonico (DHBS) se acopla oxidativamente a la 4-aminoantipirina produciendo una quinonaimina coloreada (roja). La reacción química se muestra detalladamente en la Figura 1-3 (Ogura & Yamazaki, 1983).

Figura 1-3: Principio del ensayo para la medición de actividad Catalasa.



- **Glutatión Peroxidasa**

Esta enzima cumple la función de reducir el H_2O_2 o las especies de hidroperóxidos utilizando el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones, generando glutatión oxidado (GSSG).

Ecuación 1-3

$$2GSH_{(ac)} + H_2O_2(l) \rightarrow GSSG(ac) + 2H_2O(l)$$
$$2GSH(ac) + ROOH(l) \rightarrow GSSG(ac) + ROH(acido) + H_2O(l)$$

La glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9) se ubica en el citosol, la mitocondria y en la membrana celular, lo que la hace ser un mecanismo de protección celular importante contra el daño oxidativo producido a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Ketterer, 1986).

La actividad glutatión peroxidasa se puede cuantificar en extractos enzimáticos usando un método indirecto propuesto por Carmagnol, 1983 (Carmagnol, et al., 1983) y Thomson, 1989 (Thomson, et al., 1989) basado en la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por la glutatión peroxidasa (GSH-Px) que luego se acopla para reciclar el GSSG y convertirlo en GSH utilizando glutatión reductasa (GR) y β-Nicotinamida adenina di nucleótido fosfato reducido (NADPH). La actividad GSH-Px se midió siguiendo el decrecimiento de la absorbancia del NADPH a 340 nm usando un programa cinético para determinar la tasa de oxidación del NADPH a β-Nicotinamida adenina di nucleótido fosfato oxidado ($NADP^+$), ya que, la GSH-Px es un factor limitante en la reacción acoplada.

1.4.2 Antioxidantes suplementados en la dieta

Los sistemas de defensa no enzimáticos son los encargados de intervenir en la neutralización de radicales libres, especialmente cuando las cantidades de estos superan la capacidad de control por parte de los sistemas antioxidantes enzimáticos. Los sistemas

de este tipo incluyen glutatión, vitamina E, vitamina C, carotenoides, flavonoides, ácido úrico y albumina (Halliwell & Auroma, 1991).

- **Glutatión**

Es el principal antioxidante no enzimático de tipo endógeno. Está constituido por tres aminoácidos, ácido glutámico, cisteína y glicina. De acuerdo con su estado de óxido-reducción, como se mencionó previamente, se puede encontrar en dos formas: glutatión reducido o como glutatión oxidado. El GSH tiene importantes funciones metabólicas e interactúa con una amplia gama de radicales libres cediendo un protón (Asensi & Sastre, 1994). La función más importante del GSH es la eliminación de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por la GSH-Px. Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la GSH-Px. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor (Viña, 1992).

- **Vitamina E**

Vitamina E es el nombre genérico de una familia homogénea de compuestos que tienen en su estructura una porción hidroquinona metilada en mayor o menor grado y una cadena isoprenoide. El α-tocoferol es el componente más abundante de la vitamina E, y representa la mayor posibilidad de prevención de la peroxidación de membrana por estabilización de radicales peroxilo. La vitamina E tiene un grupo hidroxilo fenólico responsable de su actividad estabilizadora de radicales libres y una cadena ($C_{16}H_{33}$) que favorece su inserción en la región lipídica de la bicapa. En sistemas biológicos, una molécula de vitamina E permite proteger 1.0 x10^4 moléculas de ácidos grasos insaturados (Niki & Noguchi, 1995).

La vitamina E puede reaccionar con radicales lipídicos peroxilo, para formar vitamina E radical que es poco reactiva para reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados, actuando en la reacción de peroxidación lipídica como terminador de cadena. La vitamina E radical producida es estable porque el electrón desapareado del átomo de oxígeno puede ser deslocalizado dentro de la estructura del anillo aromático.

- **Vitamina C**

El ácido ascórbico o Vitamina C, es un compuesto altamente polar, soluble en agua e insoluble en medios lipídicos. La función principal como agente antioxidante radica en la reducción de reacciones de hidroxilación u oxido-reducción por lo que es capaz de neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipohidroperóxido, formando el radical hidroascorbato que posteriormente es reducido por el α-tocoferol. La vitamina C también inhibe la oxidación de las lipoproteínas de alta densidad (Bendich & Machlin, 1986).

- **Carotenoides**

Los carotenoides son antioxidantes liposolubles situados en las membranas celulares. Las propiedades antioxidantes de este tipo de compuestos radica en la estructura que contiene largas cadenas con dobles enlaces conjugados, razón por la cual, los carotenoides tienen la capacidad para neutralizar una amplia variedad de ERO (Niki & Noguchi, 1995).

1.5 Uso de aditivos en sistemas de alimentación de ponedoras

Los organismos vivos desarrollan diversos mecanismos para evitar el daño que los prooxidantes pueden causarle al mismo. Sin embargo, en la ausencia de los antioxidantes apropiados, los AGPI presentes en la yema de huevo forman radicales libres y pueden tener un efecto pro oxidante significativo llevando a la pérdida de la actividad de los sistemas antioxidantes primarios y aumentando los productos de oxidación (Surai, 2003). Por esta razón, se ha hecho requisito suplementar a las gallinas ponedoras con una mayor cantidad de antioxidantes, que permitan acompañar un consumo elevado de AGPI y obtener así la acción benéfica de los mismos.

La suplementación dietaria de las aves de corral con sustancias antioxidantes ha resultado ser un medio eficaz para mejorar la estabilidad oxidativa de los productos avícolas (Ariza,

2013; Ortiz, et al., 2013). El uso de antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol, el butilhidroxitolueno, el galato de propilo (PG) y la terbutilhidroquinona (TBHQ), se han introducido en la dieta de gallinas ponedoras presentando eficacia en la reducción de la oxidación lipídica de la yema de huevo en concentraciones de 200 ppm (Chen, et al., 1998). Sin embargo, su uso ha sido recientemente discutido por la sospecha de propiedades cancerígenas (Meynier, et al., 2014), lo que ha generado un rechazo por parte de los consumidores al uso de aditivos alimentarios de origen sintético.

Por esta razón, las actividades investigativas recientes han centrado su atención en el uso de aditivos funcionales de origen natural como por ejemplo la vitamina E, cuyos efectos en la mejora de la estabilidad de los lípidos en la yema de huevo ya han sido reportados (Franchini, et al., 2002). De igual manera, se ha probado el uso de extractos de hierbas, particularmente plantas aromáticas como el romero (*Rosmarinus officinalis*) (Lopez-Bote, et al., 1998), la salvia (*Salvia officinalis*) (Estevez, et al., 2007) y el orégano (*Origanum Vulgare*) (Botsoglou, et al., 2002) a los que se les ha atribuido una alta actividad antioxidante, efecto que ha sido asociado principalmente con la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos (Shahidi, et al., 1992; Vásquez, 2011).

1.6 Orégano

El orégano es una planta aromática cultivada en varias regiones del mundo, cuyo valor comercial se debe a sus características como especia, condimento y propiedades medicinales. Posee propiedades antibacteriales (Amadio, 2011), antifúngicas (Quiroga, 2011), antiparasitarias, antimicrobianas y antioxidantes (Arcila-Lozano, 2004). En el mundo se conocen diferentes variedades comerciales de orégano como el orégano del género *Origanum* como el *vulgare Hirtum* que pertenece a la familia *Lamiaceae* (Arcila-Lozano, 2004; Ariza, 2013; Avila-Ramos, 2012) y el género *Lippia* que pertenece a la familia *verbenaceae* (Cetingul, 2009).

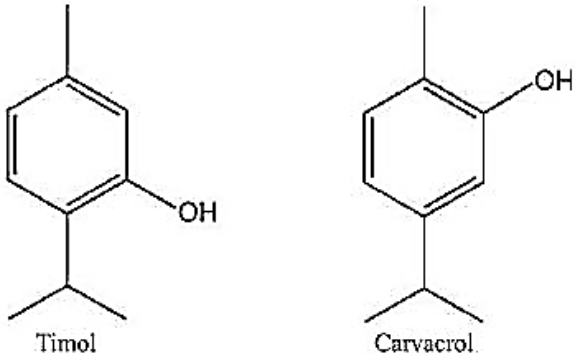
1.6.1 Orégano *L. origanoides* Kunth y su aceite esencial

El orégano del género *Lippia* es una de las plantas mayormente explotadas, incluye alrededor de 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños, la mayoría se encuentran distribuidos en la zona tropical africana (Amadio, 2011; Quiroga, 2011; Arcila-Lozano, 2004). En Colombia, se han caracterizado algunas zonas de distribución en los departamentos de la Guajira, Magdalena, Cauca y Nariño (Alto Patía), Cundinamarca, Norte de Santander y Santander en el Cañón del Chicamocha (Stashenko, 2010).

El AEO usualmente obtenido por arrastre con vapor, ha sido usado para la elaboración de perfumes, productos sanitarios, odontológicos, conservantes alimenticios, y en agricultura se ha introducido como un aditivo en la alimentación de pollos de engorde (Betancourt, 2012), peces (Rodríguez, 2011; Amadio, 2011) y en bovinos para la disminución en la producción y emisión de gases de efecto invernadero (Canbolat, et al., 2010; Mohamed, et al., 2012; Rodríguez Quiroz, 2014). En la suplementación de gallinas ponedoras aumenta la estabilidad lipídica de la yema de los huevos producidos, ha reducido significativamente la peroxidación lipídica durante el tiempo de almacenamiento (Mann, 2007; Mann, 2008; Mann & Mann, 2007).

El AEO comprende más de 40 componentes, la mayoría de los cuales son compuestos fenólicos. Los componentes principales del AEO son el timol [5-metil-2-(1-metiletil) fenol], y su isómero carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil) fenol] (Figura 1-4), los cuales dependiendo del método de extracción representan entre el 60 y el 76 % de la composición química total (Vásquez, 2011).

Figura 1-4: Estructura del timol y carvacrol.



En estudios recientes, se ha reportado que la capacidad antioxidante del AEO es comparable con la obtenida con los antioxidantes sintéticos BHT y BHA, dicha actividad se ha atribuido principalmente a su contenido de monoterpenos oxigenados (21). Sin embargo, los estudios acerca del uso de plantas aromáticas y sus productos extraídos en los sistemas de alimentación de gallinas ponedoras (*Gallus gallus Domesticus*) son pocos, principalmente se han reportado para sistemas de alimentación de codornices (*Coturnix coturnix Pharaoh*). Estas actividades de investigación se han centrado principalmente en evaluar los extractos de las hierbas de la familia *Labiatae* (Yesilbag, et al., 2013) que se han utilizado tradicionalmente para mejorar las características sensoriales y la vida útil de los alimentos (Christaki, et al., 2011). Los resultados de estos estudios principalmente han dado respuesta a los efectos del uso de los aceites esenciales de estas plantas, sobre variables de producción como el peso corporal del ave y la calidad del huevo (coloración de la yema, peso y masa del huevo). Sin embargo, los reportes sobre los efectos de estos aceites sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, la estabilidad oxidativa de los lípidos y los cambios proteómicos del huevo durante el tiempo de almacenamiento, no se han encontrado durante la revisión.

2. Hipótesis

La inclusión de MAEO en dietas enriquecidas con AGPI para ponedoras promueve la actividad antioxidante intrínseca en la yema de huevo protegiéndola de la oxidación natural y consecuentemente estabilizando proteínas y lípidos susceptibles durante el almacenamiento.

3. Objetivos

3.1 General

Evaluar el efecto del aceite esencial de Orégano *Lippia origanoides* Kunth sobre la estabilidad de lípidos y proteínas de la yema de huevo de gallinas suplementadas con ácidos grasos saturados y poliinsaturados.

3.2 Específicos

- Evaluar la presencia de compuestos antioxidantes provenientes del AEO en la yema de huevo y establecer su relación con indicadores de procesos oxidativos producidos durante el tiempo de almacenamiento.

- Identificar cambios en el perfil lipídico y proteico de la yema de huevo y establecer su asociación con la suplementación de AEO en la dieta de ponedoras y el tiempo de almacenamiento de los huevos.

4. Metodología

4.1 Evaluación de la adición de MAEO y Vitamina E en dietas suplementadas con AGPI y AGS sobre la estabilidad de lípidos y proteínas de la yema de huevo.

4.1.1 Animales y dieta

La suplementación se realizó en la unidad de Avicultura del Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica, ubicado en el kilómetro 14 vía Mosquera a una altitud de 2516 m.s.n.m., con un rango de temperatura entre 12 y 14 ºC.

Se usaron ciento veinte gallinas ponedoras de la estirpe *Babcock Brown* de 21 semanas de edad, las cuales fueron alojadas en jaulas de postura al azar para el suministro de los tratamientos. Las gallinas se distribuyeron cada cuatro gallinas, con un total de cinco unidades experimentales por tratamiento.

Los animales fueron alimentados diaria e individualmente durante 4 semanas con exactamente 120 g de una dieta basal (Tabla 4-1) enriquecida con AGPI o AGS provenientes de la inclusión de 2% de aceite de pescado o 2% de aceite de palma, respectivamente. El perfil de ácidos grasos de estos aceites se encuentra detallados en la Tabla 4-2. La dieta basal fue formulada según los requerimientos nutricionales de ponedoras en producción usando el *software User-Friendly Feed Formulation Program* (UFFDA) (Pesti, et al., 1992) y el suministro de agua durante el ensayo fue a voluntad del animal. Cabe mencionar que durante el periodo de experimentación, los animales se

manejaron siguiendo el protocolo y la normatividad del comité de ética de Corpoica, procurando su total comunidad y minimizando condiciones de estrés.

Tabla 4-1: Composición de la dieta basal

Ingrediente	(%) inclusión
Maíz	47,85
Glicerina cruda	0
Salvado de trigo	13,65
Soya cocida	12,00
Torta de soya	14,65
Aceite de palma	1,036
Sal	0,260
Bicarbonato de sodio	0,220
Carbonato de calcio	8,790
Fosfato tricálcico	0,810
Metionina MHA-84	0,300
L-Lisina HCl	0,00115
L- Treonina	0,044
Cloruro de Colina	0,070
Premezcla	0,300

En las dietas enriquecidas con AGPI se evaluó la inclusión de tres niveles de un producto micronizado que contenía 5% de aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth (MAEO) o vitamina E como agentes antioxidantes. La concentración de vitamina E fue 200 mg/kg de dieta (T3) y las concentraciones de MAEO fueron 250 mg/kg de dieta (T4), 500 mg/kg de dieta (T5), y 750 mg/kg de dieta (T6).

Tabla 4-2: Perfil de ácidos grasos en la dieta de ponedoras

		Aceite	
Ácido graso	**Número lipídico**	**Palma[1]**	**Pescado[2]**
Mirístico	C14:0	1.70	3.27
Palmítico	C16:0	29.89	18.98
Esteárico	C18:0	2.90	6.35
Oleico	C18:1	48.65	20.01
Linoleico	C18:2	12.34	3.62
Linolénico	C18:3	0.250	---
Araquidónico	C20:0	---	0.890
Lignocérico	C24:0	---	5.30
(DHA)	C22:6	---	36.96
AGS		34.79	34.49
AGMI		48.65	20.01
AGPI		12.59	40.58
No identificados		4.27	4.71

[1] Fuente de ácidos grasos saturados; [2] Fuente de ácidos grasos poliinsaturados.

4.1.2 Micronizado de aceite esencial de orégano

El aceite esencial (AE) que se utilizó en este trabajo fue extraído a partir de orégano *L. origanoides* cultivado bajo condiciones de cubierta en el Centro de Investigación Tibaitatá, la extracción del AE se realizó usando arrastre con vapor (Vásquez, 2011). El AEO fue micronizado[3] por la empresa Ralco Animal Health (www.ralcoanimalhealth.com) a una concentración del principio activo del 5%. El análisis de composición se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) en el laboratorio de cromatografía de la Universidad de industrial de Santander. La composición química

[3] La micronización permitió un aumento de la superficie del sólido. El tamaño de partícula contribuyó a la homogeneidad y a la obtención cuantitativa máxima del principio activo.

del AEO se presenta en el Anexo A, Tabla 8-1, que corresponde a 44 compuestos: 2.4% correspondientes a hidrocarburos monoterpenicos, principalmente α-pineno y β-mirceno; monoterpenos oxigenados (70,9%) siendo el timol el componente mayoritario (69,0%); hidrocarburos sesquiterpénicos (8,9%) como el α-Humuleno (2,1%) y trans-β-Cariofileno (3,8%) mientras que los sesquiterpenos oxigenados (0,6%) tuvieron el menor porcentaje de abundancia. Los componentes que no se lograron identificar constituyeron solo el 1%.

4.1.3 Recolección y preparación de huevos

Al finalizar la suplementación de cuatro semanas se recolectaron 4 huevos por unidad experimental, para un total de 20 huevos por tratamiento, de los cuales 10 huevos se almacenaron sin romper a 4°C por 60 días; los restantes se procesaron inmediatamente y tomados como tiempo cero de los variables a evaluar en los ensayos de estabilidad en la yema. Para los análisis se unificaron y homogenizaron manualmente dos yemas de cada tratamiento para un total de 5 réplicas.

Para la obtención de la yema, los huevos se quebraron y separaron en yema y clara utilizando un separador plástico (Figura 4-1); y continuando con un proceso limpieza de los otros componentes.

Figura 4-1: Separación y homogenización de yemas

La yema se depositó sobre un papel filtro Whatman #1 (Whatman Inc., Maidstone, UK) y con movimientos suaves se retiraron los residuos de clara de huevo. Posteriormente, se lavó la yema con agua destilada desionizada (H_2O D.D.) para retirar impurezas y se

depositó en una bolsa resellable debidamente pesada e identificada. Las yemas se congelaron a -20 ± 2 °C durante 24 horas y luego, se sometieron a liofilización en el equipo *CleanVac 8 Vacuum freeze dryer (Hanil bio medical laboratory)* luego, las muestras se almacenaron a -20ºC hasta el momento de realizar los análisis. Al finalizar el tiempo de 60 días de almacenamiento de los huevos se aplicó el mismo procedimiento descrito para huevos frescos. Los pesos secos de las yemas se registraron para evaluar el porcentaje de humedad de las muestras.

Ecuación 4-1

$$\%\, Humedad = \frac{Homogenizado\ de\ yema\ seca\ (g)}{Homogenizado\ de\ yema\ humeda\ (g)} \times 100$$

4.1.4 Diseño experimental

El ensayo animal evaluó seis tratamientos: **T1:** dieta basal + AGS; **T2:** dieta basal + AGPI; **T3:** dieta basal + AGPI + 200 ppm de Vitamina E; **T4:** dieta basal + AGPI + 250 ppm de MAEO; **T5:** dieta basal + AGPI + 500 ppm de MAEO y **T6:** dieta basal + AGPI + 750 ppm de MAEO. Los datos se analizaron bajo un diseño completo al azar con comparación de medias por contrastes ortogonales.

El modelo estadístico incluye los efectos fijos de tipo de aceite, antioxidante, tiempo de almacenamiento del huevo y sus interacciones:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + (\beta\tau)_{jk} + (\alpha\beta\tau)_{ijk} + \theta_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde μ es la media general, α_i es el efecto de inclusión de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta i= 2; β_j es el efecto del antioxidante j= 4; τ_k es el efecto del tiempo de almacenamiento k=2 $(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\tau)_{ik}$, $(\beta\tau)_{jk}$,$(\alpha\beta\tau)_{ijk}$; son las interacciones de los efectos; l = 5 son el número de réplicas, θ_{ij} es el factor de ablocamiento y e_{ijk} es el error experimental.

4.2 Cuantificación de timol en la yema de huevo

Se pesaron 500 mg de yema liofilizada y se homogenizaron con 5 mL de una mezcla de acetonitrilo (ACN) y agua en proporción 40:60, respectivamente. Se sometió a ultrasonido por 10 minutos y se centrifugó a 6000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se usó para el procedimiento de extracción.

La recuperación de timol se realizó usando columnas de polipropileno para extracción en fase sólida marca CHROMAbONd® de C18ec de 500 mg de adsorbente /6 mL de reservorio. Las columnas se pusieron sobre un colector de vacío de 12 válvulas y se acondicionaron con 5 mL de metanol (grado HPLC, Merck) seguido por 10 mL de H_2O D.D. El sobrenadante de la extracción se adicionó a la columna, las impurezas se lavaron usando 10 mL de H_2O D.D. hasta que cesó el goteo. Los terpenos se eluyeron lentamente con 1 mL de acetato de etilo (grado HPLC, Aldrich, USA) y el eluido se congeló por dos horas a -20°C para remover la fase acuosa. La fase de acetato de etilo se decantó en un tubo de centrifuga para la evaporación completa del solvente y el sólido se solubilizó con 500 µL de una mezcla de ACN: H_2O (80:20) para su inyección en HPLC. La cuantificación de timol se realizó con el método de estándar externo bajo las condiciones de análisis publicadas por Hajimehdipoor *et al*, 2010 con algunas modificaciones (Hajimehdipoor, et al., 2010).

Las condiciones del análisis fueron una fase móvil isocrática compuesta de ACN: H_2O (50:50), flujo de 1 mL/min, volumen de inyección para las muestras y soluciones estándares de 10 µL. La temperatura del horno se estableció en 30°C y la presión de la bomba fue de 138 kg*f/cm^2. El análisis cromatográfico se hizo en un equipo C-R4A, marca Shimadzu, modelo LC-6A, horno CTO-6A y automuestreador SCL-6B. Se usó una columna Phenomenex de C18 con dimensiones de 4,6 x 250 mm, 5µm y la lámpara de UV a una longitud de onda de 274 nm. El tiempo de retención para timol se estableció a los 17,88 minutos. La curva de calibración se preparó con un intervalo de concentraciones desde 0,1 – 1 µg/mL (Anexo B, Tabla 8-2) y los resultados se expresan en ng de timol/g de yema liofilizada.

4.3 Estabilidad de lípidos de la yema de huevo durante el almacenamiento

El análisis del perfil de ácidos grasos de la yema de huevo se realizó mediante cromatografía de gases a partir del extracto etéreo (EE) de acuerdo con los protocolos del Laboratorio de Nutrición Animal. La cuantificación del MDA se usó como un indicador de la degradación lipídica producto de la oxidación en las muestras de yema de huevo.

4.3.1 Cuantificación del contenido de malondialdehído en yema de huevo

La estabilidad oxidativa de las yemas se evaluó en 1 g de yema liofilizada mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico siguiendo el procedimiento descrito por Botsoglou, 1994 (Botsoglou, et al., 1994). La concentración de malondialdehído se cuantificó por triplicado y se extrapoló de una curva estándar construida en un intervalo de concentraciones de 10 a 90 ng de MDA/mL (Anexo C, Tabla 8-3). Los resultados se expresan como mg de MDA/kg de yema liofilizada.

4.3.2 Perfil de ácidos grasos de la yema de huevo

El EE de la yema de huevo se obtuvo usando un digestor de ácidos grasos Foss (*Foss Soxtec* TM 2050). La extracción con éter etílico se realizó a partir de 1 g de yema liofilizada durante 4 horas. Al finalizar, se realizó la recuperación del éter y la muestra se llevó a peso constante, permitiendo la determinación del extracto etéreo por pesaje (ecuación 4-2):

Ecuación 4-2

$$EE(\%) = \frac{Peso\ grasa\ extraída(g)}{Peso\ yema\ de\ huevo(g)} \times 100$$

El EE de yema de huevo se solubilizó completamente con 900 µL de diclorometano. Los ácidos grasos se derivatizaron a sus metil esteres usando el producto comercial *Meth-Prep™ II*[4] *GRACE Davidson Discovery Science* (Catálogo: 18007 *Batch* # 1404250001). La separación de los ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatográfo de gases marca *Shimadzu* modelo GC-2014 usando una columna capilar de ácido nitrotereftálico modificado con glicol polietileno marca Zebron™ ZB-FFAP de 30 m x 0,25 mm, 0,2 µm (# Catalogo 7HG-G009-11). El volumen de inyección fue 2 µL y las condiciones del análisis fueron: Nitrógeno de alta pureza (N_2) como gas de arrastre a un flujo de 15 mL/min, horno con rampa de temperatura desde 80 ºC hasta 220 ºC y un detector de ionización de llama a temperatura de 220 ºC.

La cuantificación se realizó con el método de normalización de área usando el tiempo de retención absoluto para su identificación. Los tiempos de retención se compararon con los tiempos de retención identificados en el estándar de ácidos grasos (O*il Rapeseed – 07456, Sigma Aldrich*) presentados en la Tabla 4-3 La ventana de identificación se ajustó al 3 % y el *software* usado para la integración de los picos de retención fue *Labsolutions GCsolutions* versión 2.32.00.

El método de normalización de área permitió establecer el porcentaje de cada ácido graso en la muestra. Los resultados se calcularon dividiendo el valor del área bajo la curva de cada ácido graso entre la sumatoria de las áreas integradas multiplicando por 100.

$$\%\ X\ \acute{a}cido\ graso = (\frac{A_X}{\Sigma_i A_i}) \times 100$$

[4] *Meth-Prep™ II* es una solución metanólica al 0,2 N de hidróxido de m-trifluorometilfenil trimetilamonio. Este es un reactivo de un solo paso que simplifica la transesterificación de triglicéridos y ácidos grasos a metil esteres. Este reactivo es más rápido que el metóxido de sodio y la reacción ocurre a temperatura ambiente. La reacción cuantitativa no requiere de extracciones o tratamientos adicionales previos al análisis de cromatografía de gases (GRACE - Discovery Sciences, 2015).

Donde, A_X es el área de pico del ácido graso X y $\Sigma_i A_i$ en el denominador corresponde a la suma de todas las áreas. Los resultados se relacionaron como porcentaje de AGS, AGM, AGP y AGI/AGS. Los AGI son iguales a la suma de los AGM y AGP.

Tabla 4-3: Tiempos de retención cromatográficos para estándar de ácidos grasos *oil Rapeseed – 07456*

Ácido graso	**Número lipídico**	**T_R[1]**	**Tipo**
Mirístico	C14:0	9.115	
Palmítico	C16:0	10.74	
Esteárico	C18:0	13.109	
Oleico	C18:1	13.886	
Linóleico	C18:2	15.006	Esencial
Araquídico	C20:0	16.203	Esencial
α-linolénico	C18:3	16.661	Esencial
Eicosenoico	C20:1 n-9	16.818	Esencial
9 cis 11 trans	C18:2	17.109	
10 trans 12 cis	C18:2	17.395	
9 trans 11 trans	C18:2	18.044	
Behénico	C22:0	19.604	
Erucico	C22:1	20.553	
Tricosanoico	C23:0	21.784	
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	C20:5	22.319	Esencial
Lignocérico	C24:0	24.454	
Ácido docosahexaenoico (DHA)	C22:6	29,325	Esencial

[1] Tiempo de retención en minutos.

4.4 Estabilidad de proteínas de la yema de huevo durante el almacenamiento

4.4.1 Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes de la yema de huevo

La actividad enzimática SOD, CAT y GSH-Px de las yemas de huevo obtenidas con la suplementación de MAEO de las gallinas ponedoras, se evaluaron y compararon con las actividades de las yemas no suplementadas (T1 y T2) y suplementadas con vitamina E.

Las actividades SOD y CAT se midieron en extractos enzimáticos obtenidos con el procedimiento de Wawrzykowski *et al*., 2011 con algunas modificaciones (Wawrzykowski & Kankofer, 2011). Los extractos se obtuvieron a partir de 375 mg de yema liofilizada hidratada inicialmente con NaCl al 0,9% durante 30 minutos a 4ºC y luego, con una mezcla de etanol y cloroformo (37,5:62,5); se mezcló por inversión 5 veces, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se usó para la cuantificación de proteína y para los ensayos de actividad enzimática.

Los extractos enzimáticos usados para la medición de la actividad GSH-Px se obtuvieron pesando 200 mg de yema de huevo liofilizada, a los cuales se adicionó 350µL de *buffer* de glutatión peroxidasa (GPx1) marca Sigma Catálogo G8664 (Tris HCl 50 mM, pH 8.0 y EDTA 0,5 mM) a 4°C. Se homogenizó la mezcla anterior por inversión tres veces y luego, se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró y se guardó.

Posteriormente, se realizó una segunda extracción a partir del precipitado obtenido usando 100 µL de *b*uffer GPx1, se homogenizó la mezcla anterior usando vórtex suave por 10

segundos y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se colectaron, se mezclaron por inversión 3 veces y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El extracto obtenido se usó inmediatamente para el análisis de actividad GSH-Px sin ninguna dilución. Sin embargo, para cuantificar la proteína (Anexo D, Tabla 8-6) se realizó una dilución de 1:19 y se detectó con el reactivo Pierce™ 660nm Protein Assay (Thermo Scientific™ Catálogo 22660).

- **Superóxido dismutasa**

La actividad SOD se midió según el procedimiento de Ishiyama, 1995 (Ishiyama, et al., 1995) usando el estuche #19169 marca Fluka (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones de fabricación. Los estándares de SOD se prepararon en un intervalo de concentraciones de 0,001 – 200 U/mL y se usaron para correlacionar la concentración [U/mL] con el porcentaje de inhibición (Anexo D, Tabla 8-4). La actividad SOD en las yemas de huevo se expresó en U/mg de proteína. La unidad de superóxido dismutasa corresponde a la tasa de reducción de O_2^- que se relaciona linealmente con la actividad de la xantina oxidasa (XO) y es inhibida por la SOD.

- **Catalasa**

La actividad CAT se determinó colorimétricamente acorde al procedimiento descrito por Fossati *et al*., 1980 (Fossati, et al., 1980) y Ogura *et al*., 1983 (Ogura & Yamazaki, 1983) siguiendo la descomposición del H_2O_2 a 25 °C a una longitud de onda de 520 nm. La cuantificación de la actividad se realizó usando el estuche # CAT100 marca Sigma-Aldrich de acuerdo con las instrucciones dadas por el fabricante. La actividad catalasa se calculó usando una curva estándar de H_2O_2 con un intervalo de 0.0128 – 0.0750 µmoles de H_2O_2 (Anexo D, Tabla 8-5). Cada extracto enzimático se cuantificó 3 veces y los resultados se expresan como U de CAT/mg de proteína en extracto. Una unidad de catalasa corresponde a la descomposición de 1 µmol de H_2O_2 a O_2 y H_2O por minuto a pH 7.0 a 25°C en una concentración de sustrato de 50 mM de H_2O_2.

- **Glutatión peroxidasa**

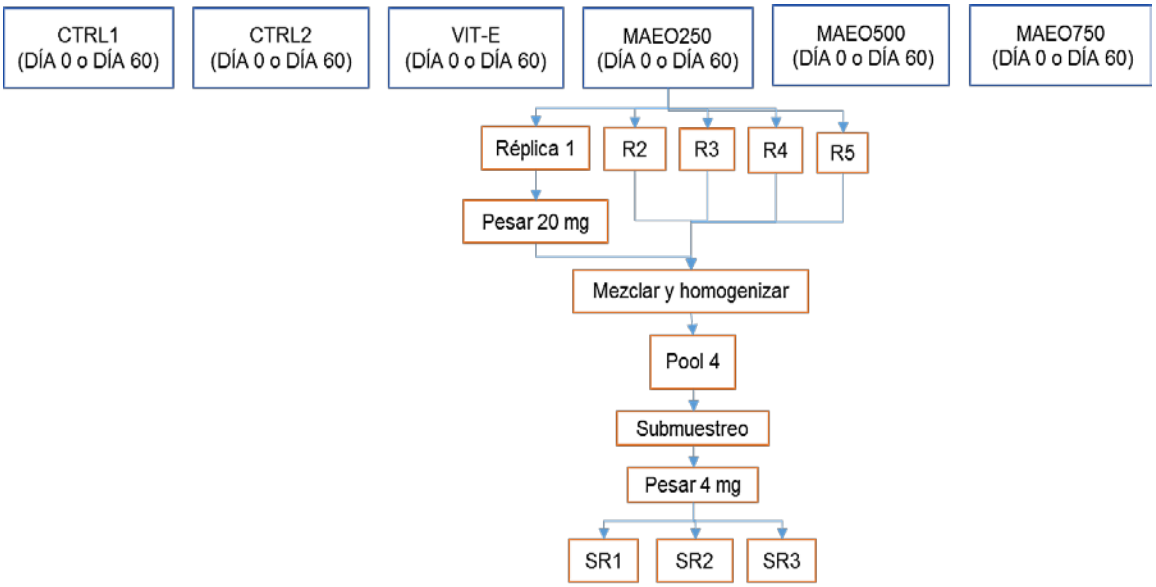
La actividad glutatión peroxidasa se cuantificó usando el estuche # CGP1 marca Sigma-Aldrich en los extractos enzimáticos de yema de huevo liofilizada siguiendo el método indirecto propuesto por Carmagnol, 1983 (Carmagnol, et al., 1983) y Thomson, 1989 (Thomson, et al., 1989). El método sigue el decrecimiento en la absorbancia del NADPH a 340 nm en intervalos de 10 segundos durante 2 minutos. Los datos se procesaron con el *software Gen5* versión 1.04.5. Los cambios en la pendiente de absorbancia se convirtieron en unidades de GSH-Px/ mg de proteína usando el coeficiente de extinción molar del β-NADPH de 6.22mM^{-1}.

La unidad de actividad GSH-Px (U) causa la formación de 1 µmol de $NADP^+$ a partir de NADPH/minuto a un pH de 8.0 y 25°C en una reacción acoplada en presencia de glutatión reducido, glutatión reductasa y *tert*-butil hidroperóxido. El blanco, control positivo de GSH-Px y las muestras de extractos de yema de huevo se cuantificaron por triplicado.

4.4.2 Evaluación del perfil de proteínas de la yema de huevo

Se pesaron 20 mg de yema de huevo liofilizada de cada réplica biológica por tratamiento (5 réplicas), y se mezclaron en un tubo de centrifuga de 1,5 mL obteniéndose un *pool* de yema por cada tratamiento. Los *pools* se mezclaron en seco en vórtex para conseguir mayor homogeneidad y se realizó un submuestreo a partir de los *pools*. Se pesaron 4 mg de yema liofilizada por cada tratamiento y en total se pesaron 3 réplicas (Figura 4-2). El número final de muestras fue 36.

Figura 4-2: Diagrama de submuestreo para la obtención y análisis de proteínas de la yema de huevo.



R: Réplica biológica de la yema de huevo.

SR: Sub-réplica de la yema de huevo.

- **Precipitación y purificación de proteínas de la yema de huevo**

La yema de huevo contiene además de proteínas, moléculas como ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, las cuales pueden dificultar el proceso de migración de las proteínas durante el isoelectroenfoque, así como también puede presentar interferencias con los métodos de tinción de geles. Por esta razón, se han establecido metodologías para el tratamiento de este tipo de muestras que permiten la eliminación de estos contaminantes. En este caso, se realizó extracción de proteínas en presencia de etanol/cloroformo (Wawrzykowski & Kankofer, 2011).

Brevemente, se pesaron 4 mg de yema liofilizada y se le adicionaron 80 µL de agua D.D. para rehidratación durante 2 horas a 4°C, luego, se adicionaron 120 µL de una mezcla etanol-cloroformo frío (37,5:62,5), se agitó por inversión tres veces y se centrifugó la mezcla a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó. Al *pellet* se le

adicionaron 60 µL de etanol frío (- 20°C) y se agitó por inversión 3 veces, luego se centrifugó durante 30 minutos a 14000 rpm a 4°C y se repitió el procedimiento con etanol dos veces más. Por último, el *pellet* se dejó secar al aire y se solubilizó con 400 µL de un *buffer* que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2%, anfolitos *Bio-Lyte* de pH 3-10 al 0,2%. Las muestras se mantuvieron en baño de hielo para evitar la degradación de la proteína.

- **Cuantificación de proteínas en extractos proteicos de la yema de huevo**

Cada extracto proteico obtenido se cuantificó por triplicado usando el estuche de proteína 660nm de Pierce (Pierce™, Thermo Scientific™, Catálogo 22660). Los extractos se diluyeron 1:2 usando un *buffer* de urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2%, anfolitos *Bio-Lyte* de pH 3-10 al 0,2%. La absorbancia a 660 nm se extrapoló a una curva de estándares de Albúmina Sérica Bovina (ASB) con un intervalo de concentraciones de 50 a 1500 µg/mL (Anexo D, Tabla 8-7). Los resultados se expresan en µg de proteína en extracto.

- **Electroforesis unidimensional SDS-PAGE**

De acuerdo a los protocolos de trabajo del Grupo de Investigación en Hormonas, se prepararon geles de separación de poliacrilamida al 10 %, y geles de concentración al 4 % de poliacrilamida, usando el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad®). En todos los geles se mantuvo una concentración de dodecilsulfato sódico (SDS) de 0,1%. Se tomaron 25 µg de proteína de yema de huevo y se trataron con *buffer Laemmli* (Glicerol al 10%, SDS al 2%, Tris-HCl 60 mM, β-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,01%), se sometieron a choque térmico haciendo un calentamiento a ebullición durante 5 minutos e inmediatamente después se sumergieron las muestras en un baño de hielo. El *buffer Laemmli* y el tratamiento térmico se aplicaron con el fin de asegurar la reducción y desnaturalización de las proteínas presentes.

Se cargaron 25 µg de proteína en cada pozo del gel y se empleó un marcador de peso molecular de rango amplio, sin teñir marca Thermo Scientific™ Catálogo 26630. Los geles se pusieron en la cámara de electroforesis, se sumergieron en el *buffer* de corrida (Tris base 25 mM, Glicina 0,19 M y SDS al 0,1%) y se separaron usando gradiente de voltaje

80 V/40 minutos, 100 V por una hora y 120 V hasta finalizar la corrida (aproximadamente 55 minutos). El *buffer* se mantuvo en agitación y refrigeración durante todo el tiempo de corrida.

- **Electroforesis bidimensional**

Isoelectroenfoque

La primera dimensión se realizó en tiras secas de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de rango amplio (7 cm, pH lineal 3-10 de Bio-Rad®) usando el dispositivo PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad®). La separación en este formato se llevó a cabo utilizando 100 µg de proteína, los cuales se diluyeron en un *buffer* que contenía Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS al 2%, anfolitos de pH 3-10 al 0,2%, DTT 40 mM y azul de bromofenol al 0,01%.

La solubilización de las proteínas en el *buffer* se realizó por incubación de aproximadamente 30 minutos con agitación ocasional. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 1 minuto a 4°C, con el fin de separar cualquier residuo sólido que pudiera interferir con el proceso de hidratación de las tiras y con la migración de las proteínas a través de la misma durante el proceso de enfoque.

La muestra se sembró en cada uno de los carriles seleccionados de la cámara de focalización, y se puso en contacto con el gel de la tira. La rehidratación pasiva de la tira se permitió por espacio de 1 hora a temperatura ambiente. La rehidratación activa duró 11 horas a 50 V en un focalizador marca Bio-Rad®. El isoelectroenfoque de las tiras se llevó a cabo con los siguientes gradientes de voltaje: Una rampa rápida de voltaje donde el mismo fue incrementado de 200 a 4000 V por un periodo de 5 horas. Estos pasos se siguieron por un paso final de enfoque en el cual se programaron 10000 Vh y después un descenso rápido de voltaje desde 4000 hasta 500 V. Una vez se completó el paso final de enfoque, las tiras IPG se almacenaron a - 70 °C hasta el momento de realizar la segunda dimensión.

Segunda dimensión

Antes de la incorporación de las tiras IPG sobre los geles de SDS-PAGE para la segunda dimensión de la separación, las tiras se sometieron a una fase de equilibrio. Las tiras se incubaron en una solución de urea 6 M, SDS al 2%, 0,375 M de Tris-HCl, pH 8,8, glicerol al 20%, y 130 mM de DTT, con agitación suave a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, las tiras se equilibraron una vez más en una solución que contenía urea 6M, SDS al 2%, 0,375 M de Tris-HCl, pH 8,8, 20% de glicerol y 135 mM de yodoacetamida, con agitación suave a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Al terminar los pasos de equilibrio, las tiras de IPG se incrustaron encima del gel de separación de poliacrilamida y se selló con una solución de agarosa fundida al 1% (SDS 0,1%, azul de bromofenol 0,01%, Tris base 25 mM, glicina 0,19 M). El gel SDS-PAGE para la separación en segunda dimensión se preparó al 10 % de poliacrilamida con 1 mm de espesor. Al igual que en la electroforesis unidimensional, se usó la cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad®), las condiciones de corrida fueron: 80 V/ 40 minutos, 100 V por una hora y 120 V hasta finalizar la corrida (aproximadamente 55 minutos). Para todos los geles se usaron 5 µL de marcador de peso molecular sin preteñir de rango amplio marca Thermo Scientific ® #26630.

- **Tinción de geles**

Los geles obtenidos se tiñeron con azul de *coomassie* coloidal (G-250). El procedimiento consistió de una incubación con una solución acuosa con etanol al 50% y ácido fosfórico al 2% durante 3 horas. La incubación del gel es un proceso en el cual se permitió la fijación de las proteínas al gel. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados sucesivos con 20 mL de agua destilada y desionizada por 15 minutos cada uno. Luego, se realizó un acondicionamiento de los geles haciendo una incubación por 1 hora con 20 mL de una solución acuosa con metanol al 18%, ácido fosfórico al 2 % y sulfato de amonio al 15 %.
Finalmente, a esta solución se le adicionaron 200 µL de una solución de azul de *coomassie* G-250 al 2% en etanol y se puso en agitación suave durante 96 horas. El exceso de colorante se retiró mediante lavados sucesivos con H_2O D.D.

- **Análisis de imágenes**

Las imágenes de los geles bidimensionales se obtuvieron usando el fotodocumentador de geles VersaDoc (Bio-Rad®), se tomaron en escala de grises con una resolución de 512 dpi y luego, se ajustó la resolución entre 150 y 300 dpi para ser aceptados por el programa de análisis comparativo Melanie 7.0 de GENEBIO (Bioinformatics, Swiss Institute for Bioinformatics and Genebio- Geneva, 2008).

Las imágenes se cargaron al programa y se recortaron con la misma área. Posteriormente, se asignaron a un proyecto llamado Antioxidantes en huevo, el cual contenía todas las imágenes y almacenaba toda la información relacionada con el análisis de los geles. En el proyecto, se crearon carpetas o jerarquías que representaban los distintos tratamientos del estudio y dentro de cada una de estas jerarquías se almacenaron las 3 imágenes correspondientes a las muestras de la misma condición biológica (Figura 4-3).

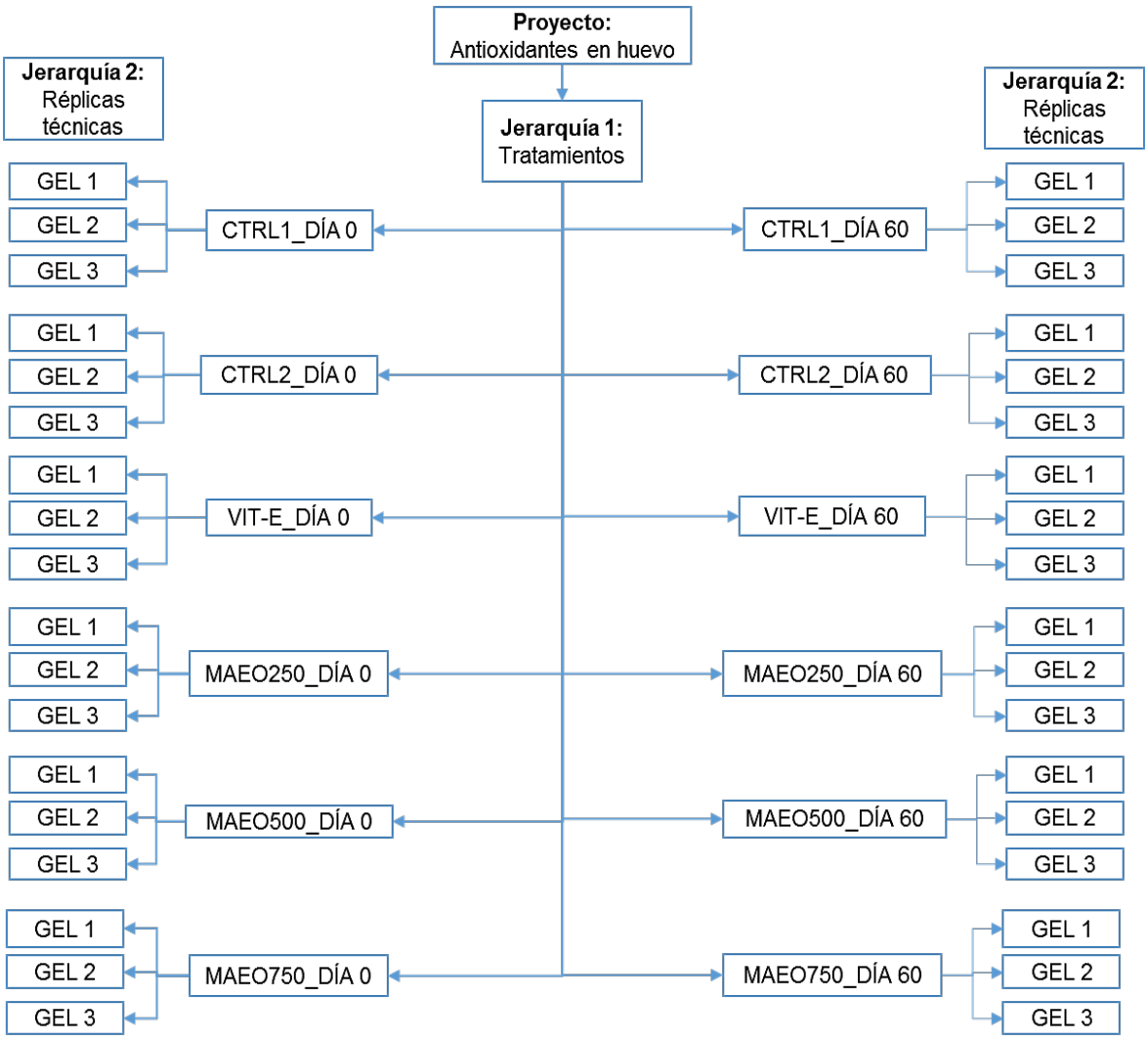
Posteriormente, se realizó el proceso de detección de *spots* de acuerdo a los parámetros establecidos por el programa, los cuales se ajustaron para permitir detectar todos los *spots* verdaderos, y descartar interferentes (falsos *spots*) como burbujas y residuos de *coomassie* coloidal. Los parámetros determinados se aplicaron para todos los geles analizados.

Una vez realizada la detección de los *spots* en todos los geles, se escogió la imagen con el mejor patrón de separación y el mayor número de *spots* detectados como imagen de referencia para cada grupo, y se estableció un *spot* de referencia o *landmark* presente en todas las imágenes de las muestras con el fin de fijar su posición durante el emparejamiento y así mismo, facilitar el alineamiento entre las réplicas y tratamientos.

Por último, se realizó el emparejamiento automático entre los geles de cada tratamiento o jerarquía, allí cada *spot* se alineo con sus semejantes en todos los geles, luego, se realizó una curación manual con el fin de eliminar *spots* falsos restantes y corregir emparejamiento

incorrecto. Al finalizar el procedimiento anterior, todas las imágenes se emparejaron entre sí, sin tener en cuenta el tratamiento.

Figura 4-3: Jerarquías para el análisis de imágenes por Melanie 7.0.



4.5 Análisis estadístico

Los resultados de los análisis en las yemas de los huevos frescos (día 0) se usaron como covariable para ajustar las diferencias iniciales entre tratamientos. El análisis de varianza para el efecto del tipo de aceite en la dieta y la suplementación con antioxidantes (Vitamina E o MAEO) sobre las variables respuesta (porcentaje de humedad, presencia de timol, actividad de las enzimas antioxidantes, porcentaje de extracto etéreo (%EE), composición de ácidos grasos (ΣAGS, ΣAGMI, ΣAGPI y ΣAGI/AGS), y la concentración de MDA como indicador de peroxidación lipídica en la yema de huevo).

Los resultados se analizaron bajo un diseño completo al azar y la comparación de medias se realizó mediante contrastes ortogonales con el objetivo de determinar las diferencias por efecto del tipo de aceite incluido en la dieta, tipo y nivel de antioxidantes suplementados. Los contrastes evaluados se describen en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4: Diseño de comparaciones planeadas entre tratamientos.

Contraste	Tratamientos
1	Dieta con aceite de palma sin suplementar vs. Dietas con aceite de pescado con y sin suplemento
2	Dieta con aceite de pescado sin suplementar vs. Dietas con aceite de pescado con antioxidante
3	Dieta con aceite de pescado + Vitamina E vs. Dieta con aceite de pescado + MAEO
4	Tendencia lineal por suplementación con MAEO en las dietas con aceite de pescado
5	Tendencia cuadrática por suplementación con MAEO en las dietas con aceite de pescado

Los análisis se realizaron en el paquete estadístico SAS/STAT® versión 9.3 en la plataforma Windows, mediante el programa GLIMMIX. El modelo empleado fue

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + Cov_{ij} + e_{ij}$$

$y_{ij} = corresponde\ a\ las\ variables\ respuesta$
$\mu = media\ general$
$\tau_i = efecto\ del\ tipo\ de\ aceite\ o\ la\ suplementación\ con\ antioxidante$
$Cov_{ij} = Ajuste\ por\ covariable\ de\ los\ datos\ analizados\ en\ el\ día\ 0\ de\ almacenamiento$
$e_{ij} = error\ experimental$

La comparación de medias de los tratamientos experimentales en cada una de las variables respuesta se realizó considerando el almacenamiento cero como covariable. La salida ajustada con los contrastes referenciados y la comparación de los tratamientos sobre las diferencias en tiempo de almacenamiento (día 0 – día 60) se realizó mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P<0.05$). El coeficiente de correlación de Pearson se calculó usando Microsoft Excel para determinar la correlación entre las medias de las variables respuesta evaluadas en las yemas de huevos del tratamiento control con aceite de pescado y los tratamientos estudio que se suplementaron con MAEO.

4.5.1 Análisis de geles bidimensionales

Los cambios en la expresión de las proteínas de la yema de huevo se determinaron mediante la comparación de los valores de cada *spot* (intensidad, volumen y/o área), con sus contrapartes en otros geles, buscando cambios significativos entre las poblaciones a los que estos pertenecen (análisis de clases) y la descripción en un *set* de geles sin importar las poblaciones (análisis de geles). La descripción e identificación de las diferencias en la expresión proteica se llevaron a cabo mediante la comparación de tratamientos presentados en la Tabla 4-4.

La reproducibilidad de los geles se evaluó por medio de las herramientas estadísticas proporcionadas por el *software*. Se usó el análisis factorial para determinar la correlación

entre las imágenes analizadas y establecer poblaciones. La identificación de los *spots* que presentaron diferencias de expresión entre los grupos (clases) se logró de acuerdo al análisis estadístico de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar) de la intensidad, el volumen y el área de cada *spot* (*Fold*).

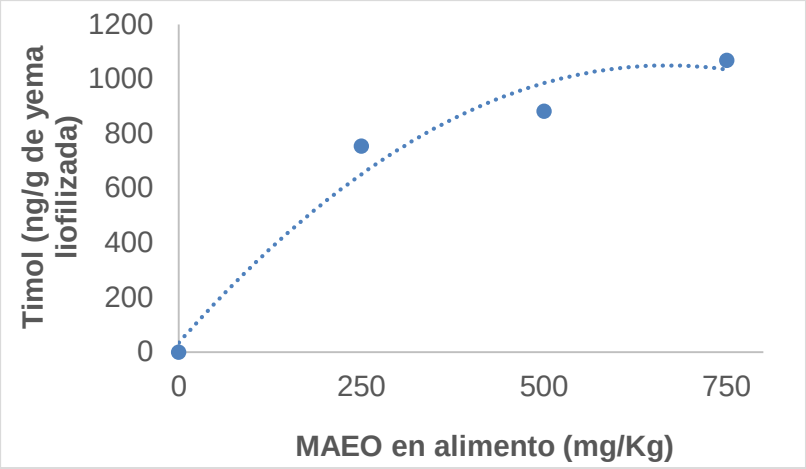
El *fold* mostró las diferencias en magnitud y esta medida se estableció como significativa cuando fue mayor a 2. Luego, se usó como segundo parámetro de selección el análisis de la varianza (ANOVA) para probabilidades menores a 0.01. El último criterio de selección fue el test estadístico de Kolmogorov- Smirnov con un nivel de significancia α de 0.01, D>0,61661.

5. Resultados y discusión

5.1 La suplementación con micronizado de aceite esencial de orégano produce huevos con antioxidante

El análisis de timol en la yema de huevo se realizó con el fin de identificar y cuantificar compuestos provenientes del MAEO que se hayan depositado en la yema de huevo después del tiempo de suplementación de las gallinas ponedoras. Los resultados mostraron que la presencia de timol en la yema fue dependiente de la suplementación con MAEO (P<0,01), y que su concentración en la yema aumentó con una tendencia de tipo cuadrática (P<0.0001) a medida que la concentración de MAEO aumentó en la dieta (Figura 5-1).

Figura 5-1: Contenido de timol en la yema de huevo.



Cuadrática y = - 0,0023x^2 + 3,0353x + 34,168; R^2 = 0,9646; P<0.0001;

X= Concentración de MAEO incluida en la dieta

Estos resultados son acordes a lo reportado por Krause y Ternes, 1999 quienes lograron identificar y cuantificar compuestos transferidos a la yema de huevo durante un periodo de suplementación de gallinas ponedoras con extracto de tomillo. El *p*-cimeno-2,3-diol y el timol mostraron un incremento en la concentración durante los primeros 12 días de alimentación, luego, las concentraciones de estos compuestos se estabilizaron en la yema de huevo. En el estudio se reportó que las concentraciones de *p*-cimeno-2,3-diol y timol fueron dependientes de la concentración de extracto de tomillo que se suministró con la dieta basal, ya que, cuantificaron concentraciones de 65,8 ng/g y 483 ng/g de yema de huevo para las adiciones de 50 mg de *p*-cimeno-2,3-diol y de 224 mg timol por cada 100 g de dieta basal, respectivamente. Mientras, la concentración fue de 103 ng de *p*-cimeno-2,3-diol /g y 667 timol ng/g de yema para las adiciones de 75 mg p-cymene-2,3-diol y 336 mg timol en 100 g de dieta basal, respectivamente (Krause & Ternes, 1999). Los resultados de esta investigación mostraron que el AEO y sus componentes tienen un comportamiento similar, y que al aumentar la dosis de MAEO en la dieta de las ponedoras, se incrementan las concentraciones de compuestos depositados en la yema de huevo, tal como se puede detallar en Tabla 5-1.

Respecto a los procesos fármaco-cinéticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los aceites esenciales, es necesario mencionar que la información es escasa o su acceso es limitado. Sin embargo, en algunos reportes se ha evaluado la cinética de absorción tras la administración oral de los aceites esenciales que contienen carvacrol, timol, eugenol y trans-cinamaldehído, estos han sido ensayados *in vitro* en tractos gastrointestinales (TGI) simulados al igual que de forma *in vivo* en cerdos (Michiels, et al., 2008). Dichos reportes han mostrado que los monoterpenos como el timol no se absorben significativamente en el estómago y el intestino delgado proximal, sino que, son absorbidos en parte en el segmento distal del TGI (Baltik Junior, 2015).

Cabe mencionar que dentro de la revisión bibliográfica realizada no se hallaron reportes relacionados al depósito del timol en la yema de huevo, por lo cual, se sugiere que debido a la naturaleza lipofílica de este compuesto, el transporte de este tipo de componentes desde el intestino (donde ocurre su absorción) hasta el hígado y otros tejidos podría estar relacionado o seguir una trayectoria similar a la vía exógena del transporte de los lípidos

(Forgaguera & Gómez, 2004). En donde, el timol se absorbe a través de los cilios de las membranas celulares de forma pasiva en los capilares del duodeno y la parte anterior del yeyuno, principalmente. En las células epiteliales del intestino, el timol se combina con fosfolípidos, colesterol, esteres de colesterol y apolipoproteínas formando portomicrones[5], que luego son transportados desde las venas pancreaticoduodenal y yeyunal hasta la vena porta para su distribución en los tejidos. El timol contenido en los portomicrones comienza su depósito en la yema cuando los folículos u óvulos se encuentran aún en el ovario, y su concentración incrementa tras la ovulación durante la incorporación del vitelo y todos los componentes de la yema como los gránulos y glóbulos de lipoproteínas (Toldrá & Nollet , 2013) dentro del infundíbulo de la gallina a la entrada del oviducto hasta completar la formación de la yema (Organización interprofesional del huevo y sus productos (INPROVO), 2015).

Se evaluaron las concentraciones de timol en las yemas de huevos almacenados, los resultados mostraron que el tiempo de almacenamiento produjo un decrecimiento en el contenido de timol con respecto a los encontrados en las yemas de huevos frescos, se observó una reducción del 14.63 %, 14.20 % y 20.72 % en los tratamientos T4, T5 y T6, respectivamente. Aunque, la reducción de los contenidos de timol en la yema de huevos almacenados no se ha reportado previamente, se propone que podría estar relacionada con un consumo del antioxidante por efecto de la inactivación de radicales libres y especies reactivas no radicales generadas durante el almacenamiento.

La yema en un huevo recién puesto es redonda y firme, conforme el huevo envejece la migración de agua a través de la membrana aumenta, lo cual incrementa su talla y causa un estiramiento y debilidad de la membrana vitelina, originando yemas aplanadas con apariencia moteada y disminuyendo la calidad interna del producto (Estrada, et al., 2010). Dicho proceso no se ha relacionado directamente con la presencia de radicales libres y especies reactivas, pero la presencia de estos podría estar relacionado con el aumento de la susceptibilidad de la membrana por el ataque sobre los lípidos de la membrana. Teniendo en cuenta esto, se evaluaron los efectos de la suplementación sobre los

[5] Portomicrón: Lipoproteína formada que entra en los vasos sanguíneos a través de las vesículas intracitoplásmaticas endoteliales.

porcentajes de humedad de las yemas de los huevos producidos tanto en fresco como luego del almacenamiento durante 60 días.

Tabla 5-1: Contenidos de timol obtenido después de la suplementación durante 4 semanas con MAEO.

	Timol (ng/g yema liofilizada)	
Tratamiento[1]	**(Día 0)**	**(Día 60)**
T4 (8620 ppb de timol/ 120g de alimento)	753.72	643.39
T5 (17250 ppb de timol/ 120 g de alimento)	882.21	756.86
T6 (25870 ppb de timol/ 120g de alimento)	1068.83	847.31
Valor-P	<0.0001	0.0027
ESM[2]	66.7626	50.4866
Contrastes		**Pr > ltl[3]**
T4 vs. T5		0.0051
T4 vs. T6		0.0008
T5 vs. T6		0.0035
Pescado MAEO lineal		<0.0001
Pescado MAEO cuadrático		<0.0001

[1] T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/Kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/Kg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/Kg de MAEO.
[2] Error estándar de la media.
[3] No significativo (NS), P>0.05

Los resultados mostraron que el porcentaje de humedad en la yema no se vio afectado por la dieta (P>0.05), en promedio la humedad de la yema fue de 51.11% (Tabla 5-2), lo cual estuvo ligeramente superior a los reportes de la literatura, ya que, se ha establecido que el porcentaje de humedad de las yemas de huevo puede variar entre el 48 al 50% según la edad de la gallina y el tiempo de preservación de los huevos (Huopalahti, et al., 2007).

Tabla 5-2: Efecto del nivel de inclusión de MAEO en la dieta sobre el porcentaje de humedad en la yema de huevo.

Tratamiento[1]	**% Humedad**
T1	50.9670
T2	50.6455
T3	51.8427
T4	50.7281
T5	50.7767
T6	51.7544
Valor-P	0.1775
ESM[2]	0,4293
Contrastes	**Pr > ltl[3]**
Palma S.S. vs. Pescado S.S	NS
Pescado S.S. vs. Pescado + Antioxidante	NS
Pescado vitamina E vs. Pescado MAEO	NS
Pescado MAEO lineal	NS
Pescado MAEO cuadrático	NS

[1] T1: Dieta basal con 2% aceite de palma, T2: Dieta basal con 2% de aceite de pescado, T3: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 200 mg/kg de vitamina E, T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/kg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/kg de MAEO.
[2] Error estándar de la media.
[3] No significativo (NS), P>0.05

De otro lado, al evaluar los efectos producidos por el tiempo sobre el porcentaje de humedad de las yemas de huevos, se encontró que el tiempo de almacenamiento produjo un aumento en los porcentajes de humedad en todos los tratamientos experimentales (Tabla 5-3). Se observaron aumentos significativos en los porcentajes de humedad de

todos los tratamientos, excepto con la suplementación de 500 ppm de MAEO (P>0.05). Estos resultados son coherentes con lo encontrado en la literatura, en donde se establece que la transferencia de agua desde la clara a la yema es un proceso que ocurre durante el almacenamiento de los huevos y es ocasionado por una disminución en la fuerza de la membrana vitelina (Huopalahti, et al., 2007).

El análisis de correlación entre los porcentajes de humedad de las yemas de huevos almacenados y la disminución en la concentración de timol en las mismas, mostró un valor de -0.5439, lo cual indica una dependencia negativa moderada entre las variables, que supone una relación inversamente proporcional, permitiendo establecer que al aumentar la concentración de timol en la dieta, el % de humedad disminuye en la misma proporción. Lo anterior sugiere que los lípidos que hacen parte de la membrana vitelina de la yema se ven menos afectados por el ataque de radicales libres y especies reactivas no radicales, debido a la presencia del timol, el cual, estabiliza este tipo de moléculas y evitar que se propague el daño durante el tiempo de almacenamiento. Como consecuencia la membrana vitelina seria menos lábil y se generaría una menor migración de agua a través de la misma (Estrada, et al., 2010).

Tabla 5-3: Cambios en el porcentaje de humedad de la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento.

Tratamiento[1]	Día	Estimador[2]	ESM[3]	Pr>t[4]
T1	0- 60	- 1.5109	0.6829	0.0367
T2	0- 60	- 2.1745	0.6829	0.0040
T3	0- 60	- 5.1084	0.6829	<0.0001
T4	0- 60	- 4.1873	0.6829	<0.0001
T5	0- 60	- 1.3033	0.6829	NS
T6	0- 60	- 4.4652	0.6829	<0.0001

[1] T1: Dieta basal con 2% aceite de palma, T2: Dieta basal con 2% de aceite de pescado, T3: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 200 mg/kg de vitamina E, T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/kg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/kg de MAEO.
[2] Cambio neto en la variable.
[3] Error estándar de la media. [4] No significativo (NS), P>0.05

5.2 Estabilidad de lípidos de la yema de huevo durante el almacenamiento

El efecto de los tratamientos experimentales sobre la concentración de MDA, % E.E. y el perfil de ácidos grasos (AG) en la yema de huevo se resumen en la Tabla 5-4. Los resultados mostraron que no se presentaron diferencias en la concentración de MDA en la yema de huevo por efecto del tipo de suplementación (P>0.05), estos resultados son coherentes con el hecho que no se presentaron diferencias significativas por efecto de la adición en la dieta de MAEO o Vitamina E sobre los lípidos de la yema, sobre el contenido de AGM, AGPI y AGI/AGS (P>0.05) pero, si se encontraron cambios por la suplementación de AGPI en la dieta; con una reducción significativa (P=0,018) en el contenido de AGS de 4.5% en T2. Este resultado estuvo acorde a la composición de AG de los aceites de palma y pescado que se utilizaron para la preparación de las dietas (Tabla 4-2), ya que, el aceite de palma tuvo un contenido más elevado de AGS en su composición. Por lo tanto se sugiere que la adición de vitamina E y MAEO no produjo cambios sobre la ruta de síntesis de lípidos en el sistema biológico de la gallina.

Los resultados mostraron que el % E.E. tampoco presentó cambios estadísticamente significativos (P> 0.05) y que el promedio de esta variable en las yemas de huevo fue de 54.91%. Este resultado fue coherente con las especificaciones estipuladas en la norma NMX-F-345-S-1979 de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación para la yema de huevo deshidratada, en la cual se establece que el E.E. debe tener como mínimo un 50% y máximo un 61.2% (Colegio de Postgraduados en Ciencias Agricolas, 2014).

Tabla 5-4: Efecto de la suplementación con MAEO sobre % E.E., composición de ácidos grasos (% cantidad relativa) y concentración de MDA en la yema (mg/Kg).

		Composición de ácidos grasos[2]				
Tratamiento[1]	**E.E. (%)**	**ΣAGS**	**ΣAGM**	**ΣAGPI**	**ΣAGI/ AGS**	**MDA**
T1	54.4945	31.5177	45.0643	19.8544	2.0367	0.3252
T2	54.6795	30.8871	43.9904	20.1316	2.0960	0.3338
T3	55.0010	30.5218	44.6942	20.6756	2.1408	0.2717
T4	53.6413	30.5853	45.0601	20.3204	2.1356	0.2531
T5	55.7759	30.5945	45.2304	14.4779	1.9635	0.3317
T6	55.8721	30.7354	44.4019	20.4324	2.1083	0.3251
Valor-P	NS	0.0399	NS	0.0412	NS	0.0176
ESM[3]	0,6844	0.2231	0.4468	1.3832	0,0561	0.0197
Contrastes	**Pr > ltl[4]**	**Pr >ltl**	**Pr >ltl**	**Pr >ltl**	**Pr >ltl**	**Pr > ltl**
Palma S.S. vs. Pescado S.S	NS	0.0018	NS	NS	NS	NS
Pescado S.S. vs. Pescado + Antioxidantes	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pescado vitamina E vs. Pescado MAEO	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pescado MAEO lineal	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pescado MAEO cuadrático	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[1] T1: Dieta basal con 2% aceite de palma, T2: Dieta basal con 2% de aceite de pescado, T3: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 200 mg/kg de vitamina E, T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/kg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/kg de MAEO.
[2] ΣAGS: Ácidos grasos saturados totales, ΣAGM: Ácidos grasos monoinsaturados totales, ΣAGPI: Ácidos grasos poliinsaturados totales, ΣAGI/AGS: Relación de ácidos grasos insaturados y ácidos grasos saturados totales.
[3] Error estándar de la media.
[4] No significativo (NS), P>0.05.

Los mayores cambios en la concentración de MDA, % E.E. y el perfil de AG en la yema de huevo, se observaron por el efecto del tiempo de almacenamiento de los huevos y los resultados se resumen en las Tablas 5-5 y 5-6.

Tabla 5-5: Comparación del cambio en el porcentaje de extracto etéreo (EE) y la concentración de malondialdehído (MDA) en la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento en los tratamientos experimentales.

Variable	Tratamiento[1]	Día	Estimador[2]	ESM[3]	Pr>t[4]
E.E.	T1	0-60	0.8508	0.4906	NS
	T2	0-60	1.6450	0.4906	0.0026
	T3	0-60	1.3826	0.4906	0.0095
	T4	0-60	1.5213	0.4906	0.0049
	T5	0-60	1.0335	0.4906	0.0458
	T6	0-60	0.7171	0.4906	NS
MDA	T1	0-60	- 0.1156	0.0197	<0.0001
	T2	0-60	- 0.1616	0.0197	<0.0001
	T3	0-60	- 0.0815	0.0197	0.0004
	T4	0-60	- 0.0776	0.0197	0.0006
	T5	0-60	- 0.1535	0.0197	<0.0001
	T6	0-60	- 0.1494	0.0197	<0.0001

[1] T1: Dieta basal con 2% aceite de palma, T2: Dieta basal con 2% de aceite de pescado, T3: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 200 mg/Kg de vitamina E, T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/kg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/kg de MAEO.
[2] Cambio neto en la variable por la diferencia entre los valores de las yemas de huevos frescos y las yemas de huevos almacenados a 4ºC durante 60 días.
[3] Error estándar de la media.
[4] Probabilidad.

La peroxidación lipídica mostró un aumento significativo en las yemas de huevos almacenados 60 días a 4ºC (P<0.001), siendo 97.3% más alto para T2, seguido por T5 en 91%, T6 con un 75%, la oxidación fue controlada un 49% por el T3, seguido por el T4 en 40% y T6 en 25 %. El % E.E. se redujo significativamente en todos los tratamientos (P<0.05); siendo mayor en T2 (0.85%), T4 (0.78%), T3 (0.71%), T5 (0.53%), T1 (0.44%) y T6 (0.37%). Estos resultados mostraron que la inclusión de vitamina E y MAEO mejora la

estabilidad oxidativa de la matriz lipídica de los huevos en almacenamiento, lo cual, estuvo acorde a los resultados obtenidos en el perfil de AG. Aunque en general el perfil de AG no se vio afectado por el tiempo de almacenamiento ($P>0.05$), se encontró que con el T5 se disminuyó significativamente en 16% los AGS ($P=0.0147$) y disminuyó un 22.5% los AGPI ($P=0.0063$). Los AGM se incrementaron significativamente ($P<0,05$) en los tratamientos T2 (3.2%), T5 (2.3%), T4 (1.3%), y T6 (0.8%).

El efecto de protección de los lípidos por suplementación con vitamina E (T3) es reconocido por su efecto de detección de la peroxidación lipídica mediante la donación de su hidrógeno fenólico a los radicales peroxilo formando radicales tocoferoxilo que a pesar de ser también radicales, no son reactivos y son incapaces de continuar la reacción oxidativa en cadena. La vitamina E es el único antioxidante soluble en lípidos que se encuentra en el plasma, los glóbulos rojos y los tejidos, lo que le permite proteger la integridad de las estructuras lipídicas, principalmente membranas (Burton & Traber, 1990).

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, se encontró que las concentraciones de MDA se redujeron en los tratamientos con MAEO con respecto a T2, en contraste a lo observado por Ortiz, 2013 la reducción de la peroxidación lipídica no fue inversamente proporcional al aumento de la concentración de AEO *L. origanoides* libre en el alimento (Ortiz, et al., 2013).

Se sugiere como explicación a este fenómeno el hecho de que la actividad antioxidante del AEO debido a la presencia de grupos fenólicos como el timol, carvacrol, entre otros; en dosis elevadas puede tener un comportamiento prooxidante debido a la posible presencia de metales redox activos en el sistema celular de la yema de huevo. Estudios han reportado que la presencia de O_2 y algunos metales de transición como el hierro y cobre, catalizan el ciclo redox de compuestos fenólicos y pueden conducir a la formación de ERO y radicales fenoxilo que están en la capacidad de atacar el ADN, los lípidos y otras moléculas biológicas (Galobart, 2001; Galati & Brien, 2004).

Tabla 5-6: Comparación del cambio en la composición de ácidos grasos en la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento en los tratamientos experimentales.

Variable[1]	Tratamiento[2]	Día	Estimador[3]	ESM[4]	Pr>t[5]
ΣAGS	T1	0-60	0.2696	1.8100	NS
	T2	0-60	1.0304	1.8100	NS
	T3	0-60	0.7551	1.8100	NS
	T4	0-60	0.8635	1.8100	NS
	T5	0-60	- 4.7588	1.8100	0.0147
	T6	0-60	- 0.3240	1.8100	NS
ΣAGM	T1	0-60	0.7170	0.5013	NS
	T2	0-60	- 1.6214	0.5013	0.0035
	T3	0-60	- 0.9601	0.5013	NS
	T4	0-60	- 1.0469	0.5013	0.0476
	T5	0-60	- 1.4060	0.5013	0.0098
	T6	0-60	- 1.0794	0.5013	0.0416
ΣAGPI	T1	0-60	0.6887	1.6224	NS
	T2	0-60	1.3482	1.6224	NS
	T3	0-60	- 0.7087	1.6224	NS
	T4	0-60	0.7470	1.6224	NS
	T5	0-60	4.8551	1.6224	0.0063
	T6	0-60	0.3891	1.6224	NS
ΣAGI/ AGS	T1	0-60	0.0156	0.5055	NS
	T2	0-60	- 0.0854	0.5055	NS
	T3	0-60	- 0.0709	0.5055	NS
	T4	0-60	0.0855	0.5055	NS
	T5	0-60	1.4581	0.5055	0.0081
	T6	0-60	- 0.0290	0.5055	NS

[1] ΣAGS: Ácidos grasos saturados totales, ΣAGM: Ácidos grasos monoinsaturados totales, ΣAGPI: Ácidos grasos poliinsaturados totales, ΣAGI/AGS: Relación de ácidos grasos insaturados y ácidos grasos saturados totales.
[2] T1: Dieta basal con 2% aceite de palma, T2: Dieta basal con 2% de aceite de pescado, T3: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 200 mg/kg de vitamina E, T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/kKg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/kg de MAEO.
[3] Cambio en la variable por tiempo almacenamiento (yemas de huevos frescos y almacenados 60 días.
[4] Error estándar de la media
[5] No significativo (NS), P>0.05.

5.3 Estabilidad de proteínas de la yema de huevo durante el almacenamiento

5.3.1 Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes de la yema de huevo

Durante condiciones de estrés oxidativo los genes que codifican las enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GSH-Px, GST y GR son regulados por la célula en un esfuerzo por restaurar la homeostasis redox dentro y fuera de la misma. Debido a que se ha encontrado que existen algunos componentes de la dieta que pueden influir positivamente en estas vías de señalización y de transcripción, se estudió la influencia del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth sobre las actividades enzimáticas antioxidantes en el huevo, específicamente en la yema. Cabe mencionar que las actividades enzimáticas se midieron porque estas reflejan el estado de las enzimas durante procesos de estrés oxidativo propiciados por aspectos como el transporte, el manejo, la temperatura y el almacenamiento de los huevos en condiciones comerciales de producción.

Los efectos de los tratamientos dietarios sobre las actividades enzimáticas SOD, CAT y GSH-Px en la yema de huevo se resumen en la Tabla 5-7. Los resultados mostraron que la actividad de la SOD en las yemas de huevo fue significativamente mayor un 14.7 % en los suplementados con AGS con respecto a los suplementados con AGPI.

Aunque no se cuenta con reportes previos sobre la cuantificación de la actividad SOD en yemas de huevos enriquecidos con AGPI, que permitan comparar la información obtenida en este trabajo, se sugiere que debido al aumento en la cantidad de AGPI en la yema, y teniendo en cuenta el aumento concomitante de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica, la actividad de la enzima disminuye más rápidamente en las yemas enriquecidas con AGPI que en las enriquecidas con aceite de palma.

Tabla 5-7: Efecto del nivel de inclusión de MAEO en la dieta sobre la actividad de la SOD, CAT y GSH-Px en la yema de huevo.

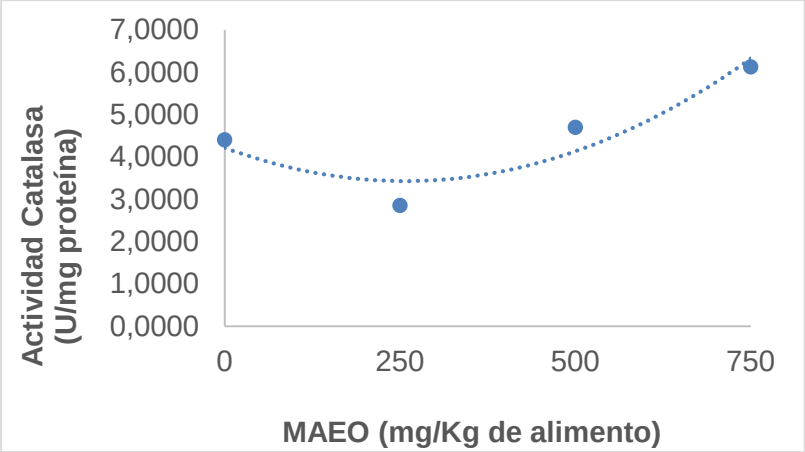
Tratamiento[1]	**U/mg de proteína**		
	SOD	**CAT**	**GSH-Px**
T1	2.6460	5.6762	0.8792
T2	2.3074	4.4114	0.7782
T3	1.9351	3.6858	1.0101
T4	2.0860	2.8584	0.9807
T5	2.4339	4.7068	1.2620
T6	2.5549	6.1308	0.6444
Valor-P	<0.0001	0.0334	<0.0001
ESM[2]	0.1643	0.7995	0.1647
Contrastes	**Pr > ltl**[3]	**Pr > ltl**	**Pr > ltl**
Palma S.S. vs. Pescado S.S	0.0369	NS	NS
Pescado S.S. vs. Pescado + Antioxidante	NS	NS	NS
Pescado vitamina E vs. Pescado MAEO	0.0320	NS	NS
Pescado MAEO lineal	NS	0.0329	NS
Pescado MAEO cuadrático	NS	NS	0.0395

[1] T1: Dieta basal con 2% aceite de palma, T2: Dieta basal con 2% de aceite de pescado, T3: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 200 mg/kg de vitamina E, T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/kg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/kg de MAEO.
[2] Error estándar.
[3] No significativo (NS), P>0.05

La actividad SOD fue significativamente mayor en los tratamientos suplementados con MAEO (17,9%) con respecto a la suplementación con Vitamina E (P<0.05), lo cual indica que el tipo de antioxidante suplementado en la dieta influencia la actividad de la enzima. Al igual que con la SOD, la actividad CAT y GSH-Px de las yemas presentaron diferencias por la suplementación con MAEO, una respuesta de tendencia cuadrática en la CAT (Figura 5-2) y una respuesta con tendencia cuadrática en la GSH-Px (Figura 5-3) por efecto de la inclusión de MAEO en la dieta (P<0.05). Los valores de actividad CAT se incrementaron proporcionalmente a medida que se incrementó la dosis de MAEO en la

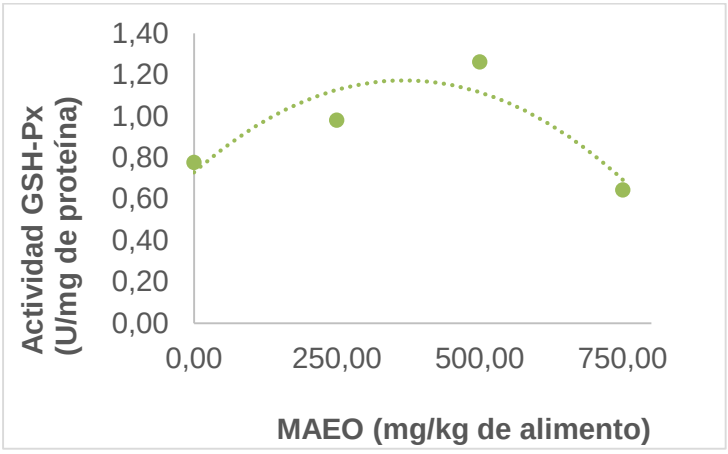
dieta, mientras que la actividad GSH-Px de las yemas fue mayor con la suplementación de 500 ppm de MAEO (1.2620 U/mg de proteína).

Figura 5-2: Efecto de la inclusión de MAEO (*Lippia origanoides* Kunth) sobre la actividad catalasa de la yema de huevo.



y = 1E-05x2 - 0,0061x + 4,2188; R^2= 0.8646; P<0.0329; X= Concentración de MAEO incluida en la dieta.

Figura 5-3: Efecto de la inclusión de MAEO (*Lippia origanoides* Kunth) en la actividad glutation peroxidasa (GSH-Px) de la yema de huevo.



Y = -3E-06x^2 + 0,0024x + 0,7293; R^2 = 0,7794; P< 0.0395; X= Concentración de MAEO incluida en la dieta.

Aunque no se cuenta con estudios previos en los cuales se haya evaluado la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GSH-Px en la yema de huevo, los datos recientes de algunos estudios realizados en líneas celulares humanas han determinado que los polifenoles tienen efecto en el aumento de los niveles de glutatión (GSH), glutatión reductasa (GR), glutatión transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) y en las actividades de la GST (Masella, et al., 2004; Biswas, et al., 2005; Myhrstad, et al., 2002), sugiriendo que los polifenoles de la dieta estimulan la transcripción de estos sistemas de defensa a través de los elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Chen, et al., 2000). Masella y otros en el 2005 sugirieron que los polifenoles influyen en las vías que regulan la activación de los ARE mediante la modificación de la capacidad de la proteína 1 Kelch asociada a ECH (denominada Keap1 en humanos) de secuestrar el factor de transcripción Nrf2 o activar el mitógeno de la proteína quinasa activada (MAPK) y algunas proteínas implicadas en la estabilización de Nrf2 como ERK, JNK y p38 que se translocan al núcleo, en donde estos puede ser transactivados por los ARE que contienen promotores de genes antioxidantes (Masella, et al., 2005).

Estos resultados pueden indicar que los compuestos de naturaleza fenólica como el timol que se suministraron a través de la dieta mediante la suplementación con MAEO, pueden ser responsables de la mejora en la disociación de un complejo análogo de las proteínas Keap1/Nrf2 (en humanos) y esto habría promovido la regulación de los genes antioxidantes precursores de las enzimas SOD, CAT y GSH-Px, elevando su actividad con respecto a los tratamientos control. Sin embargo, se plantea como hipótesis que este proceso se lleva a cabo en el hígado, órgano del cual provienen la mayor cantidad de componentes que forman la yema de huevo (Huopalahti, et al., 2007).

Por otro lado, se encontró que luego del almacenamiento de los huevos durante 60 días a 4°C (Tabla 5-8), la actividad SOD disminuyó significativamente ($P<0,05$) un 75,7% en el tratamiento suplementado con AGPI (T2), mientras que, los tratamientos con suplementación de vitamina E y MAEO disminuyeron la perdida de la actividad en T6 (65.9%), T1 (58.7%), T4 (56.7%) y T3 (55.1%). Los resultados fueron coherentes con lo reportado por Wawrzykowski y Kankofer, 2011 quienes determinaron que la actividad de la SOD en la yema de huevo durante el almacenamiento a 4 ºC no cambia durante los primeros 6 días, pero, entre el sexto y noveno día, la actividad decrece significativamente

debido a la naturaleza perecedera del alimento que promueve la presencia de ERO, las cuales se forman durante el almacenamiento y conllevan a cambios oxidativos en el producto alimenticio (Wawrzykowski & Kankofer, 2011). Sin embargo, estos resultados muestran que la suplementación con sustancias antioxidantes retardan la pérdida de actividad de la enzima con respecto a los tratamientos no suplementados.

Tabla 5-8: Comparación del cambio en la actividad de la SOD, CAT y GSH-Px en la yema de huevo por efecto del tiempo de almacenamiento.

Enzima	Tratamiento[1]	Día	Estimador[2]	ESM[3]	Pr>t[4]
SOD	T1	0-60	3.7553	1.2025	0.0046
	T2	0-60	6.9737	1.2025	<0.0001
	T3	0-60	2.4175	1.2025	NS
	T4	0-60	2.7751	1.2025	0.0299
	T5	0-60	2.3377	1.2025	NS
	T6	0-60	4.8953	1.2025	0.0004
CAT	T1	0-60	- 4.8023	0.8026	<0.0001
	T2	0-60	- 2.8850	0.8026	0.0015
	T3	0-60	1.5750	0.8026	NS
	T4	0-60	4.2877	0.8026	<0.0001
	T5	0-60	- 1.6145	0.8026	NS
	T6	0-60	- 3.8580	0.8026	<0.0001
GSH-Px	T1	0-60	0.3493	0.1458	0.0247
	T2	0-60	- 0.3755	0.1458	0.0166
	T3	0-60	- 0.1649	0.1458	NS
	T4	0-60	0.4814	0.1458	0.0030
	T5	0-60	- 0.3566	0.1458	0.0222
	T6	0-60	0.4003	0.1458	0.0113

[1] T1: Dieta basal con 2% aceite de palma, T2: Dieta basal con 2% de aceite de pescado, T3: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 200 mg/kg de vitamina E, T4: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 250 mg/kg de MAEO, T5: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 500 mg/kg de MAEO, T6: Dieta basal con 2% de aceite de pescado + 750 mg/kg de MAEO.
[2] Diferencia en la actividad (U/mg de proteína) (Yemas frescas – yemas almacenadas)
[3] Error estándar de la media; [4] No significativo (NS), P>0.05

Las actividades CAT y GSH-Px en las yemas presentaron comportamientos variables en los diferentes tratamientos al finalizar el tiempo de almacenamiento. La actividad CAT aumentó significativamente con respecto a huevos frescos ($P<0.001$) en los T1, T6 y T2 en un 1119%, 185% y 147%, respectivamente. Mientras que decreció un 54.7% con el T4.

La actividad GSH-Px disminuyó en las yemas de los huevos almacenados que recibieron la suplementación deT5 un 25%, mientras, que se incrementó en T2 con un 113%, seguido por T6 con un 37% y T4 con un 22%.

Aunque no se tienen reportes previos sobre la medición de la actividad de estas enzimas en la yema de huevo, estos resultados se encuentran coherentes con lo reportado por Hashemipour y otros, 2013 quienes determinaron que la actividad antioxidante de las enzimas SOD y GSH-Px en el suero sanguíneo, el hígado y la pierna de pollo de engorde suplementado con timol + carvacrol en dosis de 60, 100 y 200 ppm producen un incremento en la actividad enzimática durante la suplementación, lo cual sugiere que estas sustancias podrían mejorar el estado antioxidante de los pollos debido a la propiedad antioxidante del timol y carvacrol que elevaron la actividad de las enzimas antioxidantes (Hashemipour, et al., 2013).

Yanishlieva y otros, 1999 discutieron la relación entre las propiedades antioxidantes y la composición química de los aceites esenciales sugiriendo que la alta actividad antioxidante del timol es debido a la presencia de los grupos OH fenólicos que actúan como donantes de hidrógeno a los radicales peroxilo producidos durante la primera etapa de la oxidación de lípidos (Farag, et al., 1989), retardando así la formación de peróxido de hidroxilo (Yanishlieva, et al., 1999). Teniendo en cuenta estos reportes, se puede establecer que el incremento en la concentración intrínseca de sustancias antioxidantes como el timol en la yema de huevo, promueven un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes y favorecen el mantenimiento de la homeostasis redox dentro de la yema, disminuyendo la perdida de actividad durante el tiempo de almacenamiento.

5.3.2 Evaluación del perfil de proteínas de la yema de huevo

La cuantificación de proteína en los extractos de yema de huevo permitió realizar la siembra de muestras para la realización de la separación de proteínas por electroforesis unidimensional y bidimensional, la comparación se normalizó por la carga de proteína. Los resultados se presentan en las Tablas 5-9 y 5-10.

Tabla 5-9: Cuantificación de proteínas en extractos proteicos de yema de huevos frescos.

Muestra	Replica	Cantidad de proteína [µg]
T1-DÍA 0	1	721.20
T1-DÍA 0	2	748.20
T1-DÍA 0	3	1040.20
T2-DÍA 0	1	793.20
T2-DÍA 0	2	770.20
T2-DÍA 0	3	847.20
T3-DÍA 0	1	772.20
T3-DÍA 0	2	728.20
T3-DÍA 0	3	760.20
T4-DÍA 0	1	659.20
T4-DÍA 0	2	644.20
T4-DÍA 0	3	878.20
T5-DÍA 0	1	940.20
T5-DÍA 0	2	1020.53
T5-DÍA 0	3	914.20
T6-DÍA 0	1	705.20
T6-DÍA 0	2	812.20
T6-DÍA 0	3	656.20
ESM[1]		69.86

[1] Error estándar de la media.

Tabla 5-10: Cuantificación de proteínas en extractos proteicos de yema de huevos almacenados (Continuación).

Muestra	Replica	Cantidad de proteína [µg]
T1-DÍA 60	1	1006.20
T1-DÍA 60	2	881.20
T1-DÍA 60	3	668.20
T2-DÍA 60	1	706.20
T2-DÍA 60	2	736.20
T2-DÍA 60	3	863.20
T3-DÍA 60	1	734.20
T3-DÍA 60	2	717.20
T3-DÍA 60	3	1055.20
T4-DÍA 60	1	936.20
T4-DÍA 60	2	962.20
T4-DÍA 60	3	896.20
T5-DÍA 60	1	865.20
T5-DÍA 60	2	977.20
T5-DÍA 60	3	854.20
T6-DÍA 60	1	1034.20
T6-DÍA 60	2	650.20
T6-DÍA 60	3	653.20
ESM[1]		136.33

[1] Error estándar de la media.

- **Perfil electroforético unidimensional de proteínas de yema de huevo**

Mediante SDS-PAGE se compararon las diferencias en los perfiles electroforéticos de cada extracto proteico de yema de huevo (Figuras 5-4 y 5-5). El perfil muestra que todos los extractos presentan bandas definidas e intensas a lo largo de todos los carriles. Se observó un perfil uniforme para todas las muestras y no se detectaron patrones de degradación que fueran causal de sustitución de las muestras seleccionadas. Por esta razón, se consideró que las muestras eran aptas para ser analizadas por electroforesis bidimensional.

Figura 5-4: Perfiles electroforéticos de proteínas de yemas de huevo frescas en geles de poliacrilamida al 10%. MW: Marcador de peso molecular sin preteñir de rango amplio marca Thermo Scientific ® #26630. 1, 2 y 3 indican réplicas de un mismo tratamiento.

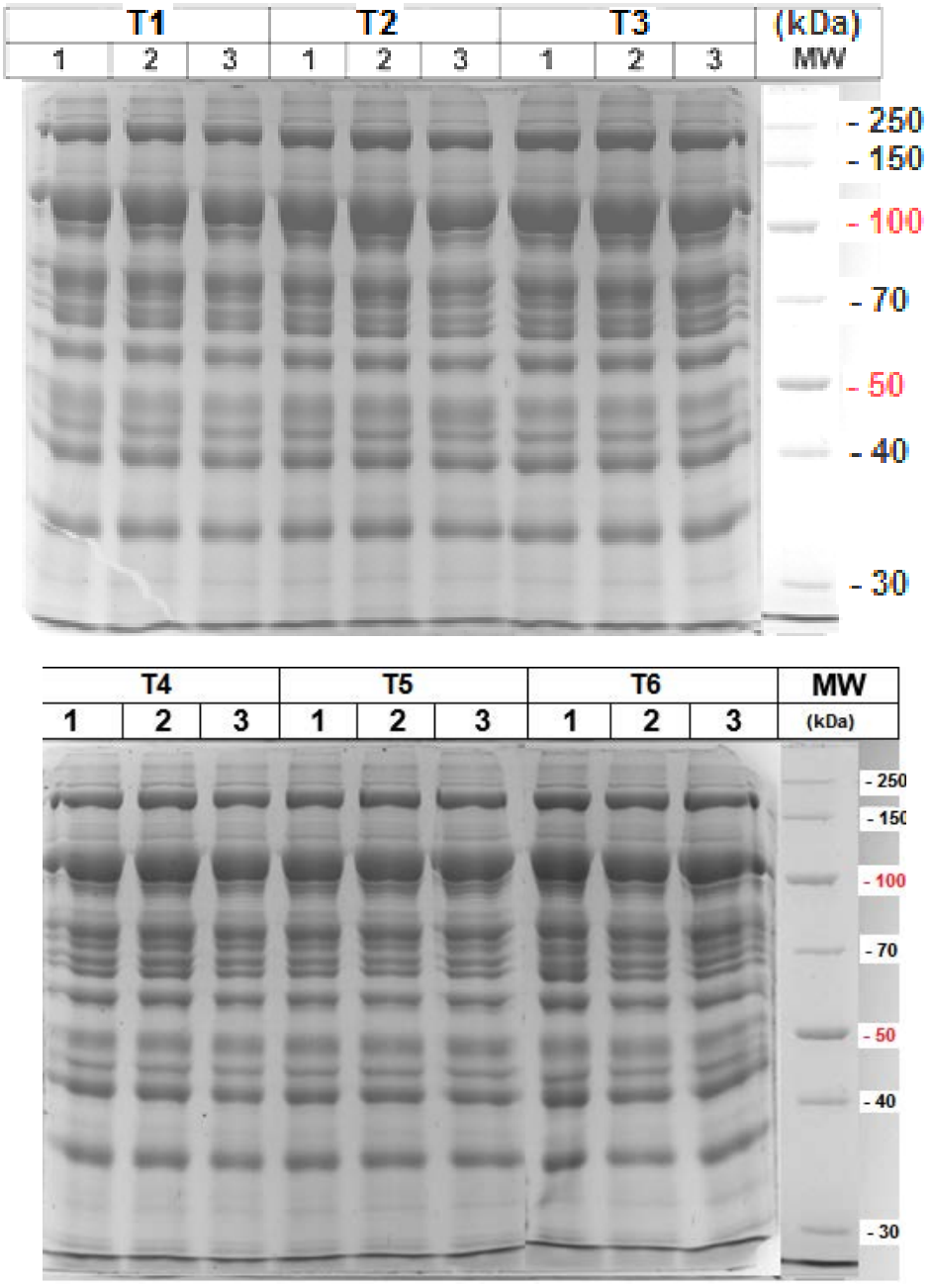
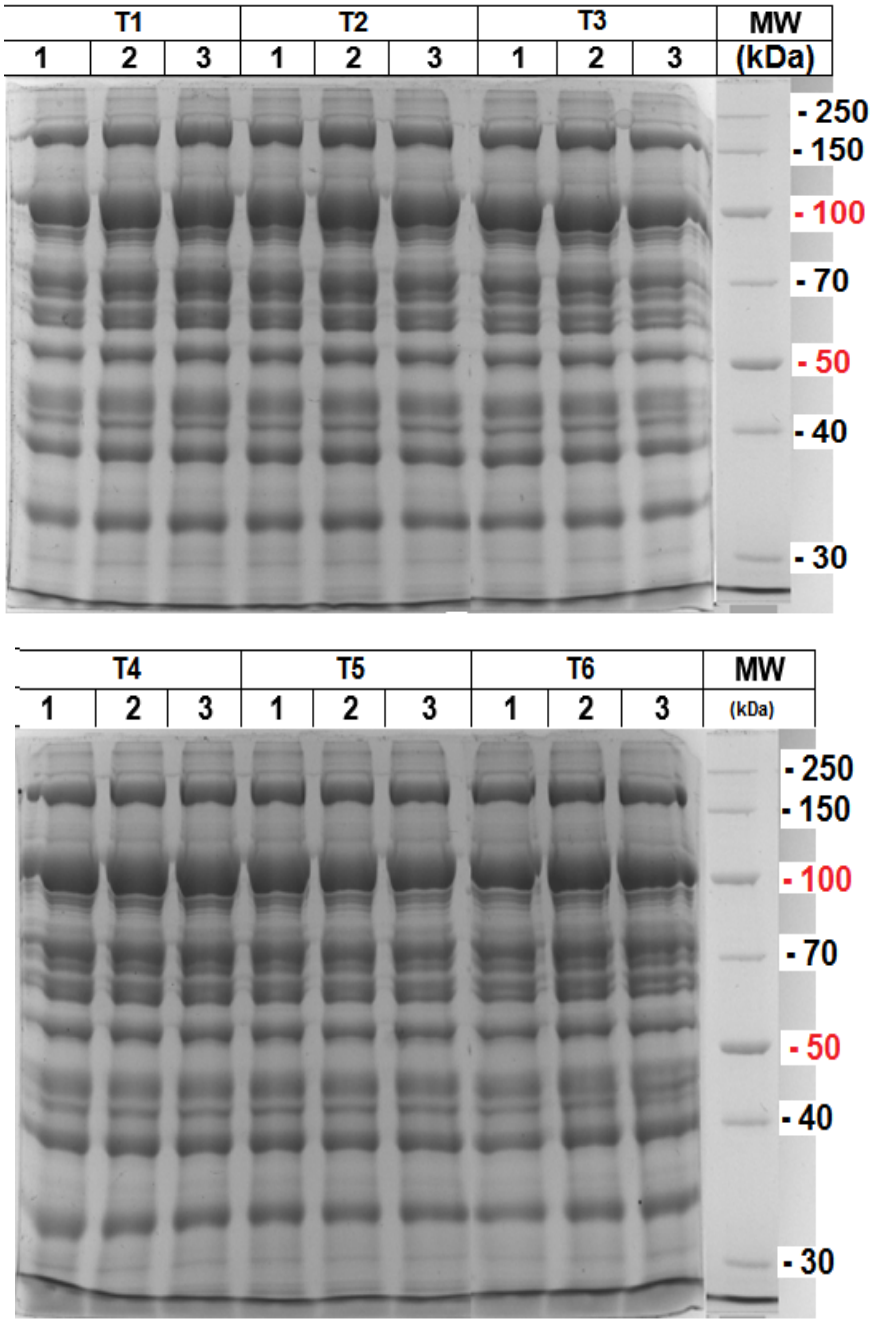


Figura 5-5: Perfiles electroforéticos de proteínas de yemas de huevo almacenadas 60 días a 4ºC en geles de poliacrilamida al 10%. MW: Marcador de peso molecular sin preteñir de rango amplio marca Thermo Scientific ® #26630. 1, 2 y 3 indican réplicas de un mismo tratamiento.



- **Perfil electroforético de geles bidimensionales de la yema de huevo**

Las figuras 5-6 y 5-7 presentan geles bidimensionales representativos del comportamiento de las réplicas técnicas obtenidas en los distintos tratamientos.

Figura 5-6: Geles 2D representativos de los proteomas de yemas de huevo frescas. La carga de proteína fue 100 µg en buffer de IEF y separada por 2DE usando tiras IEF de 7 cm en gradiente lineal de pH 3-10 y SDS-PAGE al 10%. Los *spots* de proteína fueron visualizados por tinción con Coomassie coloidal G-250. El marcador de peso empleado fue de rango amplio, marca Thermo Scientific ® #26630 (MW). Las muestras corresponden con (A) T1, (B) T2, (C) T3, (D) T4, (E) T5 y (F) T6.

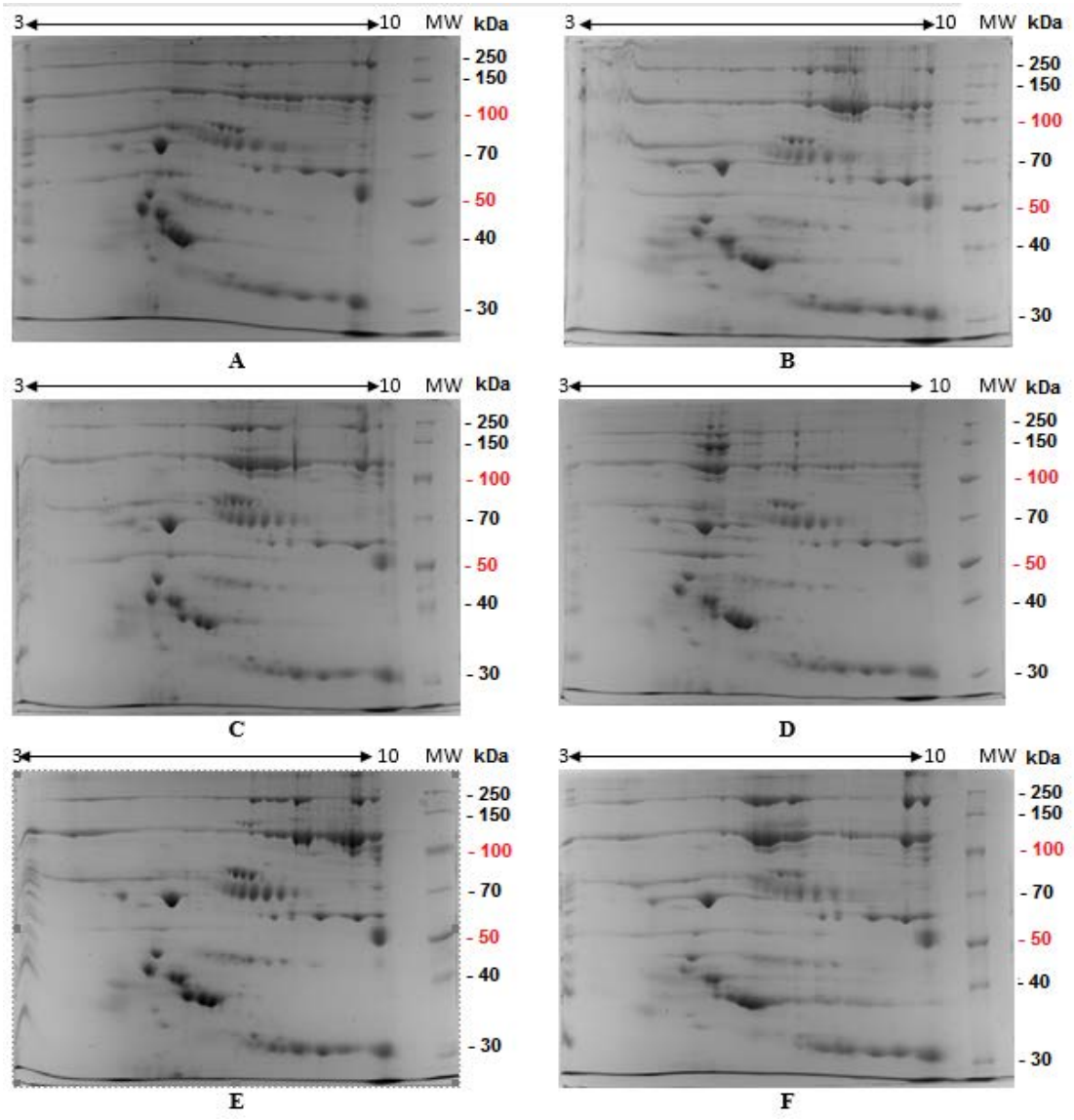
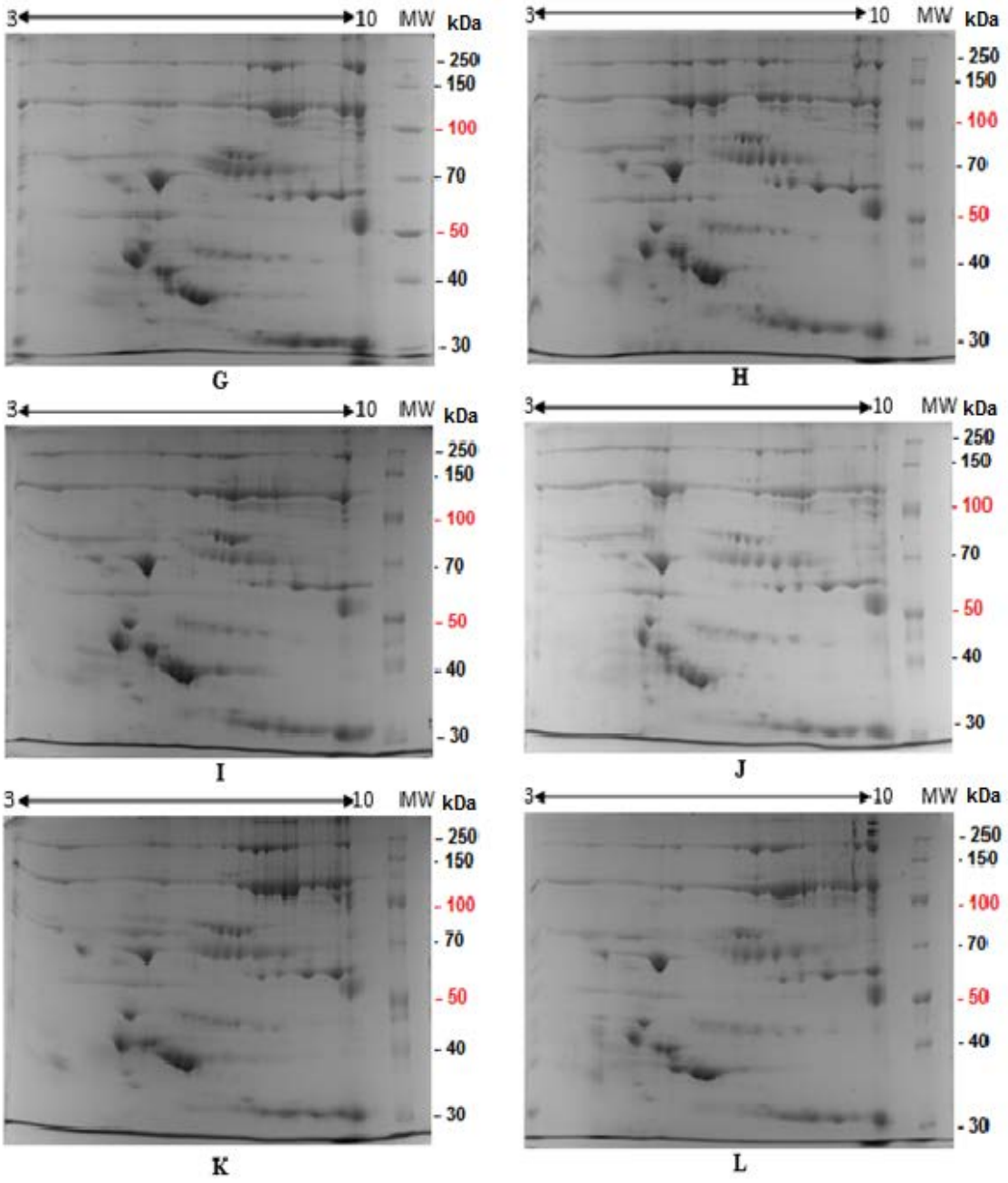


Figura 5-7: Geles 2D representativos de los proteomas de yemas de huevo almacenadas durante 60 días a 4ºC. La carga de proteína fue 100 µg en buffer de IEF y separada por 2DE usando tiras IEF de 7 cm en gradiente lineal de pH 3-10 y SDS-PAGE al 10%. Los *spots* de proteína fueron visualizados por tinción con Coomassie coloidal G-250. El marcador de peso empleado fue de rango amplio, marca Thermo Scientific ® #26630 (MW). Las muestras corresponden con (G) T1, (H) T2, (I) T3, (J) T4, (K) T5 y (L) T6.



- **Detección de *spots* en geles bidimensionales**

Para realizar el análisis de geles, primero se realizó la detección de los spots en todos los geles de cada jerarquía, los parámetros que resultaron ser más eficientes se describen a continuación en la Tabla 5-11.

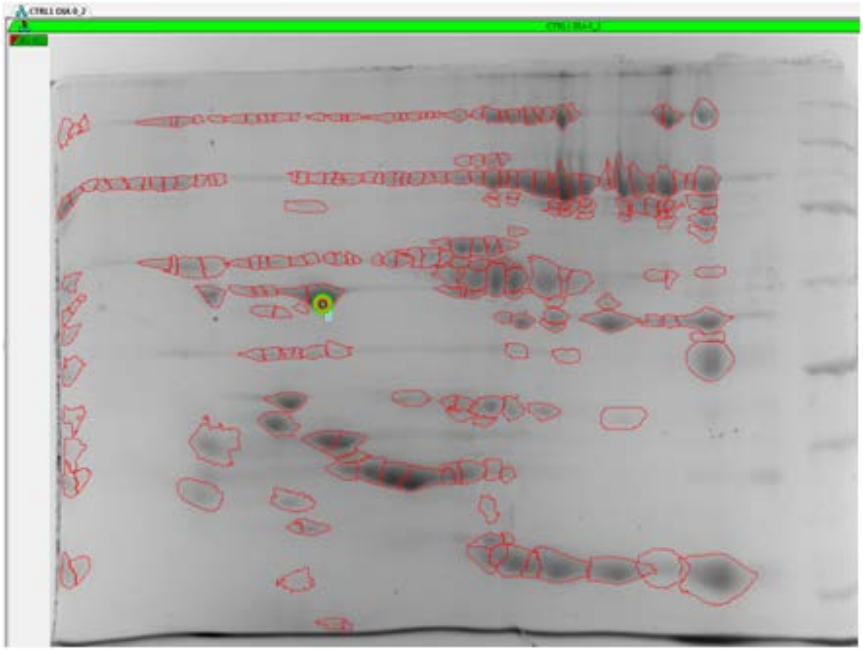
Tabla 5-10: Parámetros seleccionados para la identificación de *spots* en los geles bidimensionales de proteína de yema de huevo.

PARÁMETRO	VALOR	SIGNIFICADO
Smooth	3	Fija el número de veces que el *software* suaviza la imagen antes de la detección de los spots, con el fin de detectar todos los puntos reales y eliminar los puntos de ruido y burbujas.
Saliency (prominencia)	40	Indica hasta qué punto un *spot* se destaca con respecto al plano en el que se encuentra. Los spots reales tienen altos valores de prominencia mientras que los residuos de coomassie, el polvo y el ruido tienen pequeños valores de prominencia.
Área mínima de pico	3	Elimina manchas que tienen un área menor que el umbral especificado (expresado en número de pixeles).

Los parámetros se ajustaron para permitir detectar todos los *spots* verdaderos, y descartar interferentes (falsos *spots*) como burbujas y residuos de *coomassie* coloidal. Los parámetros determinados se aplicaron para todos los geles analizados.

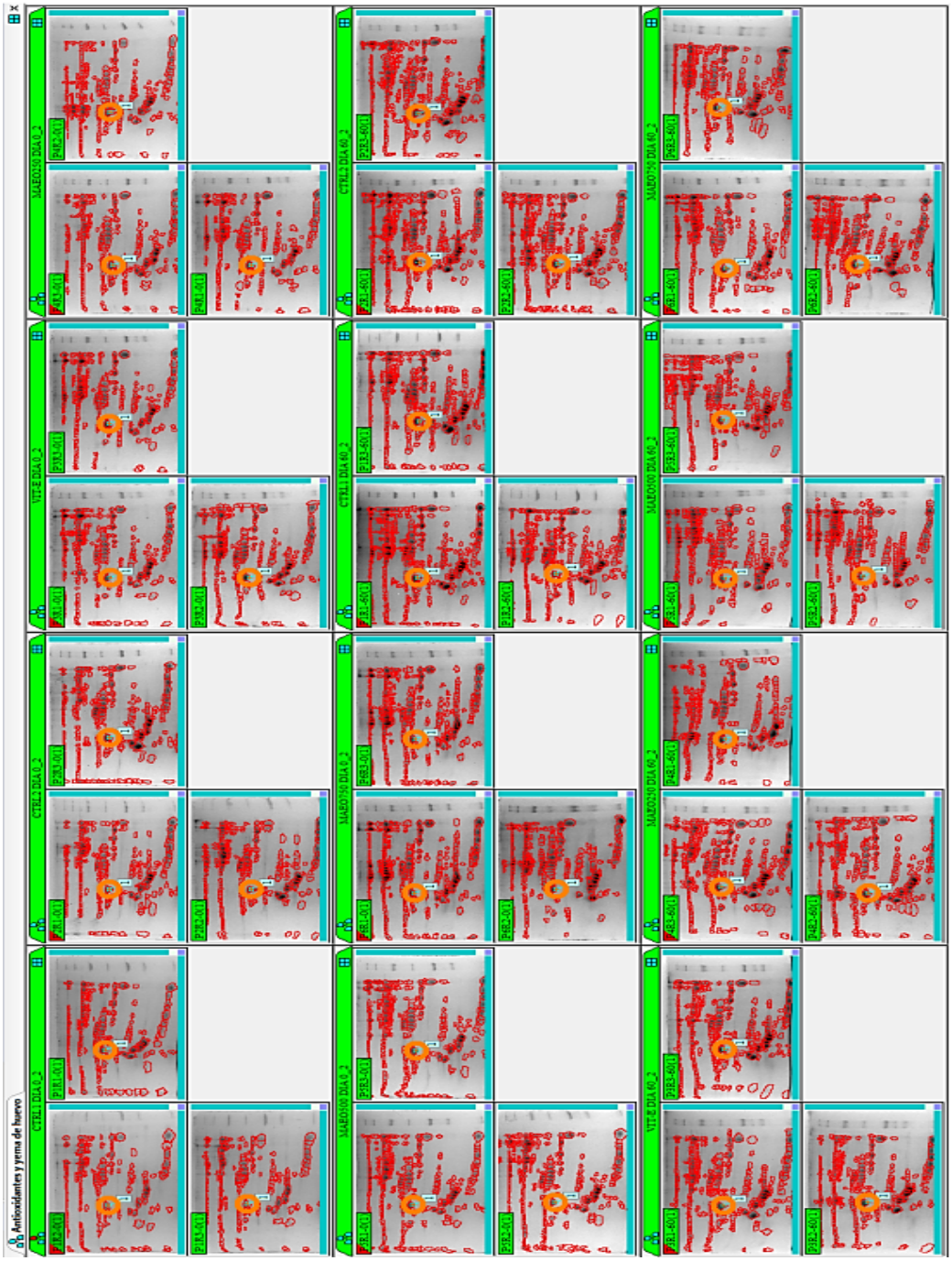
De acuerdo a lo mencionado en la metodología, una vez realizada la detección de los spots en todos los geles, se realizó el emparejamiento de todas las imágenes de todos los grupos. Para esto, se utilizó un *spot* de referencia o *landmark* (*spot* presente en todos los geles), de manera tal, que se facilitara el alineamiento y el emparejamiento permitiera hallar sus contrapartes en los demás geles (Figuras 5-8 y 5-9).

Figura 5-8: Detección de *spots* en los geles, emparejamiento de las imágenes y adición de un *landmark* (circulo verde-naranja).



Posteriormente, se realizó el emparejamiento automático entre los geles de cada tratamiento o jerarquía, allí cada *spot* se alineo con sus semejantes en todos los geles, luego, se realizó un emparejamiento manual con el fin de eliminar *spots* falsos restantes y corregir el emparejamiento incorrecto. Al finalizar el procedimiento, el total de imágenes se emparejaron entre sí, sin tener en cuenta el tratamiento.

Figura 5-9: Detección de *spots* en los geles, emparejamiento de las imágenes y adición de un marcador o *landmark* (circulo naranja) (Continuación).



Las tablas 5-12 y 5-13 muestran los resultados del emparejamiento de cada gel con los *spots* detectados en la imagen de referencia que para este caso fue T1-R2-0 (Replica 2 del tratamiento T1 en yemas de huevos frescos), también se muestra el total de *spots* emparejados en cada gel analizado y el porcentaje de *spots* emparejados con el gel de referencia. Después de realizar el emparejamiento entre los geles, se hizo el análisis factorial que permitió evidenciar diferencias entre los perfiles de expresión global de las muestras.

Tabla 5-11: Conteo de *spots* emparejados entre los geles 2D de muestras de yema de huevos frescos por cada tratamiento.

Grupo	Nombre gel	# de *spots* emparejados	% de e*mparejamiento*
T1_DIA 0	T1-R1-0	233	94
	T1-R2-0*	236	98
	T1-R3-0	219	95
T2_DIA 0	T2-R1-0	276	100
	T2-R2-0	275	93
	T2-R3-0	263	94
T3_DIA 0	T3-R1-0	261	96
	T3-R2-0	276	91
	T3-R3-0	272	98
T4_DIA 0	T4-R1-0	255	97
	T4-R2-0	257	81
	T4-R3-0	264	98
T5_DIA 0	T5-R1-0	298	99
	T5-R2-0	295	91
	T5-R3-0	299	94
T6_DIA 0	T6-R1-0	334	99
	T6-R2-0	241	84
	T6-R3-0	344	93

* Gel de referencia para el emparejamiento.

Tabla 5-12: Conteo de *spots* emparejados entre los geles 2D de muestras de yema de huevos almacenados 60 días a 4ºC por cada tratamiento.

Grupo	Nombre gel	# de *spots emparejados*	% *de emparejamiento*
T1_DIA 60	T1-R1-60	393	93
	T1-R2-60	336	88
	T1-R3-60	352	95
T2_DIA 60	T2-R1-60	391	96
	T2-R2-60	381	94
	T2-R3-60	367	93
T3_DIA 60	T3-R1-60	335	94
	T3-R2-60	321	96
	T3-R3-60	301	91
T4_DIA 60	T4-R1-60**	---	---
	T4-R2-60	313	90
	T4-R3-60	353	93
T5_DIA 60	T5-R1-60	305	100
	T5-R2-60	301	89
	T5-R3-60	317	85
T6_DIA 60	T6-R1-60	298	97
	T6-R2-60	312	88
	T6-R3-60	292	91

** El gel se eliminó por defectos en la corrida que impedían el emparejamiento.

- **Análisis de geles usando análisis factorial**

La comparación visual de los geles bidimensionales es una tarea complicada, si se tiene en cuenta que se trata con una gran cantidad de geles que consisten de miles de puntos

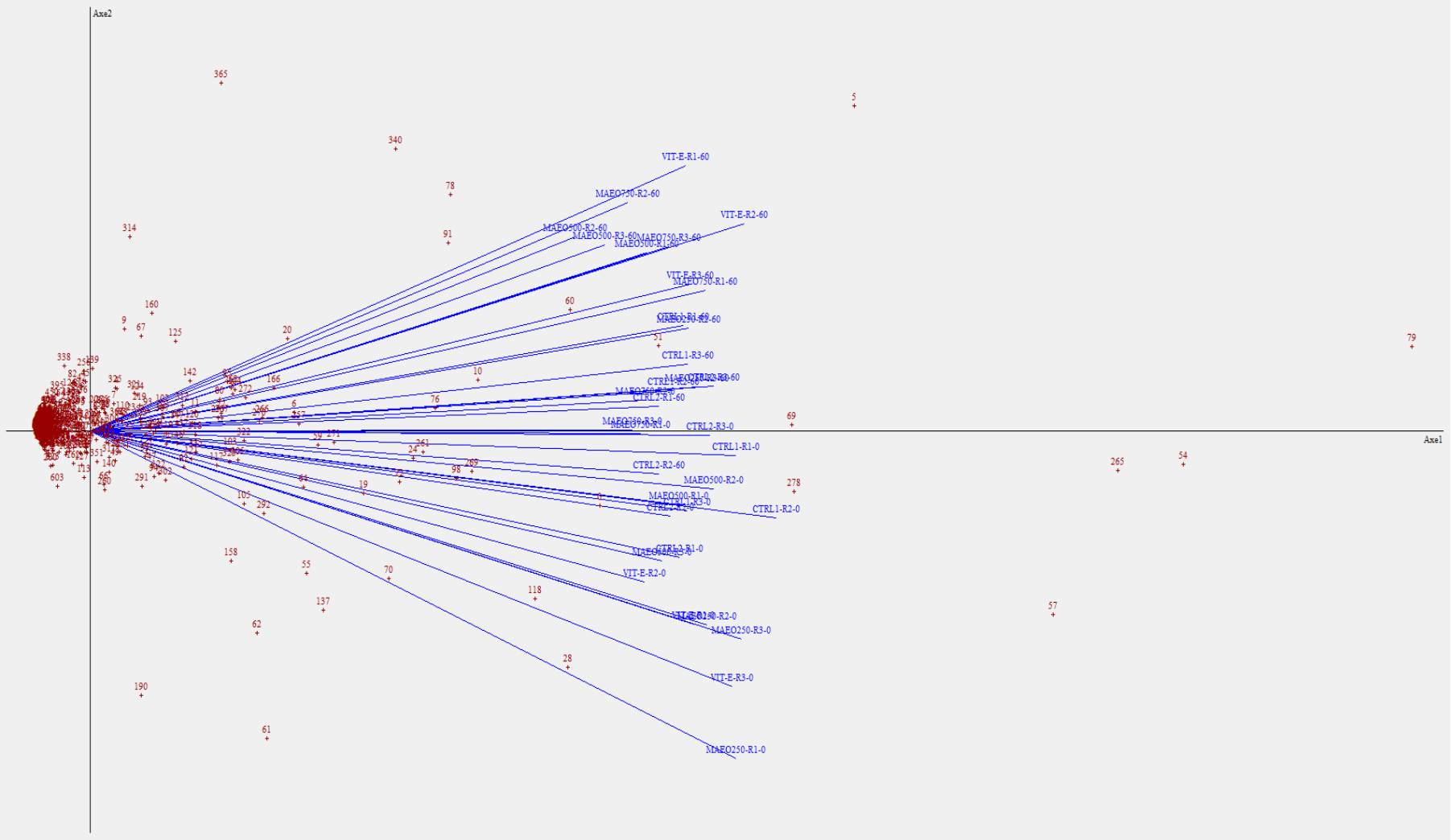
de proteína. Debido a esto, puede ser difícil evaluar si existen poblaciones diferentes en las muestras, y caracterizar sus perfiles de expresión de proteínas.

El análisis factorial es una herramienta estadística que permite condensar la información contenida en estos grandes conjuntos de datos en un número menor de factores o dimensiones, que explican la mayor parte de la varianza observada. El análisis factorial permite examinar las interrelaciones entre un gran número de variables (valores de *spots* en una serie de geles) y explicar estas relaciones (poblaciones de geles) en términos de factores comunes subyacentes (asociaciones con patrones de *spots* específicos).

La figura 5-10 muestra la proyección de factores de todas las muestras de yema de huevo que se tuvieron en cuenta en el estudio, la figura detalla cada *spot* (cruces rojas) y el gel (vector azul) en los dos ejes factoriales. El número de factores iguala el número de geles que se analizaron. El eje horizontal o eje 1 se correlaciona con la abundancia de la proteína y cabe mencionar que los *spots* emparejados con los volúmenes relativos más altos contribuyen con el mismo. El eje vertical o eje 2 es la relación entre los valores medios de conteo de cada población de geles, lo que es importante para la separación de los geles en poblaciones.

La figura 5-10 resume la variación del análisis factorial por ejes sucesivos (o factores), expresado como porcentaje de la varianza total. Así, el factor 1 representa el 81,51% de la varianza, mientras que, el factor 2 de 24,75%. Las coordenadas para cada gel se proyectaron sobre estos ejes. En la figura se detalla que la mayor parte de los *spots* emparejados se encuentran proyectados alrededor del origen de la gráfica, lo cual, ilustra que estos *spots* de proteína no son significativos para la clasificación de los geles, puesto que están presentes en todas las muestras. De otro lado, los *spots* más lejanos al origen como el 79, 54, 265 y 57 son probablemente los más importantes en términos de la caracterización de los geles, teniendo en cuenta que los *spots* emparejados cercanos a un conjunto de geles, son probablemente los más característicos de los mismos y pueden determinar por qué esos geles son diferentes de otros geles.

Figura 5-10: Proyección de factores para geles de muestras de yemas de huevos frescas y almacenadas 60 días a 4 °C.



En la figura 5-10 se pudo visualizar claramente que existen geles que son adyacentes en el gráfico, lo cual, se debe a que son probablemente similares e incluso pueden corresponder a la misma población. Los *spots* emparejados con un comportamiento muy similar (perfiles de expresión similar en los geles) se encontraron cercanos en el espacio. Este es claramente el caso de los geles de T5-60, T6-60, T6-0, entre otros.

Cabe mencionar, la mayor parte de los geles de muestras de yemas de huevos frescos (DÍA 0) se agruparon debajo del eje horizontal, mientras que, los geles de muestras de yemas de huevos almacenados (DÍA 60) se ubicaron por encima del eje. Los factores (geles) se distribuyeron en los cuadrantes 1 y 4, el eje horizontal dividió los grupos en dos poblaciones. Los *spots* emparejados de la parte inferior de la gráfica (cuadrante 4) favorecieron los grupos T1-día 0, T2-día 0, T3-día 0, T4-día 0, T5-día 0, T6-día 0 y T1- día 60, T2-día 60, mientras que aquellos por encima del eje horizontal (cuadrante 1) tienen radios que favorecen los geles de los grupos, T3-día 60, y T4- día 60, T5- día 60 y T6- día 60.

Con el fin de caracterizar las poblaciones de manera un poco más detallada, se dividieron los grupos de tratamiento por tiempo de almacenamiento en yemas de huevos frescos (día 0) y yemas de huevos almacenados (día 60) y la distribución de los geles se muestra en las Figuras 5-11 y 5-12, respectivamente.

La proyección de factores para geles de muestras de yemas de huevos frescos se representa en la Figura 5-11. La variación del análisis factorial de yemas de huevos almacenados a 60 días, se encontró que el factor 1 representa el 81,35 % de la varianza, mientras que, el factor 2 fue de 34,62%. Las coordenadas para cada gel se proyectaron sobre estos ejes. En la figura se detalla que la mayor parte de los *spots* emparejados se encuentran proyectados alrededor del origen de la gráfica, lo cual, ilustra que estos *spots* de proteína no son significativos para la clasificación de los geles, puesto que están presentes en todas las muestras. De otro lado, los *spots* más lejanos al origen como el 79, 54, 57 y 256 son probablemente los más importantes en términos de la caracterización de los geles.

El análisis mostró que los grupos fueron divididos por el eje horizontal en dos poblaciones. Los *spots* emparejados de la parte superior de la figura (cuadrante 1) favorecieron los

grupos T4-día 0, T3-día 0 y T6-día 0, mientras que, aquellos por debajo del eje horizontal (cuadrante 4) tienen relaciones que favorecen los geles de los grupos T1- día 0, T2-día 0, y T5-día 0. Resulta interesante que las poblaciones de los grupos T4-día 0 y T3-día 0 se hallan muy cerca, por lo que se podría suponer similaridad entre sus perfiles de proteína.

La Figura 5-12 resume la variación del análisis factorial de yemas de huevos almacenados a 60 días, se encontró que el factor 1 representa el 83,62% de la varianza, mientras que, el factor 2 fue de 32,03%. Las coordenadas para cada gel se proyectaron sobre estos ejes. En la figura se detalla que la mayor parte de los *spots* emparejados se encuentran proyectados alrededor del origen de la gráfica, lo cual, ilustra que estos *spots* de proteína no son significativos para la clasificación de los geles, puesto que están presentes en todas las muestras. De otro lado, los *spots* más lejanos al origen como el 79, 365, 54 y 60 son probablemente los más importantes en términos de la caracterización de los geles.

El análisis factorial mostró que los *spots* emparejados de la parte superior de la gráfica (cuadrante 1) favorecen los grupos T5-día 60 y T6-día 60. Por otro lado, se encontró que los geles agrupados debajo del eje horizontal (cuadrante 4) como el T1- día 60 tienen mayor homogeneidad entre sus réplicas técnicas, el grupo T2-día 60, T4-día 60 y el grupo T3-día 60 se aleja de los anteriores.

Figura 5-11: Proyección de factores para geles de muestras de yemas de huevos frescos.

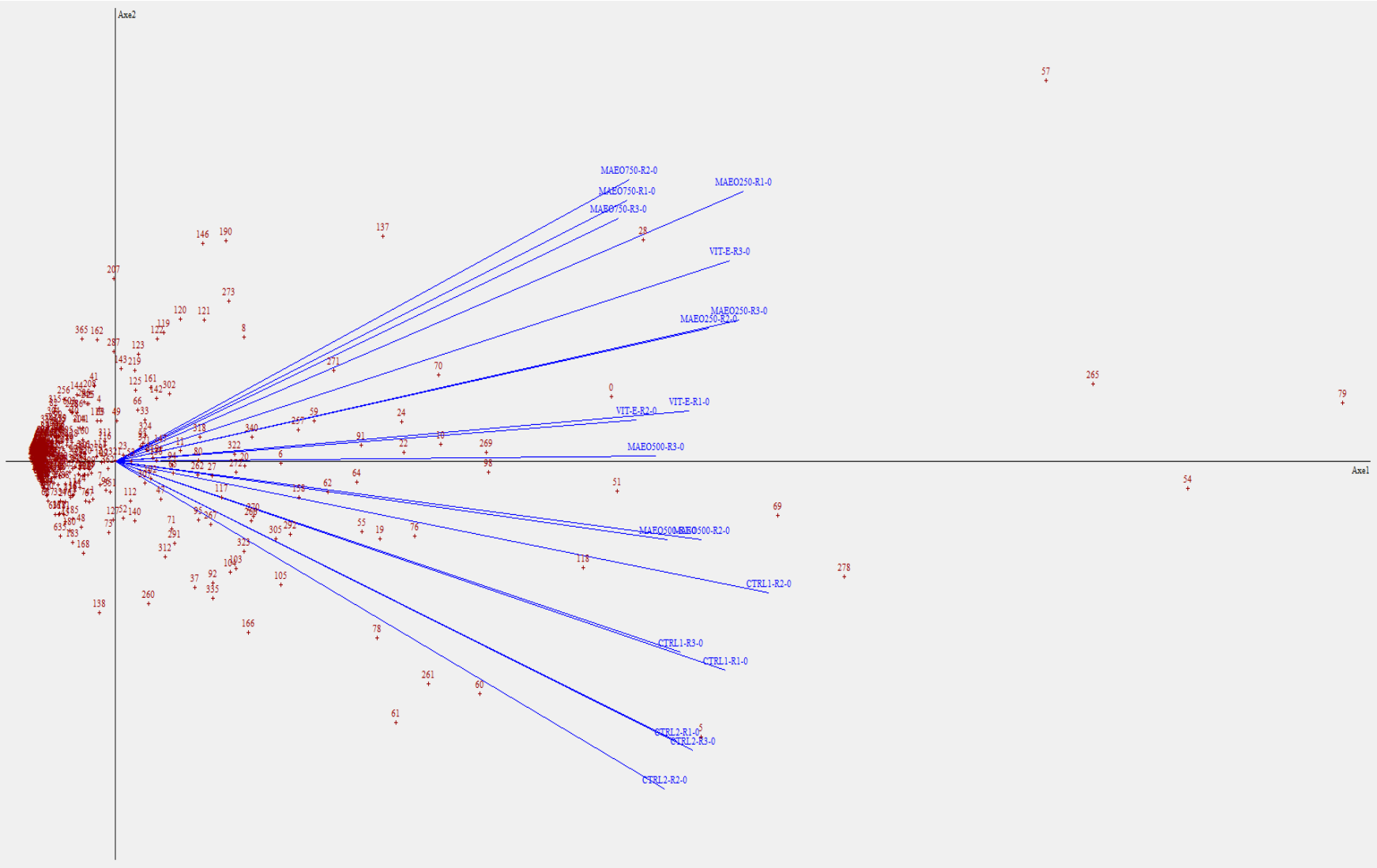
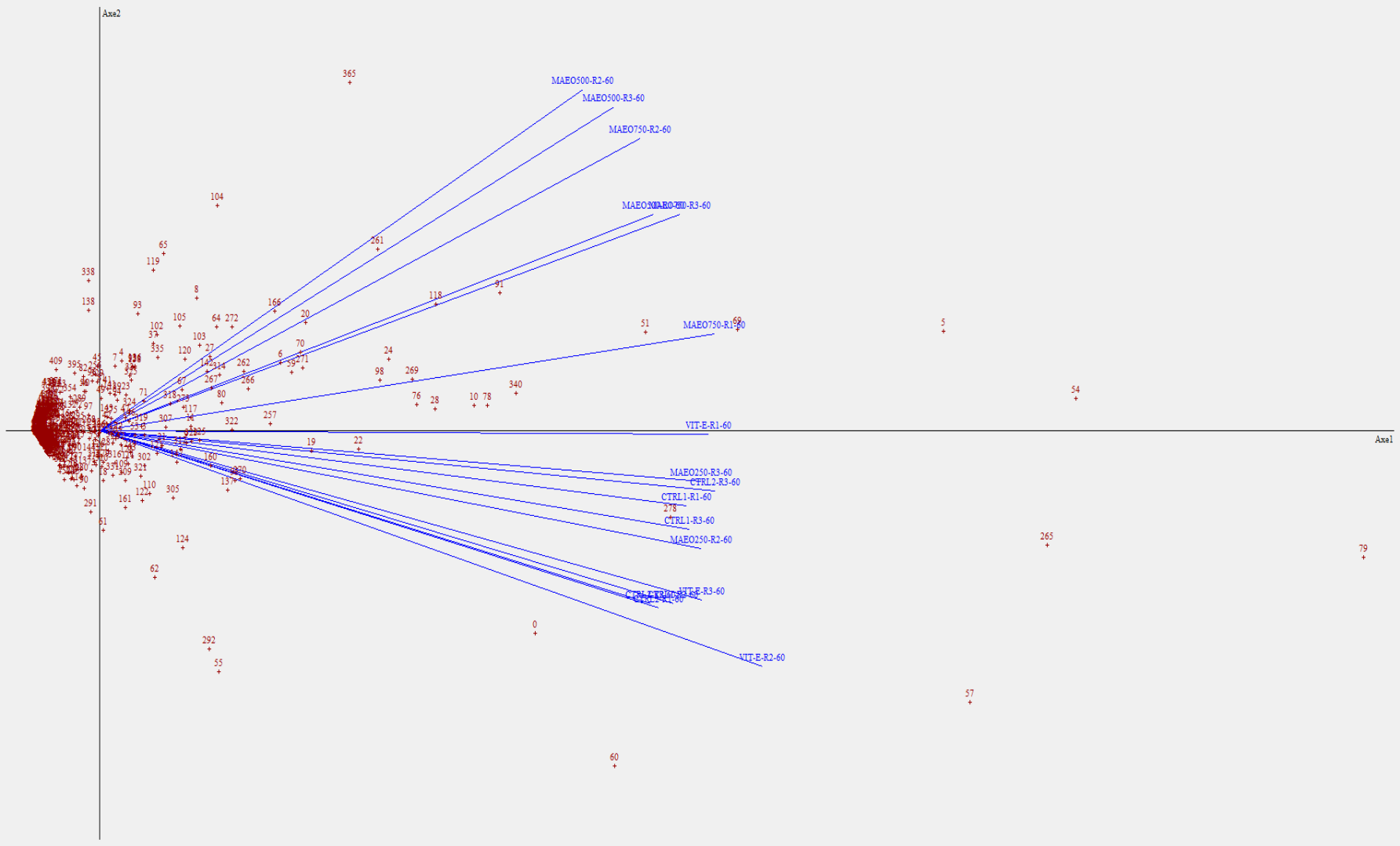


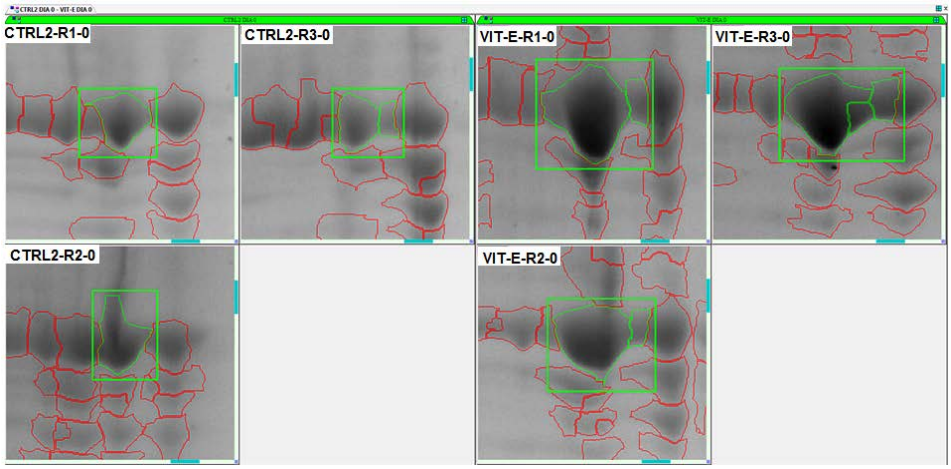
Figura 5-12: Proyección de factores para geles de muestras de yemas de huevos almacenados 60 días a 4 °C.



La comparación entre clases permitió detectar *spots* únicos en cada una e identificar *spots* presentes en las dos poblaciones cuya expresión fue estadísticamente diferente. Algunos ejemplos de los *spots* que se encontraron con expresión diferencial se muestran en las figuras 5-13 y 5-14.

Figura 5-13: Ejemplo de la expresión diferencial de algunas proteínas en los geles bidimensionales (Resaltados en color verde). A. *spot* 28, clase T2-DÍA 0 vs. T3-DÍA 0 (Anova 0.007, Kolmogorov-Smirnov 1). B. *spot* 70, clases T2-DÍA 0 vs. T4- DÍA 0 (Anova 0.009; Kolmogorov-Smirnov 1).

A.



B.

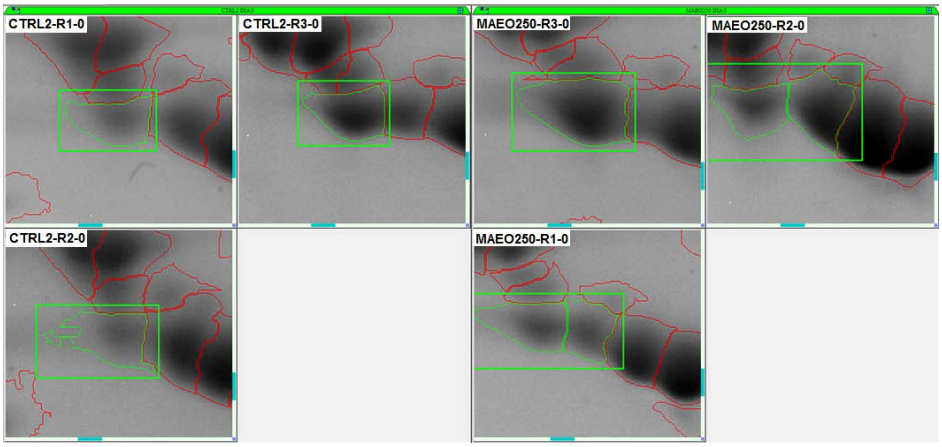
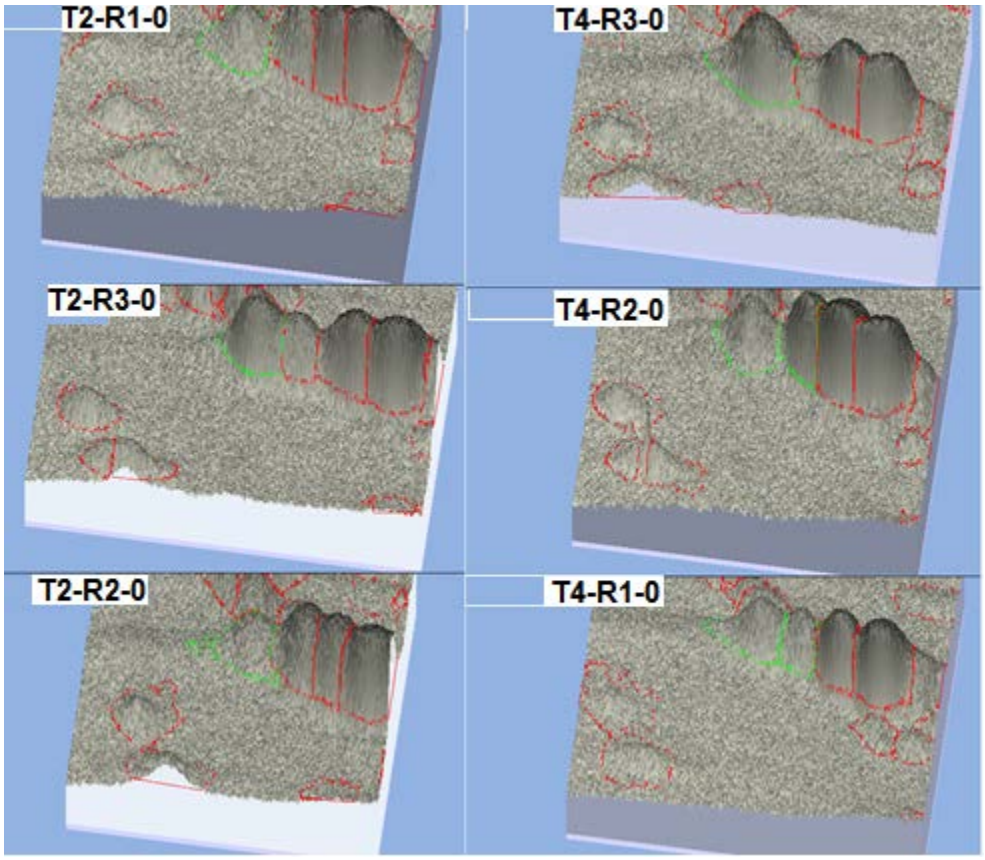


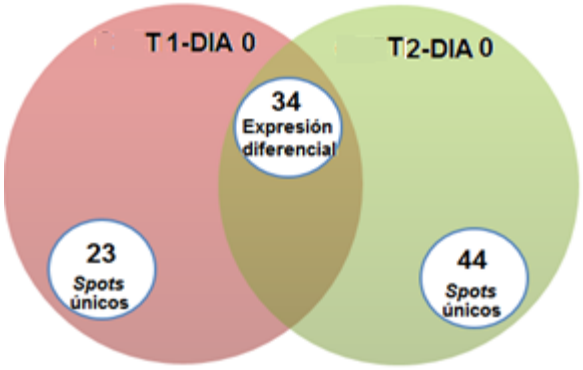
Figura 5-14: Vista en tres dimensiones del *spot* 70 (Resaltados en verde) encontrado en las clases T2-DÍA 0 vs. T4- DÍA 0 con expresión diferencial (Anova 0.009; Kolmogorov-Smirnov 1).



Efecto del enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados sobre el proteoma de yema de huevos frescos

La comparación del proteoma de yema entre los grupos T1-DÍA 0 y T2-DÍA 0 mostró que un 83,61% de los *spots* comparados (238) fueron comunes en ambos tratamientos, sin embargo, como se puede detallar en la figura 5-15, el enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados produjo un cambio en la expresión de un 19,88% de estos *spots* compartidos teniendo en cuenta los resultados del análisis estadístico (Kolmogorov-Smirnov, 0.01 D>0.61661). Cabe mencionar que también se encontraron diferencias por efecto del enriquecimiento, teniendo en cuenta la presencia de *spots* únicos en cada tratamiento que en conjunto representan un 16,38%.

Figura 5-15: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación de los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos de los tratamientos T1 y T2.[6]



Efecto de la adición de antioxidantes sobre el proteoma de yema de huevos frescos, enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados

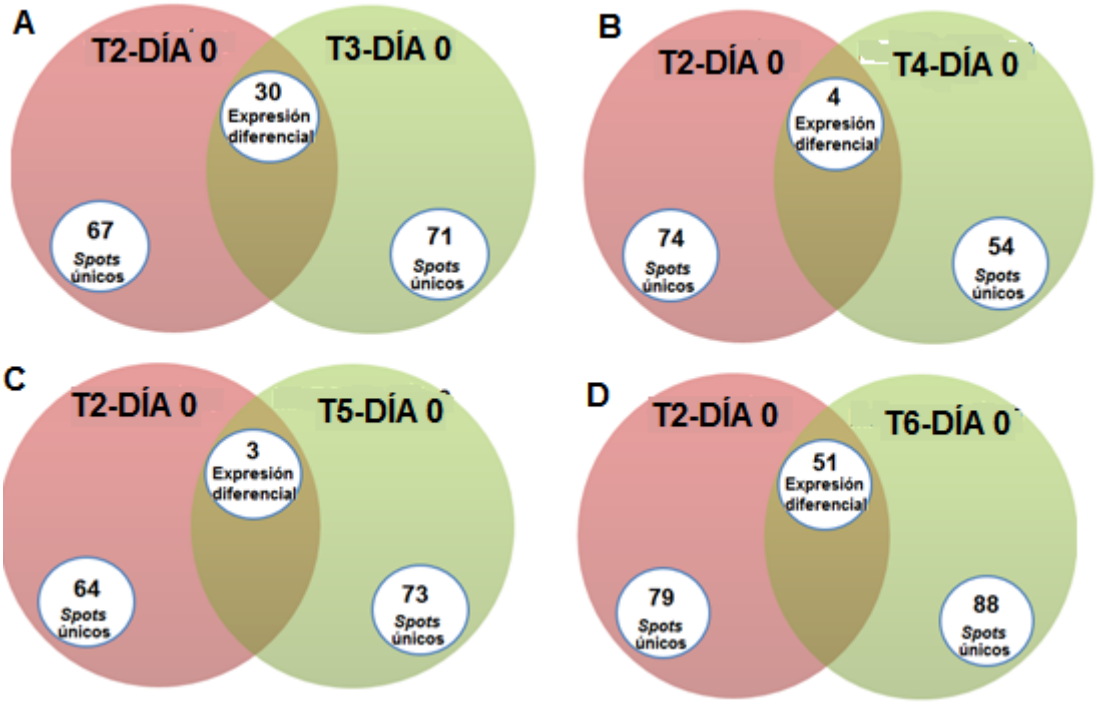
La comparación del proteoma de yema entre los grupos T2-DÍA 0 y T3-DÍA 0 mostró que un 68,20% de los *spots* comparados (286) fueron comunes en ambos tratamientos, sin embargo, como se puede detallar en la Figura 5-16 (A), la adición de 200 mg/kg de vitamina E produjo un cambio en la expresión de un 20,27% de estos *spots* compartidos teniendo en cuenta los resultados del análisis estadístico (Kolmogorov-Smirnov, 0.01 D>0.61661). Cabe mencionar que también se detectaron *spots* únicos en cada tratamiento que en conjunto representan un 31,79 % y que pueden estar relacionados con cambios debido a la adición de la vitamina E.

De otro lado, se observó que al comparar el proteoma de la yema del grupo control (T2-DÍA 0) con el proteoma de yema de gallinas suplementadas con 250 mg/kg de MAEO se encontró que compartían un 68,78% de los *spots* comparados (269), sin embargo, como se puede detallar en la Figura 5-16 (B), la adición del suplemento produjo un cambio en la expresión de un 2,83% de estos *spots* compartidos. De igual manera, se detectaron *spots*

[6] Los círculos de color rojo y verde representan el conjunto de *spots* de las clases comparadas y la media de los valores de intensidad, volumen y área de sus réplicas (*Fold*). En la intersección de los conjuntos se representan los *spots* pareados en ambos conjuntos y se resalta en un círculo blanco el número de *spots* que tienen expresión estadísticamente diferencial dentro de esta. Los *spots* que son únicos en cada clase se destacaron usando círculos blancos dentro de cada conjunto de spots en cada clase.

únicos en cada tratamiento que en conjunto representan un 31,21 %, la presencia de estos *spots* podría estaría relacionada con la suplementación en esta dosis.

Figura 5-16: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos.



La comparación del proteoma de yema del grupo control (T2-DÍA 0) con el proteoma de yema de gallinas suplementadas con 500 mg/kg de MAEO mostró que compartían un 68,79% de los *spots* comparados (288), sin embargo, como se puede detallar en la Figura 5-16 (C), la adición del suplemento produjo cambios en la expresión de un 1,98% de estos *spots* compartidos. De igual manera, se detectaron *spots* únicos en cada tratamiento que en conjunto representan un 31,20%.

La comparación del proteoma de yema del grupo control (T2-DÍA 0) con el proteoma de yema de gallinas suplementadas con 750 mg/kg de MAEO mostró que compartían un 62,30% de los *spots* comparados (301), sin embargo, como se puede detallar en la Figura

5-16 (D), la adición del suplemento produjo un cambio sobre la expresión de un 36,95% de estos *spots* comunes. De igual manera, se detectaron *spots* únicos en cada tratamiento que en conjunto representan un 37,69%.

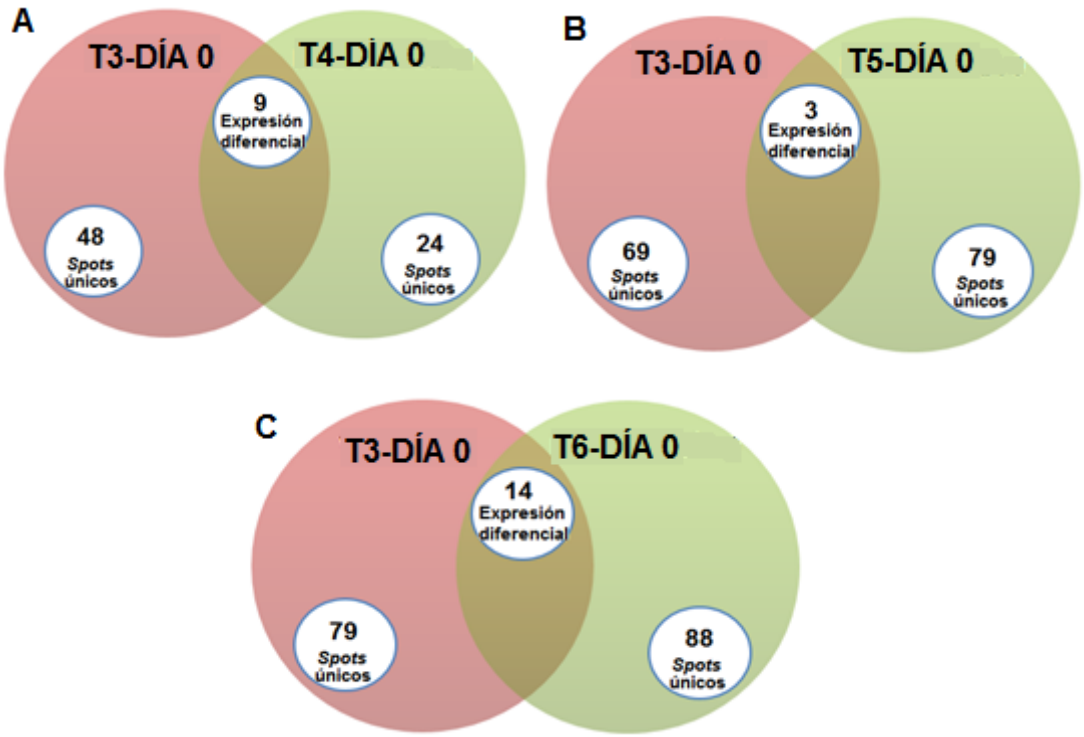
Efecto del tipo de antioxidante (vitamina E vs. aceite esencial de orégano) sobre el proteoma de yema de huevos frescos, enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados

El efecto del tipo y dosis de antioxidante suplementado en la dieta sobre el proteoma de la yema se evaluó comparando el proteoma obtenido con la suplementación de 200 mg/kg de vitamina E (T3-DÍA 0) con los proteomas de yema de gallinas suplementadas con 250, 500 y 750 mg/kg de MAEO (Figura 5-17). En la figura 5-17(A) se muestra que los *spots* compartidos fueron un 82,60% de los *spots* comparados (243), adicionalmente, se encontró que la adición de 250 mg/kg de MAEO produjo cambios en la expresión de aproximadamente un 5,26% de estos *spots* comunes. De igual manera, se detectaron *spots* únicos en cada tratamiento que en conjunto representan un 17,39 % que también podrían estar relacionados con la suplementación con MAEO.

La Figura 5-17(B) muestra la comparación del perfil proteómico de los tratamientos T3-DÍA 0 y T5-DIA 0, los *spots* compartidos fueron un 66,21% de los *spots* comparados (293), adicionalmente, se encontró que la adición de 500 mg/Kg de MAEO produjo cambios en la expresión de aproximadamente un 2,06% de estos *spots* comunes. De igual manera, se detectaron *spots* únicos en cada tratamiento que en conjunto representan un 33,78%.

La comparación de los perfiles proteómicos de yema en los tratamientos T3-DÍA 0 y T6-DÍA 0 se representa en la Figura 5-17(C), el análisis de imágenes mostró que los proteomas compartían *spots* en un 62,63 % de los *spots* comparados (307). El análisis estadístico mostró que la suplementación con 750 mg/kg de MAEO en la dieta de las ponedoras produjo cambios en la expresión de aproximadamente el 10% de los *spots* compartidos. Adicionalmente, se detectaron *spots* únicos en cada uno de los tratamientos con un 37,36% de los *spots* totales analizados.

Figura 5-17: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación 3 de los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos.

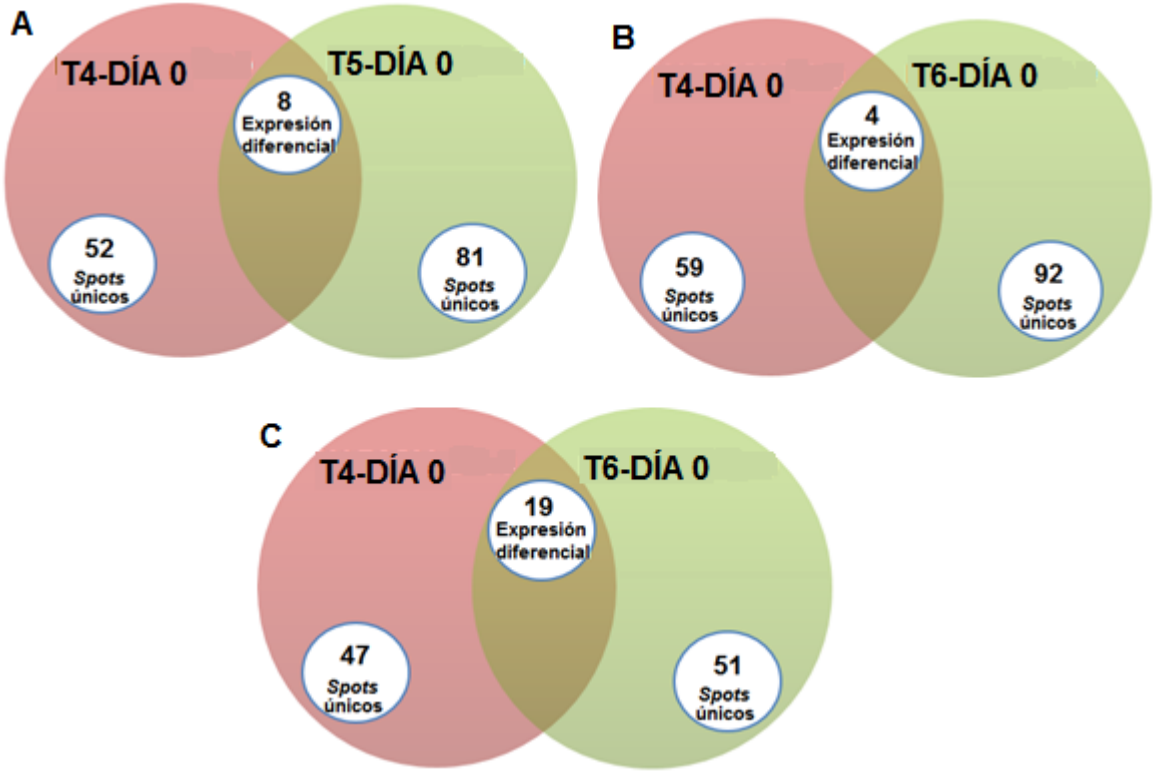


Efecto de las dosis de MAEO sobre el proteoma de yema de huevos frescos, enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados

Los perfiles proteómicos de los tratamientos que recibieron suplementación con el producto micronizado de aceite esencial se compararon entre sí con el fin de hallar las diferencias en la expresión de proteínas por efecto de la dosis recibida. La Figura 5-18(A) muestra la comparación de los perfiles obtenidos con T4-DÍA 0 y T5-DÍA 0. La comparación de un total de 276 spots permitió identificar *spots* únicos en los perfiles que representan el 31,74%, *spots* comunes en los dos tratamientos con un 68,25%, de los cuales el 5,59% de ellos presentaron expresión diferencial por efecto del aumento de la dosis de MAEO suplementada. Cabe mencionar, que todos los cambios generados por el tratamiento pueden no verse completamente, ya que, puede haber proteínas sobrelapadas.

La figura 5-18 (B) muestra la comparación de los perfiles obtenidos con T4-DÍA 0 y T6-DÍA 0. La comparación de un total de 287 spots permitió identificar *spots* únicos en los perfiles que representan el 35,69%, *spots* comunes en los dos tratamientos con un 64,30%, de los cuales el 2,94% de ellos presentaron expresión diferencial por efecto del aumento de la dosis de MAEO.

Figura 5-18: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación 4 de los perfiles proteicos de yemas de huevos frescos.



La figura 5-18 (C) muestra la comparación de los perfiles obtenidos con T5-DÍA 0 y T6-DÍA 0. La comparación de un total de 275 spots permitió identificar *spots* únicos en los perfiles que representan el 21,68 %, *spots* comunes en los dos tratamientos con un 78,31 %, de los cuales el 10,73 % de ellos presentaron expresión diferencial por efecto del aumento de la dosis de MAEO.

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el proteoma de la yema de huevo en los diferentes tratamientos experimentales

Los cambios en el perfil proteómico de la yema por efecto del almacenamiento de los huevos a 4°C durante 60 días se evaluaron en cada uno de los tratamientos dietarios implementados. La Figura 5-19 muestra diagramas poblacionales de los *spots* de proteína que se compararon y que presentaron expresión diferencial con respecto a los *spots* identificados en los proteomas de las yemas de huevos frescos, teniendo en cuenta el análisis estadístico realizado (Kolmogorov-Smirnov, 0.01 D>0.61661).

La comparación de los perfiles obtenidos con los tratamientos T1-DÍA 0 y T1-DÍA60 permitió identificar un total de 309 *spots* de los cuales el 66,81% eran comunes entre los proteomas, sin embargo, se encontraron diferencias por efecto del tiempo de almacenamiento de los huevos en el 1,29 % de los *spots*, ya que, presentaron expresión diferencial. La expresión del spot 22 disminuyó por efecto del tiempo de almacenamiento, mientras que el spot 143 aumentó su expresión. Adicionalmente, se detectaron *spots* únicos en los perfiles que representan un 33,18 % de la población total.

Por otro lado, se encontró que al comparar los perfiles proteómicos del tratamiento control enriquecido con ácidos grasos poliinsaturados (T2-DÍA 0 vs T2-DÍA 60) se presentaron *spots* comunes en sus perfiles aproximadamente en un 59,41% del total (336) de los cuales el 4,92% se expresaron diferencialmente. El efecto del tiempo de almacenamiento produjo un aumento en la abundancia de seis *spots* (32, 37, 48, 64, 140, 351) en el proteoma, mientras solo un *spot* (137) disminuyó su abundancia significativamente. Cabe mencionar que se detectaron *spots* únicos de cada población los cuales se estimaron en un 40,58 % del total de *spots* comparados, la expresión y supresión de estos spots fue influenciada por cambios producidos en el tiempo de almacenamiento.

La comparación de los perfiles proteicos del tratamiento suplementado con vitamina E en 200 mg/kg en los dos tiempos de almacenamiento (T3-DÍA 0 vs T3-DÍA 60) permitió identificar en total 308 *spots* de los cuales el 66,37 % eran compartidos en ambos perfiles, sin embargo, el tiempo de almacenamiento produjo la expresión diferencial del 6,53% de

estos. La expresión diferencial se presentó en 10 *spots* de los cuales 8 disminuyeron su abundancia en el día 60 (92, 94, 103, 105, 118, 140, 141, 219) y solo 2 aumentaron su expresión (18, 340). Al igual que en los casos anteriores, se encontraron *spots* únicos en cada población y la sumatoria de estos se correspondió a un 33,62 % del total de *spots* comparados.

Al comparar los perfiles obtenidos con la suplementación de 250 mg/Kg de MAEO en yemas de huevos frescos y almacenados (T4-DÍA 0 vs. T4-DÍA 60), se identificaron 303 *spots* de proteína de los cuales el 65,33 % fueron *spots* comunes. El tiempo de almacenamiento produjo la expresión diferencial de 3,40% de los *spots* compartidos. La expresión diferencial se vio en el aumento de la abundancia de los *spots* 7 y 111, mientras que, los *spots* 2, 8 y 121 disminuyeron su expresión. Además, se detectaron diferencias por la presencia de *spots* únicos en ambos tratamientos, la sumatoria total de sus porcentajes fue del 34,66 %.

La comparación de los proteomas de yema obtenidos con la suplementación de 500 mg/Kg de MAEO en los huevos frescos y almacenados (T5-DÍA 0 vs. T5-DÍA 60) se realizó comparando *316 spots,* de los cuales el 64,08 % fueron *spots* comunes. El tiempo de almacenamiento produjo la expresión diferencial sobre el 2,01% de los *spots* comunes. La expresión del *spot* 29 disminuyó, mientras que, los *spots* 65 y 316 aumentaron su abundancia con el almacenamiento. Los *spots* únicos de cada población se consideraron en conjunto como el 35,91 % de los *spots* totales.

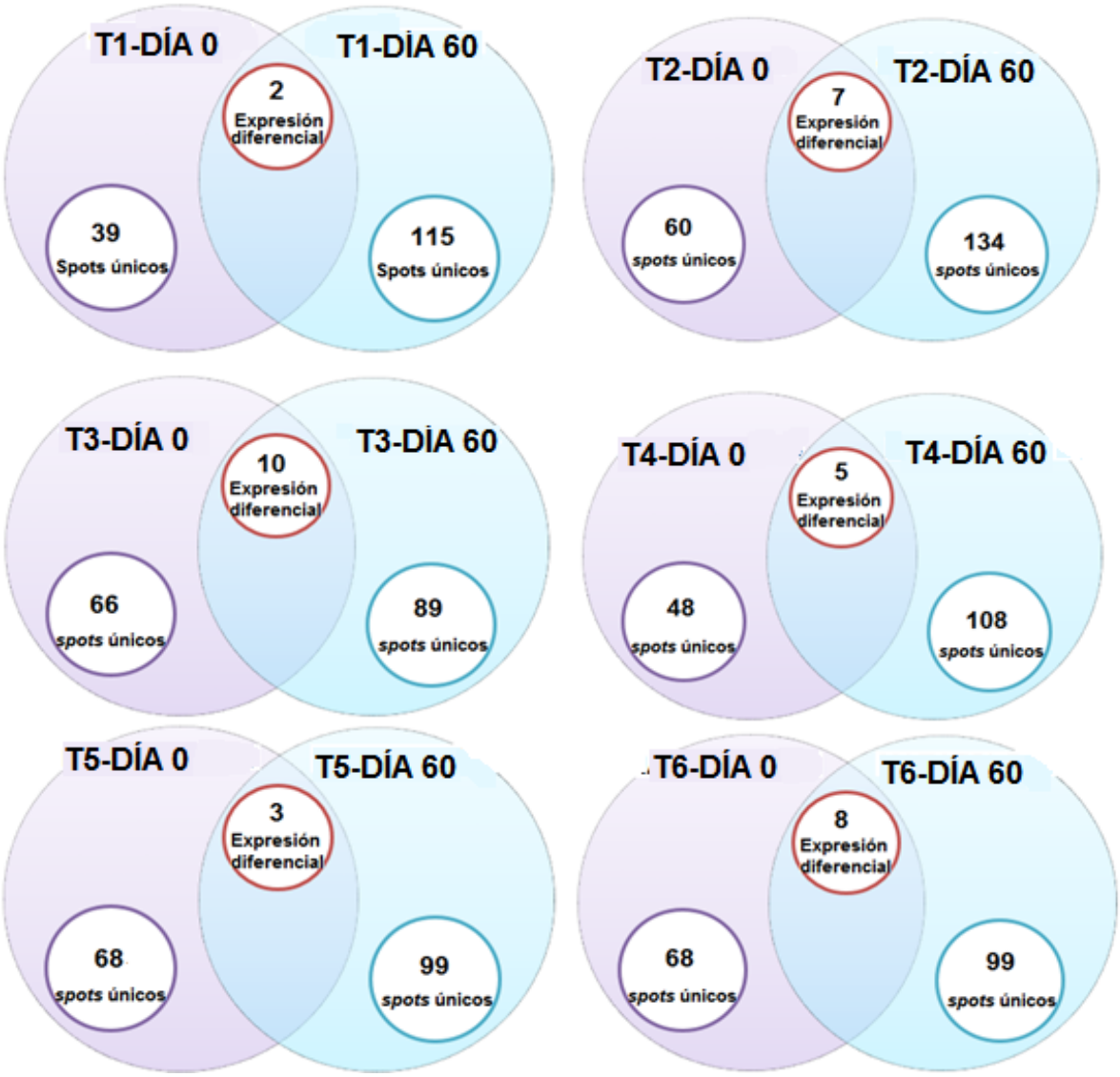
Por último, el perfil proteómico de la yema de huevo obtenido con la suplementación de 750 mg/kg de MAEO se comparó con el perfil proteómico de la yema de huevos almacenados 60 días a 4°C (T6-DÍA 0 vs T6-DÍA 60). La comparación permitió evaluar las diferencias entre un total de 311 *spots*, de los cuales se determinó que el 63,77% se encontraban presentes en ambos perfiles, sin embargo, se estimó mediante el análisis estadístico que aproximadamente el 5,44% de los *spots* compartidos presentaban expresión diferencial por efecto del almacenamiento.

La abundancia de los *spots* aumento en los spots 105, 267 y 307, mientras que, los *spots* 121, 143, 219, 273 y 304 disminuyeron significativamente su expresión en el proteoma. El

tiempo de almacenamiento influyó en la expresión y supresión de *spots* de proteína únicos en cada perfil proteico, los *spots* únicos se estimaron en un 36,22% en total para las dos poblaciones comparadas.

En general, en todas las comparaciones realizadas anteriormente se observaron cambios en el perfil ($P<0.01$) con un incremento en el número de *spots* de proteína únicos siendo en su orden los de mayores diferencias T1 (49.4%), T4 (38.5%), T2 (38.1%), T5 (18.6%), T6 (18.6%) y T3 (14.8%). La aparición de nuevas proteínas o *spots* únicos por efecto del almacenamiento según un estudio reportado por Omana en el 2011 para claras de huevo en almacenamiento, se debe a la proteólisis debido al aumento en el pH del huevo. El aumento del pH en la clara de huevo se presenta como una transformación de la albúmina densa a liquida, este cambio posiblemente involucra H_2CO_3, uno de los componentes del sistema buffer del albumen, el cual es disociado en agua y CO_2, se incrementan las pérdidas de humedad, las pérdidas de CO_2, conllevan a la alcalinización del huevo (Estrada, et al., 2010). El aumento del pH en la clara durante el almacenamiento parece ser la principal razón para el cambio de las propiedades físico-químicas de las proteínas de la clara de huevo, que lleva a perder la naturaleza viscosa del huevo (Omana, et al., 2011). Los cambios en el pH de la clara de huevo podrían influenciar cambios en la yema de huevo y sus proteínas constituyentes.

Figura 5-19: Representación de los *spots* de proteína con expresión significativa encontrados en la comparación 5 de los perfiles proteómicos de yemas de huevos frescos y almacenados.[7]



[7] Los círculos de color morado y azul representan el conjunto de *spots* de las clases comparadas y la media de los valores de intensidad, volumen y área de sus réplicas (*Fold*). En la intersección de los conjuntos se representan los *spots* pareados en ambos conjuntos y se resalta en un círculo blanco el número de *spots* que tienen expresión estadísticamente diferencial dentro de esta. Los *spots* que son únicos en cada clase se destacaron usando círculos blancos dentro de cada conjunto de *spots* en cada clase.

Teniendo en cuenta las diferencias en la expresión de algunos *spots* de proteínas en el Anexo E, Tabla 8-8 se proponen los *spots* que podrían ser analizados usando espectrometría de masas para la identificación de las proteínas que presentan cambios en el proteoma por efecto de los tratamientos experimentales y el tiempo de almacenamiento.

Los reportes sobre los efectos del AEO sobre la actividad de las enzimas antioxidantes, la estabilidad oxidativa de los lípidos y los cambios proteómicos del huevo durante el tiempo de almacenamiento, son escasos, aspecto que dificulta la comparación de estas variables y los resultados que han sido presentados con anterioridad. Por esta razón, los cambios producidos en las variables por efecto de la suplementación con MAEO durante el tiempo de almacenamiento de los huevos, se relacionaron mediante el análisis de correlación de Pearson, ya que, se consideró fundamental establecer relaciones entre las respuestas producidas por cada una de ellas con el fin de complementar los análisis realizados hasta ahora. La Tabla 5-14 presenta un resumen de los valores de correlación entre las respuestas producidas por efecto del tiempo de almacenamiento en algunas de las variables evaluadas usando los datos específicos de los tratamientos suplementados con MAEO (T4, T5, T6) y el tratamiento control enriquecido con AGPI (T2).

Tabla 5-13: Correlaciones entre variables respuesta en la yema de huevos.

	Timol	**SOD**	**CAT**	**GSH-Px**	**MDA**
Timol	**1.000**	0.9595	-0.7945	0.3059	-0.4364
SOD		**1.000**	0.9782	-0.2341	0.3098
CAT			**1.000**	-0.4301	-0.9498
GSH-Px				**1.0000**	-0.6127
MDA					**1.0000**

Los cambios producidos por efecto de la suplementación con MAEO y el tiempo de almacenamiento de los huevos sobre las variables estudiadas, se optó por realizar análisis de correlación entre algunas de ellas, ya que, se consideró fundamental establecer relaciones entre las respuestas producidas por cada una de ellas. El análisis mostró que

existe una relación baja e inversamente proporcional entre la concentración de timol (Tabla 5-1) y la concentración de MDA como indicador de peroxidación lipídica (Tabla 5-5) en la yema de los huevos producidos. De otro lado, los resultados indicaron que no existe una relación entre la concentración de MDA y la actividad de la SOD (Tabla 5-8). Sin embargo, con la actividad CAT se encontró una dependencia muy alta e inversamente proporcional, al igual que la correlación con la actividad GSH-Px, ya que, mostró una dependencia moderada e inversamente proporcional que puede sugerir que al aumentar la actividad de las enzimas CAT y GSH-Px en la yema disminuye la cantidad de MDA. La concentración de timol depositada en la yema y la actividad enzimática de la SOD mostraron una relación fuerte de tipo positiva que indica una proporcionalidad directa, con la CAT se encontró una relación alta de tipo negativa que muestra una dependencia inversamente proporcional.

6. Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La suplementación de gallinas ponedoras con el producto micronizado de aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* permitió producir huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados y adicionalmente con un contenido de timol en yema.

Las concentraciones de timol en la yema aumentaron proporcionalmente a medida que se incrementó la dosis del suplemento en la dieta. Sin embargo, durante el tiempo de almacenamiento se produjo la disminución de timol en la yema debido a la posible inactivación de especies reactivas y radicales libres.

La presencia de antioxidantes en la yema de huevo provenientes de la suplementación tuvo efecto en la disminución de la migración de agua desde la clara a la yema de huevo durante el almacenamiento, probablemente debido al efecto antioxidante del timol que retarda el ataque de los radicales libres a los lípidos constituyentes de la membrana vitelina, manteniendo las yemas firmes y consistentes durante mayor tiempo.

La concentración de MDA en la yema aumentó con el tiempo de almacenamiento (60 días). Sin embargo, la adición de vitamina E y MAEO en las dosis empleadas en este trabajo produjo una reducción del proceso de oxidación de la matriz lipídica de los huevos enriquecidos con AGPI en la dieta de las ponedoras. Adicionalmente, se menciona que estos aditivos no tuvieron efecto sobre la síntesis de lípidos.

La adición de MAEO incrementó la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa en la yema, lo cual contribuyó a disminuir la peroxidación lipídica de la misma durante el tiempo de almacenamiento de los huevos.

La adición de MAEO logró retardar la perdida de actividad de la enzima superóxido dismutasa en la yema de huevos enriquecidos con AGPI durante el tiempo de almacenamiento, con respecto a los tratamientos no suplementados.

La evaluación de los perfiles proteicos permitió realizar un primer acercamiento a la caracterización del proteoma de yema de huevo de gallinas ponedoras alimentadas con dietas enriquecidas con AGS y AGPI, suplementadas con antioxidantes como la vitamina E y un producto micronizado de aceite esencial de orégano.

Se estableció un protocolo para la comparación y evaluación de los perfiles electroforéticos en una y dos dimensiones de muestras de yema de huevo, el protocolo permitió la obtención de geles de alta resolución y reproducibilidad. El protocolo establecido involucró el uso de la precipitación de las proteínas por el método Etanol/Cloroformo, reconstitución de las proteínas en buffer de disolución Urea-Tiourea, separación usando tiras IPG pH 3-10 L y geles al 10% de acrilamida. La tinción de los geles se realizó con azul de *coomassie* coloidal G-250. Las imágenes se analizaron mediante el programa Melanie 7.0 y permitió encontrar diferencias de expresión entre proteínas por efecto del enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados, por la adición de antioxidantes, por el tipo de antioxidante y por el incremento de la dosis de MAEO en la dieta.

6.2 Perspectivas y recomendaciones

Se recomienda realizar la identificación de otros componentes depositados en la yema de huevo además del timol con el fin de corroborar que los efectos producidos sobre la actividad enzimática y la estabilidad oxidativa son producidos en su mayoría por este componente.

Se recomienda incluir pruebas de análisis de oxidación de proteínas, recordando que estos componentes también son susceptibles de sufrir cambios durante el almacenamiento de los huevos, esto ayudaría a verificar el estado y calidad de las proteínas en el huevo después del tiempo de almacenamiento.

Se espera identificar las proteínas que presentaron cambios de expresión diferencial por análisis de espectrometría de masas con el fin de encontrar una relación entre estas proteínas y correlacionar los resultados metabólicos.

Se recomienda evaluar los efectos de la suplementación con MAEO en otras matrices como el hígado, el suero sanguíneo, e incluir el análisis de los efectos a nivel de enzimas gástricas, con el fin de correlacionar los efectos positivos que ha tenido la suplementación con el aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* a nivel productivo.

7. Financiación

Este trabajo recibió financiación por parte del Laboratorio de Nutrición Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- Corpoica y la Dirección de Investigación Sede Bogotá (DIB), Universidad Nacional de Colombia a través del proyecto "Evaluación del efecto antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* kunth) sobre la estabilidad oxidativa y calidad del huevo en condiciones de almacenamiento comercial" (Código DIB 23591).

Colciencias y la Dirección de Investigaciones Sede Bogotá apoyaron este proyecto mediante la participación de la estudiante en el programa para Jóvenes Investigadores e Innovadores – Convocatoria 617 de 2013.

8. Producción

Con los avances de esta investigación se presentaron los siguientes productos:

Presentación en eventos científicos:

- EN Durán C, R E Ortiz C, O L Mayorga M, A Umaña P, C Ariza N. Cuantificación de timol en yema de huevo de gallinas suplementadas con aceite esencial de orégano nativo usando cromatografía liquida de alta eficiencia. XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines y VII Congreso Colombiano de Cromatografía. Resumen (Memorias) y presentación en modalidad de Poster.

Participación en eventos científicos:

- Asistente en “Theoretical Course: Advances in Lipid-Protein Interactions: Understanding their importance and modulation in Cell Physiology” Agosto 18 – 24 de 2014, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Morelos, México.

A. Anexo: Composición química del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* suplementado en la dieta de las gallinas ponedoras

Tabla 8-1. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes (> 0.01%) del AE de orégano *L. origanoides* Kunth extraído por arrastre con vapor.

Componentes	**t R^1 / min**	**Cantidad relativa (%)**
3-Metil-3-butenol	8,8	< 0,1
3-Metil-2-butenal	10,84	< 0,1
Acetato de pentenilo	15,07	0,1
α-Tujeno	17,1	0,4
α-Pineno	17,48	0,2
Canfeno	18,26	< 0,1
1-Octen-3-ol	19,41	< 0,1
β-Pineno	19,49	< 0,1
β-Mirceno	19,86	2,4
α-Felandreno	20,69	0,2
δ-3-Careno	20,8	0,1
α-Terpineno	21,15	1,3
p-Cimeno	21,52	6,7
Limoneno	21,69	0,4
β-Felandreno	21,81	0,4
trans-β-Ocimeno	22,29	0,1
Ɣ-Terpineno	22,91	3,9
cis-Hidrato de sabineno	23,43	0,2
Terpinoleno	24,03	0,1
6,7-Epoximirceno	24,15	0,1
p-Cimeneno	24,22	0,1
Linalool	24,5	0,4
trans-Hidrato de sabineno	24,71	< 0,1

Terpinen-4-ol	27,9	0,8
Compuesto oxigenado (M+ 154)	28,05	0,3
p-Cimen-8-ol	28,22	0,1
α-Terpineol	28,64	0,1
Timol metiléter	29,54	1
Piperitona	31,48	0,2
Timol	32,04	69
Carvacrol	32,19	0,2
Acetato de Timilo	33,92	1,2
Eugenol	34,24	
α-Copaeno	35,37	0,1
trans-β-Cariofileno	37,08	3,8
cis-α-Bergamoteno	37,28	0,3
Compuesto oxigenado (M+ 204)	37,36	0,3
Aromadendreno	37,69	0,2
trans-β-Farneseno	37,75	< 0,1
α-Humuleno	38,28	2,1
9-epi-(E)-cariofileno	38,42	0,1
Compuesto oxigenado (M+ 180)	38,57	0,4
4-Dieno-trans-cadina-1(6)	38,69	< 0,1
Ɣ-Muuroleno	38,77	0,1
Viridifloreno	39,36	0,3
α-Muuroleno	39,5	0,1
β-Bisaboleno	39,69	0,9
Ɣ-Cadineno	40,02	0,1
δ-Cadineno	40,1	0,2
α-(Z)-Bisaboleno	40,64	0,2
Espatulenol	42	0,1
Oxido de cariofileno	42,21	0,4
Epoxido II humuleno	42,98	0,1

[1] Tiempo de retención en minutos.

B. Curva de calibración de la cuantificación de timol en yema de huevo por HPLC

Tabla 8-2: Curva de calibración para la cuantificación de timol por HPLC.

Timol [µg/mL]	Área bajo la curva (U.A.)
0.102	878.67
0.256	1455.17
0.512	2759.83
0.768	3824.17
1.024	4459.17
ESM[1]	83.492
y = 4325.8x + 308.48	R^2 = 0.9813

[1] Error estándar de la media.

C. Anexo: Curva de calibración para la cuantificación de malondialdehído en la yema de huevo

Tabla 8-3: Curva de calibración de malondialdehído.

MDA [ng/mL]	A[1] (532 nm)
10	0.0094
20	0.0178
30	0.0298
40	0.0440
50	0.0506
60	0.0600
70	0.0706
80	0.0804
90	0.0906
ESM[2]	0.0021
y = 0.001x – 0.0003	R^2 = 0.9999

[1] Absorbancia.
[2] Error estándar de la media.

D. Anexo: Curvas de cuantificación de actividad antioxidante enzimática y proteínas en la yema de huevo

Tabla 8-4: Curva de inhibición de la SOD en el ensayo WSZ-1 con 20 minutos de incubación a 37 ºC.

Concentración SOD [U/mL]	% Inhibición
0.001	0.000
0.01	10.000
0.05	20.200
0.1	23.770
1	47.210
5	70.000
10	84.610
20	91.570
50	94.850
100	94.950
200	95.300
ESM[1]	2.456
y = 16.919x – 21.45	R^2 = 0.9748

[1] Error estándar de la media.

Tabla 8-5: Curva de estándares de H_2O_2 para cuantificación de actividad catalasa en extractos de yema de huevo.

µmoles de H_2O_2	**A[1] (520 nm)**
0.0128	0.223
0.0256	0.421
0.05	0.916
0.0748	1.219
ESM[2]	0.017
y = 16.694x	R^2 = 0.993

[1] Absorbancia.
[2] Error estándar de la media.

Tabla 8-6: Curva de calibración para la cuantificación de proteína en extractos enzimáticos de yema de huevo.

ASB[1] [µg/mL]	**A[2] (660 nm)**
50	0
125	0.025
250	0.062
500	0.147
750	0.239
1000	0.410
1500	0.460
2000	0.676
ESM[3]	0.009
y = 0.0003x	R^2 = 0.9818

[1] Concentración de albúmina sérica bovina.
[2] Absorbancia.
[3] Error estándar de la media.

Tabla 8-7: Curva de calibración con Pearce 660 nm preparada en *buffer* de Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2 %, Anfolitos 0,2 % para la cuantificación de extractos proteicos.

ASB[1] [µg/mL]	**A[2] (655 nm)**
50	0.040
125	0.059
250	0.093
500	0.138
750	0.217
1000	0.292
1500	0.431
ESM[3]	0.015
y = 0.0003x	R^2 = 0.9947

[1] Concentración de albúmina sérica bovina.
[2] Absorbancia.
[3] Error estándar de la media.

E. Anexo: Curvas de cuantificación de actividad antioxidante enzimática y proteínas en la yema de huevo

Tabla 8-8: *Spots* con expresión diferencial en la yema de huevo por efectos de los diferentes tratamientos dietarios implementados.

ID de *spots* emparejados	*FOLD*	ANOVA	KOLMOGOROV- SMIRNOV
1	348.001	2,47E+01	0.666667
2	273.954	0.00698579	0.666667
7	67.294	4,99E+00	0.666667
13	152.079	4,00E-01	1
22	29.652	5,95E+01	0.666667
24	220.327	0.00135052	1
30	361.278	1,70E+00	0.666667
32	946.941	4,23E+01	1
33	392.331	0.00754973	0.666667
37	948.911	0.00428088	1
40	57.912	0.00187371	1
45	42.973	0.00584131	0.666667
46	11.342	0.00311976	1
47	797.721	0.00518686	0.666667
48	77.562	1,85E-01	1
50	596.795	9,39E+00	1
61	773.129	1,22E-05	1
62	242.958	9,12E-02	1
63	408.847	0.00286976	0.666667
64	352.272	0.00235528	1
65	412.639	2,31E-05	1
66	234.439	2,00E-01	1
71	642.939	3,09E-02	0.666667
72	88.559	2,85E+00	1
78	361.259	0.00238824	1
81	377.636	1,12E+01	0.666667
85	556.458	2,14E+01	0.666667

Tabla 8-8: *Spots* con expresión diferencial en la yema de huevo por efectos de los diferentes tratamientos dietarios implementados (Continuación).

ID de *spots* emparejados	*FOLD*	ANOVA	KOLMOGOROV- SMIRNOV
96	219.917	0.00106756	0.666667
97	420.459	1,43E-01	1
100	424.733	4,81E-06	0.666667
108	36.466	2,17E+00	1
110	485.902	0.00404399	0.666667
111	464.879	8,13E-03	0.666667
112	187.501	0.00832177	0.666667
113	446.244	0.00727085	0.666667
119	134.828	3,61E+01	1
129	257.392	1,55E+01	1
130	799.979	2,31E-02	1
131	375.103	0.00655283	0.666667
133	409.733	3,67E+01	0.666667
135	424.691	3,95E+01	1
141	954.828	5,30E+01	1
143	133.069	9,60E-02	0.666667
146	21.215	1,42E+00	1
149	553.571	2,66E+00	0.666667
150	230.985	3,43E-01	1
151	237.258	3,23E+00	1
153	295.732	0.00118252	1
154	630.539	6,89E-02	0.666667
155	917.958	1,99E+01	0.666667
161	527.934	0.00605252	0.666667
168	20.836	8,66E+01	1
172	474.496	4,92E-02	1
173	242.463	8,16E+00	1
176	375.181	4,87E+00	1
177	246.683	3,36E+01	1
185	910.284	1,52E-02	1
200	407.448	1,04E-01	1
204	849.649	3,91E+01	0.666667
205	462.357	0.00165431	0.666667
219	727.537	1,03E-01	0.666667
260	556.755	0.00119241	0.666667
273	125.333	8,89E-03	1
274	694.505	0.00925677	0.666667

Tabla 8-8: *Spots* con expresión diferencial en la yema de huevo por efectos de los diferentes tratamientos dietarios implementados (Continuación).

ID de *spots* emparejados	*FOLD*	ANOVA	KOLMOGOROV- SMIRNOV
276	984.335	8,74E-02	1
278	230.527	0.00789059	0.666667
287	905.517	5,77E+01	1
289	731.022	0.0032322	0.666667
290	911.176	0.00220385	1
295	290.778	8,55E-01	0.666667
299	265.242	0.00149619	0.666667
307	340.651	1,05E+00	1
308	652.703	0.00469676	1
311	701.301	5,25E-02	1
312	403.567	0.00137431	1
323	360.347	0.00292102	1
324	754.265	6,67E-03	1
328	794.049	8,86E+00	0.666667
329	62.073	2,14E+01	1
340	696.209	7,88E-03	1
347	86.283	3,19E+01	1
348	134.026	0.00200147	1
351	359.742	0.0040447	0.666667

9. Referencias Bibliográficas

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology,* Volumen 105, pp. 121-126.

Ahn, D. U. y otros, 2006. Sequential separation of main components from Chicken Egg Yolk. *Food Sci. Biotechnol,* Volumen 15, pp. 189-195.

Amadio, C., 2011. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *FCA UNCUYO,* pp. 237-245.

Arango, O., 2012. Actividad antioxidante del aceite esencial de Orégano (Lippia origanoides H.B.K) del Alto Patía. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial,* 10(2), pp. 79-86.

Arcila-Lozano, C. C., 2004. El oregano: propiedades, composición y actividad biologica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Volumen 54, pp. 100-111.

Ariza, C., 2013. *Effect of two chemotypes of oregano essential oil on growth performance and nutrient balance of broilers.* Indianapolis, Indiana July 8-12, s.n.

Asensi, M. & Sastre, J., 1994. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathiones in biological samples. *Analytical Biochemistry,* Volumen 217, pp. 323-328.

Avila-Ramos, F., 2012. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E on the lipid oxidation stability of cooked chicken breast meat. *Poultry Science,* Volumen 91, pp. 505-511.

Awade, A. C. & Efstathiou, T., 1999. Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl,* Volumen 723, pp. 69-74.

Aymond, W. M. & Van Elswky, M. E., 1995. Yolk thiobarbituric acid reactive substances and n-3 fatty acids in response to whole and ground flaxseed. *Poultry Science,* Volumen 74, pp. 1388 - 1394.

Baltik Junior, 2015. *Farmakokinetika, karvakrol i timol.* [En línea] Available at: http://www.baltikjunior.com/o-divljem-origanu/farmakokinetika-karvakrol-i-timol/
[Último acceso: 18 11 2015].

Baydar, H., Sagdic, O. & Ozkan, G., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control,* Volumen 15, pp. 169-172.

Beckman, J. S., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injuri from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Science,* Volumen 87, pp. 1620 - 1624.

Beeley, J. G., 1971. Ovomucoid heterogeneity examined by flat bed isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta,* Volumen 230, pp. 595-598.

Bell, D. D. & Weaver, W. D., 2001. *Commercial chicken meat & egg production.* 5 ed. s.l.:Kluwer Academic publishers.

Bendich, A. & Machlin, L. J., 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Biology & Medicine,* Volumen 2, pp. 419-444.

Beorlegui, C. B., Mateos, G. G. & Aedos, 1991. *Nutrición y alimentación de gallinas ponedoras.* España: Mundi Prensa Libros S.A.

Berardinelli, A. y otros, 2008. Physical-mechanical modifications of egg for food-processing durign storage. *Poultry Science,* Volumen 87, pp. 2117 - 2125.

Bernal, M. E., Menonca, J. & Manchini, F., 2003. *Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales.* 4 ed. s.l.:s.n.

Betancourt, L., 2012. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de Lippia Origanoides Kunth en pollos de engorde. *Rev. MVZ Córdoba,* 17(2), pp. 3033-3040.

Bioinformatics, Swiss Institute for Bioinformatics and Genebio- Geneva, 2008. *Melanie 2D Gel Analysis - Software,* s.l.: s.n.

Biswas, S. K. y otros, 2005. Curcumin induces glutathiones biosynthesis and inhibits NF-kB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scaveging activity. *Antioxid. Redox Signal,* Volumen 7, pp. 32-41.

Bitman, J. & Wood, D. L., 1980. Cholesterol and cholesteryl esters of eggs from various avian species.. *Poultry Science,* Issue 59, pp. 2014 - 2023.

Borel, J. P. & Monboisse, J. C., 1988. *Medical Science.* s.l.:s.n.

Botsoglou, N. A. y otros, 1994. Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal TissueAnimal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry,* Volumen 42, pp. 1931-1937.

Botsoglou, N. A. y otros, 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation on breast, thigh and abdominal fat tissues. *British Poultry Science,* Volumen 43, pp. 223-230.

Burley , R. W. & Vadehra, D. V., 1989. *The avian egg: chemistry and biology.* New York: Wiley.

Burton, G. W. & Traber, M. G., 1990. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu Rev. Nutr.,* Volumen 10, pp. 357-382.

Campbell, L., Raikos, V. & Euston, S. R., 2003. Modification of functional properties of egg white proteins. A review. *Nahrung/Food,* Volumen 47, pp. 369-376.

Canbolat, Ö., Karaman, S. & Filya, I., 2010. The effect of different doses of Oregano oil on corn silage digestive and rumen fermentation. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 16(6), pp. 933-939.

Carmagnol, F., Sinet Pierre, M. & Jerome, H., 1983. Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochimica et Biophysica Acta,* pp. 49-57.

Cass, A. E. G., 1985. Superoxide dismutases. *Top. Mol. Struct. Biol,* Volumen 6, pp. 121-156.

Cetingul, I. S., 2009. Effects of Oregano (Oregano Onites) on performance, hatchability and egg quality parameters of laying quails (Coturnix coturnix japonica). *J. Animal Science,* Volumen 8, pp. 467-477.

Cheeseman, K. H. & Slater, F. T., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Brazilian Medical Bulletin,* 49(3), pp. 588-603.

Chen, C., Yu, R., Owuor, E. D. & Kong, A. N., 2000. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea poliphenol components during cell surviva and death. *Arch. Pharma. Res,* Volumen 23, pp. 650-612.

Chen, J. Y., Lee, H. O., Latshaw, I. D. & Min, D. B., 1998. Alfa-tocoferol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary alfa-tocopherol. *Journal of food science,* Volumen 63, pp. 919-922.

Christaki, E. V., Bonos, E. M. & Florou-Paneri, P. C., 2011. Comparative evaluation of dietary Oregano, Anise and Olive leaves in laying japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science - Revista Brasileira de Ciencia Avícola,* 13(2), pp. 97-101.

Colegio de Postgraduados en Ciencias Agricolas, 2014. *NMX-F-345-S-1979. Huevo yema deshidratada o en polvo. Normas mexicanas. Dirección General de Normas..* [En línea] Available at: http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-345-S-1979.PDF [Último acceso: 07 2015].

D' Ambrosio, C. y otros, 2008. Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteome Res ,* Volumen 7, pp. 3461-3474.

Desert , C. y otros, 2001. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. *J Agric Food Chemistry,* Volumen 49, pp. 4553-4561.

Diplock, A., 1991. Antioxidant nutrients and disease preventionan overview. *AM. Journal of Clinical Nutrition,* Volumen 53, pp. 189-193.

Dyerberg, J. & Bang, H. O., 1974. Haemostic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet,* Volumen 54, pp. 438-463.

Estevez, M., Ramirez, R., Ventanas, S. & Cava, R., 2007. Sage and rosemary essetial oil versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. *Food Science and Technology,* Volumen 40, pp. 58-65.

Estrada, M. M., Galeano, L. F., Herrera, M. R. & Restrepo, L. F., 2010. Efecto de la temperatura y el volteo durante el almacenamiento sobre la calidad del huevo comercial. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias,* 23(2).

Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M. & El-Baroty, G., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection,* Volumen 5, pp. 665-667.

Farinazzo, A. y otros, 2009. Chicken egg yolk cytoplasmic proteom, mined via combinatorial peptide ligand libraries. *J Chromatography A,* Volumen 1216, pp. 1241-1252.

Federación Nacional de Avicultores de Colombia (Fenavi), 2015. *Come más huevo - Nutrición.* [En línea] Available at: http://www.comemashuevo.com/nutricion/4 [Último acceso: 08 12 2015].

Federación Nacional de Avicultores de Colombia, 2014. *Fondo Nacional Avicola. Estadisticas de Consumo Per Cápita.* [En línea] Available at: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160&Itemid=556#magictabs_rsf, Available from:

Federación Nacional de Avicultores- Fenavi, 2015. *Come más huevo - Nutrición.* [En línea] Available at: http://www.comemashuevo.com/nutricion/4 [Último acceso: 08 12 2015].

Fernández, J., Pérez-Álvarez, A. & Fernández, L. J., 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry,* Volumen 59, pp. 345-353.

Finkel, T., 1998. Oxygen radicals and signaling. Current Opinion in cell.. *Cell Biol,* 10(2), pp. 248 - 253.

Forgaguera, J. & Gómez, G., 2004. *Bioquímica.* San José: Universidad Estatal de Costa Rica a Distancia .

Fossati, P., Prencipe, L. & Berti, G., 1980. Use of 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic Acid/4-aminophenazone Chromogenic System in Direct Enzymic Assay of Uric Acid in Serum and Urine. *CLIN. CHEM,* 26(2), pp. 227-231.

Franchini, A. y otros, 2002. Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamins E and C. *Poultry Science,* Volumen 81, pp. 1744-1750.

Froning, G., 2008. *Egg products industry and future perspectives.* New Jersey: John Wiley &Sons, Inc.

Galati, G. & Brien, P. J. O., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine,* Volumen 37, pp. 287 - 303.

Galobart, J., 2001. *Effect of dietary supplementation with Rosemary extract and alpha-Tocopheryl Acetate on Lipid oxidation in eggs enriched with Omega 3- Fatty acids.* s.l.:s.n.

GRACE - Discovery Sciences, 2015. *Recommednded Reagent for GC Derivatization - Chemical modify your sample to improve the chromatography.* [En línea] Available at: https://grace.com/pharma-and-biotech/en-us/Documents/Analytical%20Chromatography/CertRefStds_DerivatizationReagents_p323to328.pdf

Guerin-Dubiard, C. y otros, 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *J Agric Food Chem,* Volumen 54, pp. 3901-3910.

Hajimehdipoor, H. y otros, 2010. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in Thymus vulgaris L. volatile oil.. *Pharmacognosy Magazine,* Volumen 23, pp. 154-158.

Halliwell, B. & Auroma, O., 1991. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Letter,* Volumen 281, pp. 9-19.

Halliwell, B. & Gutteridge , C. J. M., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Oxford University Press.

Hammershoj, M., 2002. Storage of shell eggs influences the albumen gelling properties. *Lebensm - Wiss. U. Techology,* Volumen 35, pp. 62-69.

Hashemipour, H., Kermanshahi, H., Golian, A. & Veldkamp, T., 2013. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance , antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and inmune response in broiler chickens. *Poultry Science,* Volumen 92, pp. 2059 - 2069.

Hidalgo, A., Rossi, M. & Pompei, C., 2006. Estimation of equivalent egg age through furosine analysis. *Food Chemistry,* Volumen 94, pp. 608-611.

Holen, E. & Elsayed, S., 1990. Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography. *Int Arch Allergy Appl Immunol,* Volumen 91, pp. 136-141.

Huopalahti, R., 2007. *Bioactive Egg Compounds.* Alemania: Springer - Cost.

Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M. & Schade, R., 2007. *Bioactive Egg Compounds.* Berlin Heidelberg: Springer - Verlag.

Huyghebaert, G., 2006. Fisiología de la puesta con énfasis en la calidad de la cáscara.. *Selecciones avícolas,* pp. 227-230.

Ishiyama, M. y otros, 1995. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye. *In Vitro Toxicology,* Volumen 8, pp. 187-190.

Jhon Wiley & Sons, Inc., 2008. *Egg Bioscience and Biotechnology.* Hoboken, New Jersey: s.n.

Jones, D. R. & Musgrove, M. T., 2005. Efffect of Extended Storage on Egg Quality Factors. *Poultry Science,* Volumen 84, pp. 1774-1777.

Joseph, J. A. & Cutler, R. C., 1995. The role of oxidative stress in signal transduction changes and cell loss in senescence. In: The neurobiology of NO and OH. *Ann New York Acad,* Volumen 738, pp. 37- 43.

Kawabe, Y. y otros, 2006. Transport of human immunoglobulin G and Fc-fusion proteins to chicken egg yolk. *Journal of Bioscience Bioeng,* Volumen 10, pp. 518-523.

Ketterer, B., 1986. Detoxication reactions of glutathione and glutathiones transferases. *Xenobiotica,* Volumen 16, pp. 957-973.

King, M., Boyd, L. & Sheldon, B., 1992. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *Journal of American Oil Chemistry Soc,* Volumen 69, pp. 545-551.

Kiosseoglou, V., 2000. Egg yolk protein gels and emulsions. *Curr Option Colloid Interface Science,* Volumen 8, pp. 365-370.

Kitabatake, N., Ishida, A. & Doi, E., 1988. Phisicochemical and functional properties of hen ovalbumin dephosphorylated by acid phosphatase. *(Food & nutrition) Agric Biol Chem,* Volumen 52, pp. 967-973.

Krause, E. & Ternes, W., 1999. Bioavailability of the antioxidative thyme compounds thymol and p-cymene-2,3-diol in eggs. *Eur Food Res Technol,* Volumen 209, pp. 140-144.

Kuksis A., 1992. Yolk lipids. *Biochim Biophys Acta,* Volumen 1124, p. 205–222.

Lopez-Bote, L. J., Gray, J. L., Gomaa, E. A. & Flegal, C. I., 1998. Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British Poultry Science,* Volumen 39, pp. 235-240.

Lu, C. L. & Baker, R. C., 1987. Effect of pH and food ingredients on the stability of egg yolk phospholipid and the metal-chelator antioxidant activity of phosvitin. *Journal of Food Science,* Volumen 52, pp. 613-616.

Madsen, H. L. & Bertelsen, G., 1995. Spices as antioxidants. *Trends Food Science Technology,* Volumen 6, pp. 271-277.

Mann, K., 2007. The chicken egg white proteome. *Proteomics,* Volumen 7, pp. 3558-3568.

Mann, K., 2008. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics,* Volumen 8, pp. 2322-2332.

Mann, K. & Mann, M., 2007. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics,* Volumen 7, pp. 178-191.

Marklund, S. L., 1984. Extracellular superoxide dismutase in human tissue and human cell lines. *Journal of Clinical Investigation,* Volumen 74, pp. 1398- 1403.

Marshall, A. C., Sams, A. R. & Van Elswyk, M. E., 1994. Oxidative stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1.5% Menhaden oil. *Journal of Food Science,* Volumen 59, pp. 561- 563.

Masella, R. y otros, 2005. Novel mechanism of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem,* Volumen 16, pp. 577-586.

Masella, R. y otros, 2004. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *Journal Nutrition,* Volumen 134, pp. 785-791.

Meynier, A. y otros, 2014. n-3 fatty acid enriched eggs and production of egg yolk powders: An increased risk of lipid oxidation?. *Food Chemistry,* Volumen 153, pp. 93-100.

Michiels, J. y otros, 2008. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture ,* Volumen 88, pp. 2371-2381.

Miguel, M., Manso, M. A., López-Fandiño, R. & Ramos, M., 2005. Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. *Eur Food Res Technol,* Volumen 221, pp. 542-546.

Mohamed, S., Honermeier, B., Schnell, S. & Ges, P. M., 2012. Effect of plants containing terpenes on biogas and methane production. Volumen 24, pp. 120-121.

Mourente, G., 1999. Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in Dentex dentex eggs and larvae. *Aquaculture,* Volumen 179, pp. 309-324.

Mourente, G. e. a., 1999. Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in Dentex dentex eggs and larvae. *Aquaculture,* Volumen 179, pp. 309-324.

Muñoz, A., 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol. *Scientia Et Technica,* 8(33), pp. 125-128.

Myhrstad, M. C. y otros, 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transacivation of the y-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biol Med,* Volumen 32, pp. 386-393.

Nadia, R., 2008. Effect of Natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of Laying Hens. *International Journal of Poultry Science,* 7(2), pp. 134-150.

Namiki, M., 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Science. Nutrition,* 29(4), pp. 273-300.

Niki, E. & Noguchi, N., 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *AM. Journal of Clinical Nutrition,* Volumen 62, p. (suppl):1322S.

Ogura, Y. & Yamazaki, I., 1983. Steady-State Kinetics of the Catalase Reaction in the presence of Cyanide. *Journal of Biochemistry,* Volumen 94, pp. 403-408.

Oliveira, G. E. y otros, 2009. Bioactive amines and quality of egg from Dekalb hens under different storage conditions. *Poultry Science,* Volumen 88, pp. 2428-2434.

Oliver, C. N. & Ahn, B. W., 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol. Chem,* Volumen 262, pp. 5488-5491.

Omana, D., Liang, Y., Kav, N. & Wu, J., 2011. Proteomic analysis of egg white proteins durign storage. *Proteomics,* Issue 11, pp. 144-153.

Organización Interprofesional del Huevo y sus Productos (INPROVO), 2015. *Campaña "El huevo de etiqueta".* [En línea] Available at: http://www.elhuevodetiqueta.eu/# [Último acceso: 12 08 2015].

Organización interprofesional del huevo y sus productos (INPROVO), 2015. *El huevo - Composición.* [En línea] Available at: http://www.huevo.org.es/el_huevo_composicion_vitaminas_liposolubles.asp [Último acceso: 12 08 2015].

Ortiz Cuadros, R. E., 2014. *Efecto del aceite esencial de orégano Lippia origanoides Kunth en el desempeño productivo de ponedoras marrón y la peroxidación lipidica de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados durante su almacenamiento,* Bogotá D.C.: bdigital - Repositorio Institucional.

Ortiz, R. y otros, 2013. Effect of oregano essential oils (Lippia origanoides Kunth) on lipid peroxidation in eggs enriched with omega 3 fatty acids during storage. *Journal of Animal Science,* Volumen 91, p. 335.

Park, P. J. y otros, 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolisates of lecithin-free egg yolk. *Journal of American Oil Chemistry Soc,* Volumen 78, pp. 651-656.

Periago, M., s.f. *Open Courseware- Higiene, inspección y control de huevo de consumo.* s.l.:Universidad de Murcia.

Pesti, G. M., Miller, B. R. & Hargrave, J., 1992. *User-Friendly Feed Formulation (UFFDA).* [En línea] Available at: http://www.poultry.uga.edu/poultrysoftware.html

Powrie, W. D. & NakaÏ, 1986. *The chemistry of eggs and egg products.* s.l.:W.J. Stadelman and O.J. Cotterill.

Quiroga, P., 2011. Antioxidant activity of essencial oil oregano species from Argentina in relation to their chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology,* Volumen 46, pp. 2648-2655.

Raikos, V., Hensen, R., Campbell, L. & Euston, S., 2006. Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS-PAGE and 2D gel electrphoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry,* Volumen 99.

Ramos, B., Pinho, O. & Ferreira, I., 2009. Changes of yolk biogenic amine concentrations during storage of shell hen eggs. *Food Chemistry,* Volumen 116, pp. 340-344.

Rodríguez Quiroz, T. A., 2014. *Estudio del efecto del aceite esencial de orégano de monte (Lippia origanoides) del Alto Patía sobre la metanogénesis y la actividad fibrolítica del ecosistema ruminal.* Bogotá D.C.: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Rodríguez, D., 2011. Uso de aceites esenciales de Orégano como aditivo funcional en sistemas de producción de Tilapia (Oreochromis Niloticus). *Boletín de Investigación*, Volumen 33.

Russo M, 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian orégano spice (Origanum vulgare ssp. Hirtium (Link) Ietswaart); A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis, I. Inflorescences.. *J Agric Food Chem.,* Volumen 46, pp. 3741-3746.

Sakanaka, S., 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry,* Volumen 86, pp. 99-103.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. & Juneja, L. R., 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry,* Volumen 86, pp. 99-103.

Shadidi, F. & Wanasundara, P. K., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* Volumen 31, pp. 67-103.

Shahidi, F., Janitha, P. K. & Wanasundara, P. D., 1992. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr,* Volumen 32, pp. 67-103.

Sies, H., 1986. *Biochemistry of oxidative stress.* s.l.:Angewandte Chemistry.

Sparks, N. H. C., 2005. *The hen's egg: is its role in human nutrition changing?.* Doorweth, Netherlands, Eleventh European symposium of the quality of eggs and egg products 23 - 26 May.

Stadelman, W., 2005. *Structure and Composition, in EGGS/Structure and Compositon.* s.l.:s.n.

Stadelman, W. J. & Cotterill, O. J., 1995. *Egg Science and Technology.* s.l.:Haworth Press Inc.

Stadtman, E., 1992. *Protein oxidation and aging.* s.l.:Science.

Stashenko, E. E., 2010. Lippia origanoides chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J Sep. Sci,* Volumen 33, pp. 93-103.

Surai, P. F., 2003. *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction.* Nottingham, UK: University Press.

Thomson, C. D., Robinson, M. F. & Whanger, P. D., 1989. Selenium (Se) and Glutathione Peroxidase (GSH-Px) in blood components of NZ women during long-term supplementation with selenate or selenomethionine (Semet). *Selenium in Biology and Medicine,* pp. 254-257.

Toldrá, F. & Nollet , L. M., 2013. *Food Microbiology and Food Safety.* New York: M.P. Doyle. Springer.

Van het Schip, F. D., Samallo, J., Broos, J. & Ophuis, J., 1987. Nucleotide sequence of a chicken vitellogenin gene and derived amino acid sequence of the encoded yolk precursor protein. *J Mol Biol,* pp. 245-260.

Vásquez, D., 2011. *El orégano de monte (Lippia origanoides) del alto Patia: Efecto de método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos.* Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia: s.n.

Viña, J., 1992. Effect of aging on glutathiones metabolism. *Protection by antioxidants,* Volumen 62, pp. 136-144.

Wawrzykowski, J. & Kankofer, M., 2011. Changes in activity during storage and characteristics of superoxide dismutase from hen eggs (Gallus gallus domesticus). *Eur Food Res Technology,* Volumen 232, pp. 479-484.

Wawrzykowski, J. & Kankofer, M., 2014. Superoxide dismutase from hen's egg yolk can protect fatty acids from peroxidative damage. *Eur Food Res Technol,* Volumen 239, pp. 1041-1049.

Yamamoto, Y., Sogo, N., Iwao, R. & Miyamoto , T., 1990. Antioxidant effect of egg yolk on linoleate in emulsion. *Agric Biol Chemistry,* Volumen 54, pp. 3099 - 3104.

Yamamura, J., Adachi, T., Aoki , N. & Nakajima, H., 1995. Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: The 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. *Biochim Biophys. Acta,* Volumen 1244, pp. 384-394.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H. & Raneva, V. G., 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid system. *Food Chemistry,* Volumen 64, pp. 59-66.

Yesilbag, D., Gezen, S. S., Biricik, H. & Meral, Y., 2013. Effects of dietary rosemary and oregano volatile oil mixture on quail performance, egg traits and egg oxidative stability. *British Poultry Science,* Volumen 54, pp. 231-237.

Young, D., Fan, M. Z. & Mine, Y., 2010. Egg yolk peptides Up-regulate Glutathione synthesis and antioxidant enzyme activities in a porcine modelof intestinal oxidative stress. *J. Agric. Food Chem,* Volumen 58, pp. 7624 - 7633.

Yu, J. Y. L. & R, M. R., 1973. Development, cellular growth, and function of the Avian Oviduct. *Biology of reproduction,* pp. 283-298.