



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Efecto del aceite esencial de orégano
Lippia origanoides Kunth en el
desempeño productivo de ponedoras
marrón y la Peroxidación lipídica de
huevos enriquecidos con ácidos
grasos poliinsaturados durante su
almacenamiento**

Ronnal Esneyder Ortiz Cuadros

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Bogotá, Colombia
2014

Efecto del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth en el desempeño productivo de ponedoras marrón y la peroxidación lipídica de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados durante su almacenamiento

Ronnal Esneyder Ortiz Cuadros

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Producción Animal

Director (a):

Ph.D., MSc, Z., Claudia Ariza Nieto

Línea de Investigación:

Nutrición animal

Grupo de Investigación:

Microbiología y nutrición animal del trópico

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Bogotá, Colombia

2014

Dedicatoria

A mi querida madre Rosaura Cuadros, a mi sobrino Diego Ávila, mis hermanos Jaime, Natalia y Yefert, a Milena Sierra y su apoyo incondicional, a mis tíos y abuelos Teresa y Eduardo, y por supuesto, todo este trabajo es dedicado a la honra y gloria de Dios, que en su misericordia me ha dado la oportunidad de afrontar este desafío.

“No imiten las conductas ni las costumbres de este mundo, más bien dejen que Dios los transforme en personas nuevas al cambiarles la manera de pensar. Entonces aprenderán a conocer la voluntad de Dios para ustedes, la cual es buena, agradable y perfecta.”

Romanos 12:2 (NTV)

Agradecimientos

Agradezco a Dios por su misericordia y gracia al permitir las cosas para culminar con éxito esta travesía y por la vida de cada una de las personas que él coloco durante estos tres años y que hicieron o no, parte del proceso.

A Rosaura Cuadros, mi querida madre por su compañía y aliento, por el sacrificio de sus propios sueños para apoyar los de sus hijos, por esa gran mujer que ha estado siempre con nosotros. A mis hermanos Yefert, Natalia y especialmente Jaime por ser un hermano incomparable, por sus consejos, llamados de atención y colaboración, a Diego mi querido sobrino, por su ejemplo de inocencia y alegría ante la vida.

A la señorita Andrea Milena Sierra, una mujer maravillosa y compañera de aventuras, su apoyo ha sido una gran bendición en mi vida, ha sido una constante motivación en el transcurso de este camino.

A la Doctora Claudia Ariza por la oportunidad brindada, por su confianza y apoyo en este proceso, por su guía y enseñanzas profesionales y personales, por el tiempo que ha dedicado a mi formación.

A los profesores de la Universidad Nacional de Colombia Alvaro Wills y Germán Afanador por sus enseñanzas y confianza brindada. Al colega Yesid Avellaneda por sus opiniones y diálogos constructivos.

A Corpoica y especialmente el grupo de Nutrición Animal, Leonardo, Don Alipio, Sra Doris, Elisa, Diana, Karen y enormemente a la Sra Myriam y la Sra Estela que participaron en forma activa en el desarrollo logístico de este trabajo.

A Carlitos Martínez un amigo y compañero de batalla, gracias.

Resumen

El uso del aceite esencial de orégano (AEO) (*Lippia origanoides* Kunth) en sistemas de alimentación de ponedoras es poco documentado, por lo tanto, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación del efecto de inclusión del AEO sobre el desempeño productivo de las aves, el perfil de ácidos grasos de los lípidos de la yema del huevo, la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento, la calidad sensorial y organoléptica de huevos enriquecidos con AGPI. Se utilizaron 216 ponedoras asignadas a los tratamientos, 1) Dietas con inclusión de 2% de aceite de palma sin suplementación (CONTP), 2) Dietas con inclusión de 2% de aceite de pescado sin suplementación (CONT), 3) Pescado con adición de 200 g/Ton de vitamina E (VITE), 4) Pescado con inclusión de 100 g/Ton de AEO (O100), 5) Pescado con inclusión de 150 g/Ton de AEO (O150) y 6) Pescado con inclusión de 200 g/Ton de AEO (O200). Las ponedoras se ubicaron en jaulas durante 8 semanas. Al finalizar se seleccionaron 12 huevos, estos fueron almacenados a 4°C y -10°C y se analizó el perfil de AG y niveles de MDA en la yema a los 0, 15, 30 y 60 días. Dos huevos se usaron para determinar las características organolépticas y la evaluación de aceptación sensorial de los huevos. Los resultados mostraron que la dieta con aceite de palma mejoró en 4.7%, 2.8% y 3.4%, la CMH, CDH y PP, respectivamente, en comparación con el uso de aceite de pescado, mientras que el peso de los huevos fue superior en 1.1 g en los tratamientos con aceite de pescado. La CDH y PP fue mayor en 3.9% y 4% en los tratamientos sin antioxidantes, aunque los huevos de gallinas alimentadas con dietas con antioxidantes fueron más pesados (+1.2 g). El peso del huevo mostró un comportamiento cuadrático en función del nivel de AEO incluido en la dieta, con el mayor peso para niveles entre O100 y O150 (69.7 g). El contenido de DHA y AGPI fue mayor en las dietas con aceite de pescado en 140% y 15.5%, respectivamente. El contenido de MDA en la yema de huevo aumentó en 27,6% en las dietas con aceite de pescado, mientras que la inclusión de AEO favoreció la estabilidad oxidativa con una reducción 0.06 ng de MDA por cada unidad de AEO incluida en la dieta. El grosor de la cáscara presentó una tendencia lineal – cuadrática,

alcanzando el mayor grosor con O100 (46.2 μm), también se observó un mayor valor de UH en este tratamiento con 7.9%, 3.6% y 6.2%, respecto al grupo CONTP, CONT y VITE, respectivamente. La apariencia global mostró un ligero disgusto por los huevos del tratamiento O150, mientras que el color de la yema mostró mayor pigmentación para la dieta con aceite de palma. El mejor nivel de inclusión de AEO en las dietas de ponedoras se ubicó entre 100 y 150 g/Ton, dosis en las cuales se redujo la oxidación lipídica durante el almacenamiento sin ocasionar efectos negativos en el desempeño productivo y en la aceptación del consumidor.

Palabras clave: Aceite esencial de orégano, ácidos grasos poliinsaturados, huevos enriquecidos, malonaldehído, oxidación lipídica,

Abstract

The use of oregano essential oil (OEO) (*Lippia origanoides* Kunth) in feed systems layer is poorly documented, therefore the aim of this work was to evaluate the effect of inclusion of OEO on the performance of the birds, the fatty acid profile of lipids in the egg yolk, the oxidative stability during storage, sensory and organoleptic quality of PUFA enriched eggs. 216 layers assigned to treatments were used: 1) Diets including 2% palm oil without supplementation (CONTP), 2) Diets including 2% fish oil without supplementation (CONT), 3) Oil fish with added 200 g / ton of vitamin E (VITE), 4) Fish with inclusion of 100 g / ton of AEO (O100), 5) Fish including 150 g / ton of AEO (O150) and 6) Fish including 200 g / ton of AEO (O200). The hens were placed in cages for 8 weeks. At the end of 12 eggs were selected, they were stored at 4 ° C and -10 ° C and the AG profile and MDA levels in the yolk was analyzed at 0, 15, 30 and 60 days. Two eggs were used to determine the organoleptic and sensorial evaluation of acceptance of the eggs. Results showed that the palm oil diet improved by 4.7%, 2.8% and 3.4%, the CMH, CDH and PP, respectively, compared with the use of fish oil, while the weight of the eggs was higher in 1.1 g in treatments with fish oil. The CDH and PP was higher by 3.9% and 4% in treatments without antioxidants, although eggs from hens fed diets with antioxidants were heavier (+1.2 g). Egg weight showed a quadratic behavior depending on the level of AEO included in the diet, with the greatest weight to levels between O100 and O150 (69.7 g). The content of DHA and PUFA was higher in diets with fish oil in 140% and 15.5%, respectively. The MDA content in the egg yolk increased by 27.6% in diets with fish oil while AEO including oxidative stability favoring a reduction by 0.06 ng of MDA AEO each unit included in the diet. The shell thickness showed a linear trend - quadratic, reaching thicker with O100 (46.2 microns), a higher value of this treatment with UH in 7.9%, 3.6% and 6.2% compared to CONTP group CONT also observed and VITE, respectively. The overall appearance showed a slight distaste for eggs O150 treatment, while the yolk color pigmentation showed greater for the diet with palm oil. Best AEO inclusion level in the diets of laying was between 100 and 150 g / ton, which dose was reduced lipid oxidation during storage without causing negative effects on productive performance and consumer acceptance.

Keywords: Enriched eggs, lipid oxidation, malonaldehyde, oregano essential oil, polyunsaturated fatty acids.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Introducción	19
1. Revisión de literatura	22
1.1 Ácidos grasos poliinsaturados - AGPI	22
1.2 Enriquecimiento de huevos con ácidos grasos poli insaturados.....	25
1.3 Oxidación lipídica.....	27
1.4 Uso de antioxidantes en sistemas de alimentación de ponedoras	29
1.5 Aceite esencial de orégano.....	30
1.6 Actividad antioxidante y mecanismo de acción del timol y carvacrol	31
1.7 Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano	33
2. Desempeño productivo de ponedoras marrón alimentadas con dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y aceite esencial de orégano <i>Lippia origanoides</i> Kunth	37
2.1 Introducción	37
2.2 Materiales y métodos.....	39
2.2.1 Ubicación	39
2.2.2 Animales y dietas	39
2.2.3 Registros productivos.....	41
2.2.4 Análisis estadístico.....	41
2.3 Resultados y discusión	42
2.4 Conclusiones	49
3. Suplementación de dietas con aceite esencial de orégano <i>Lippia origanoides</i> Kunth y su efecto sobre la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en almacenamiento	51
3.1 Introducción	51
3.2 Materiales y métodos.....	53
3.2.1 Ubicación	53
3.2.2 Animales y dietas	54
3.2.3 Recolección de muestras	54
3.2.4 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico – TBARs en la yema de huevo	56
3.2.5 Determinación del extracto etéreo (EE – %) en yema de huevo.....	56

3.2.6	Determinación del perfil lipídico en yema de huevo	57
3.2.7	Análisis estadístico	57
3.3	Resultados y discusión.....	59
3.4	Conclusiones.....	71
4.	Efecto de la suplementación de dietas con aceite esencial de orégano <i>Lippia origanoides</i> Kunth sobre la calidad y percepción sensorial por el consumidor de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)	73
4.1	Introducción.....	73
4.2	Materiales y métodos	75
4.2.1	Ubicación.....	75
4.2.2	Animales y dietas.....	75
4.2.3	Recolección de muestras.....	76
4.2.4	Determinación características organolépticas.....	76
4.2.5	Evaluación percepción sensorial.....	77
4.2.6	Análisis estadístico	78
4.3	Resultados y discusión.....	79
4.4	Conclusiones.....	85
5.	Conclusiones, Discusión y Recomendaciones	87
5.1	Conclusiones.....	87
5.2	Discusión.....	89
5.3	Recomendaciones.....	91
A.	Anexo: Encuesta usada en el panel sensorial	92
B.	Anexo: Instrucciones para los autores Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.....	93
	Directrices para autores	93
	Bibliografía	95

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura química ácidos grasos de cadena larga (FAO, 2002)	23
Figura 1-2: Esquema de la oxidación de ácidos grasos insaturados (Adaptado de Saura, 2006)	28
Figura 1-3: Estructura de los componentes principales del AEO timol (1) y carvacrol (2) (Pokorny y col, 1991).	32
Figura 2-1: Distribución de las gallinas en cada réplica	40
Figura 2-2 Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre el porcentaje de postura (Contraste Palma vs Pescado, $Pr>t = 0.0383$).....	44
Figura 2-3 Efecto de la inclusión de antioxidantes en dietas con aceite de pescado sobre el porcentaje de postura (Contraste Pescado sin vs Pescado antioxidante, $Pr>t = 0.0940$)	44
Figura 2-4: Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre la conversión docena huevo – CDH (Contraste Palma vs Pescado, $Pr>t = 0.0003$).	45
Figura 2-5: Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre la conversión masa huevo – CDH (Contraste Palma vs Pescado, $Pr>t = 0.0928$).	45
Figura 2-6: Efecto de la adición de antioxidantes en dietas con aceite de pescado sobre la conversión docena huevo – CDH (Contraste Pescado sin vs Pescado antioxidante, $Pr>t = 0.0602$)	46
Figura 2-7: Efecto de la adición de vitamina E o AEO en dietas con aceite de pescado sobre la conversión masa huevo – CMH (Contraste Pescado VitE vs AEO, $Pr>t = 0.0231$).	47
Figura 2-8: Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre el peso del huevo (Contraste Palma vs Pescado, $Pr>t = 0.0049$)	48
Figura 2-9: Efecto de la inclusión de antioxidantes en dietas con aceite de pescado sobre el peso del huevo (Contraste Pescado sin vs Pescado antioxidante, $Pr>t = 0.0191$)	48
Figura 2-10: Efecto de la inclusión del AEO (<i>Lippia organoides</i> Kunth) en dietas con aceite de pescado sobre el peso del huevo de ponedoras marrón (Tendencia lineal AEO: $Y = 0.02 \cdot AEO + 67.6$; $R^2 = 0.97$, $Pr>t = 0.0247$; Tendencia cuadrática AEO: $Y = -0.0003 \cdot AEO^2 + 0.06 \cdot AEO + 67.4$; $R^2 = 0.88$, $Pr>t = <0.0001$)	49
Figura 3-1: Estabilidad oxidativa de huevos frescos por efecto del tipo de aceite en la dieta (Palma vs Pescado, $P<0.0001$).....	63
Figura 3-2: Estabilidad oxidativa de huevos frescos por efecto de la inclusión de antioxidantes en la dieta (Sin Antioxidante vs Antioxidante, $P=0.0005$).	63

Figura 3-3: Estabilidad oxidativa de huevos frescos por efecto del tipo de antioxidante incluido en la dieta (Vitamina E vs AEO, $P=0.0588$).....	63
Figura 3-4: Efecto de la inclusión de AEO (<i>Lippia origanoides</i> Kunth) sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos ($Y = -0.06X + 42.2$; $R^2 = 0.8979$; $P < 0.0001$. X = nivel de inclusión de AEO)	65
Figura 3-5: Efecto de la interacción Tratamiento*Temperatura sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos (Efecto separado por temperatura, $P < 0.0001$; Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre medias a -10°C y letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre medias a 4°C).	67
Figura 3-6: Efecto de la interacción Temperatura*Día sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos (efecto separado por temperatura, $P < 0.0001$; Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre medias a -10°C y letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre medias a 4°C).	69
Figura 4-1: Características evaluadas dentro de la calidad organoléptica del huevo. a- Color de yema; b- Alto de la albumina; c- Grosor de la cáscara.....	77
Figura 4-2: Efecto de la inclusión de antioxidantes en dietas de ponedoras formuladas con aceite de pescado sobre el grosor de la cáscara (Contraste Vitamina E vs AEO; $P=0.0013$)	81
Figura 4-3: Efecto de la inclusión de tres niveles de AEO en dietas de ponedoras formuladas con aceite de pescado sobre el grosor de la cáscara del huevo ($Y = -0.0004 * \text{AEO}^2 + 0.0532 * \text{AEO} + 44.2$, $R^2=0.99$)	82
Figura 4-4: Efecto de la inclusión de tres niveles de AEO en dietas de ponedoras formuladas con aceite de pescado sobre las unidades Haugh del huevo ($Y = -0.0275X + 88$, $R^2=0.39$; $P=0.0097$. X corresponde a la inclusión de AEO).....	84

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1:	Algunos ácidos grasos presentes en los alimentos (FAO, 2002).....	23
Tabla 1-2:	Nomenclatura ácidos grasos esenciales (Dupont, 1999; tomado de Castro, 2002)	24
Tabla 1-3:	Composición de la yema de huevo de gallina (Adaptado de Ordoñez y de la Hoz, 1999) – ACTUALIZAR Y DEFINIR EL TIPO DE DIETA.....	25
Tabla 1-4:	Perfil de AG de materias primas empleadas en formulación (Fedna, 2010) ..	26
Tabla 1-5:	Cinética de oxidación lipídica sin y con inclusión de inhibidor (Antioxidante) – Adaptado de Yanishlieva y col., 1999.....	33
Tabla 1-9:	Resumen de resultados del uso de AEO en la dieta de ponedoras.....	36
Tabla 2-1:	Composición dieta basal (Formulación realizada en Solver – Excel®)	40
Tabla 2-2:	Descripción tratamientos experimentales	41
Tabla 2-3:	Efecto de los tratamientos experimentales sobre el desempeño productivo de ponedoras marrón	43
Tabla 3-1:	Composición dieta basal (Formulación realizada en Solver – Excel®)	55
Tabla 3-2:	Efecto del tipo de aceite en dietas de ponedoras y la inclusión de AEO (<i>Lippia origanoides</i> Kunth) sobre la estabilidad oxidativa y el contenido de ácidos grasos de huevos en almacenamiento.....	61
Tabla 3-3:	Efecto de la inclusión del AEO (<i>Lippia origanoides</i> Kunth) en dietas con aceite de pescado sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos	62
Tabla 3-4:	Efecto de la inclusión del AEO (<i>Lippia origanoides</i> Kunth) en dietas con aceite de pescado sobre la estabilidad oxidativa de huevos almacenados a 4 y -10°C ..	65
Tabla 3-5:	Comparación entre tratamientos de la estabilidad oxidativa de huevos en almacenamiento por efecto de la interacción Tratamiento*Temperatura (efecto separado por temperatura; P<0.0001).	67
Tabla 3-6:	Comparación de la estabilidad oxidativa de huevos en almacenamiento por efecto de la interacción Temperatura*Tiempo (efecto separado por temperatura; P<0.0001).	69
Tabla 4-1:	Escala Hedónica empleada en el panel sensorial.	79
Tabla 4-2:	Efecto del tipo de aceite y suplementación con antioxidantes en la dieta sobre la calidad organoléptica del huevo.....	80
Tabla 4-3:	Medianas para el efecto del tipo de aceite y suplementación con antioxidantes en la dieta sobre el color de la yema y aceptación del consumidor.....	83

Introducción

El aumento constante en la población mundial, especialmente en los países en desarrollo, lugares en los cuales, se reporta un porcentaje considerable de desnutrición y limitados recursos económicos de la población, es necesario considerar el aumento en la oferta de productos alimenticios de alto valor nutricional a bajos costos (Fenavi, 2013a). El huevo ha hecho parte de la dieta de millones de personas en el mundo durante siglos por su accesibilidad, es un producto de alto valor nutritivo que se conserva por más tiempo en comparación con otros alimentos, bajo costo y la consideración como la proteína más completa y de mayor valor biológico después de la leche materna, lo que lo convierte en un alimento de gran importancia en el tema de seguridad alimentaria (Fenavi, 2013a), sin embargo, la concientización de los consumidores en cuanto al consumo de grasas saturadas en los alimentos, especialmente colesterol y su relación con el riesgo de padecer enfermedades coronarias y el desarrollo de algunas formas de cáncer (Simopoulos 2000; Hargis y van Elswysk, 1991), llevaron a una reducción notable en el consumo de huevos, especialmente en la década de los 90 (Leeson y Zubair, 1996). Por su función biológica, un huevo contiene entre 200 – 250 mg de colesterol y la modificación en su concentración no ha sido exitosa, y en los casos donde se ha logrado una reducción significativa, se han visto efectos negativos sobre la producción, especialmente en el tamaño del huevo (Leeson y Zubair, 1996), mientras que el contenido de ácidos grasos (AG) del huevo es más susceptible de modificarse a través de la suplementación dietaria con AG específicos, caso de las series omega-3/omega-6 (ω_3/ω_6), siendo esta una alternativa en busca de mejorar el valor nutricional de los huevos (Hargis y Van Elswyk, 1991), sin embargo, el aumento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en la yema de huevo promueve la susceptibilidad a la oxidación lipídica, considerado en la industria de los alimentos como un proceso degradativo con influencia directa en la pérdida de características sensoriales como el olor y sabor de los productos.

Como alternativa a la oxidación lipídica de los alimentos, los antioxidantes sintéticos o naturales han sido considerados en la industria alimenticia (Yannakopoulos y col., 2005), estos son empleados para retardar o minimizar el deterioro oxidativo, evitando así la formación de sabores no deseables y de compuestos tóxicos que se originan en este proceso (Botsoglou y col., 2002; Maestro y col., 1993). El uso de antioxidantes sintéticos como inhibidores de la peroxidación lipídica está ampliamente difundido en la industria alimenticia, los más empleados son el Butil hidroxitolueno (BHT), Butil hidroxianisol (BHA) y etoxiquin, a pesar de presentar inestabilidad a temperaturas altas y facilidad de volatilización (Milos y col., 2000), sin embargo, la inclusión de antioxidantes sintéticos ha sido debatida, regulada y restringida en muchos países, ya que se han relacionado con procesos carcinogénicos y han presentado un rechazo general por parte de los consumidores (Pokorny y col., 1991). Los antioxidantes naturales han sido ampliamente estudiados por su capacidad de proteger organismos y células del daño inducido por estrés oxidativo, siendo este último considerado como una causa de enfermedades degenerativas y desarrollo de cáncer (Cozzi y col., 1997).

Cabuk y col (2006) mencionaron que los extractos vegetales pueden tener un papel importante en el comportamiento productivo y el estado sanitario de los animales. En alimentación animal, pueden tener efectos benéficos como la estimulación del apetito, consumo de alimento, mejorar la secreción de enzimas digestivas endógenas y respuesta inmune, y han cobrado interés como sustitutos de antioxidantes sintéticos (Radwan y col., 2008; Botsoglou y col., 2005; Baratta y col., 1998), con interés particular en los aceites esenciales de plantas de la familia *Labiatae*, especialmente romero, tomillo y recientemente orégano (Botsoglou y col., 2002). En el caso del orégano, los aceites esenciales se caracterizan porque contienen compuestos con propiedades antioxidantes con un gran potencial para reemplazar los sintéticos; el carvacrol y timol, así como varios monoterpenos son las moléculas responsables de esta actividad antioxidante. Botsoglou y col (2002) sugirió que aproximadamente el 0.006% del timol ingerido fue transferido a la yema de huevo después de 12 días de alimentación, produciendo huevos más estables a la oxidación.

En Colombia suele encontrarse un especie de orégano común para América perteneciente al género *Lippia* (*Lippia origanoides* Kunth), con la particularidad que el aceite esencial de esta planta se caracteriza por presentar un alto contenido de timol (67.2% a 78.7%) y bajo de carvacrol (0.9% a 1.2%), en contraste con otros extractos de orégano que normalmente tienen un mayor nivel de carvacrol (90.3%) que de timol (3.5%) (Ariza, 2011). El orégano griego (*Origanum vulgare* Hirtum) como aceite esencial o material vegetal seco se ha usado en dietas de pollo de engorde (Botsoglou y col., 2003), pavos (Florou-Paneri y col., 2005a) y ponedoras (Orhan y Eren., 2011; Radwan y col., 2008; Cabuk y col., 2006; Florou-Paneri y col., 2005b). Sin embargo, la inclusión en las dietas de ponedoras del aceite esencial de orégano (AEO) *Lippia origanoides* Kunth encontrado en Colombia y su efecto sobre el desempeño productivo y la calidad final de los huevos es poco documentado, por esta razón, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación del efecto de incluir AEO *Lippia origanoides* Kunth en dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) sobre el desempeño productivo de ponedoras marrón, el perfil lipídico y estabilidad oxidativa de los huevos durante el almacenamiento y el efecto sobre la aceptación por parte del consumidor, mediante la evaluación de cambios en la calidad sensorial y organoléptica. Para cumplir este objetivo se realizó un experimento en ponedoras marrón alimentadas durante 8 semanas con dietas elaboradas con aceite de palma o pescado, que podían tener la inclusión de vitamina E o AEO en tres niveles diferentes, durante este tiempo se realizó el seguimiento del desempeño productivo de los animales, una vez finalizado el tiempo de alimentación se procedió a recolectar huevos destinados a la evaluación del perfil lipídico y estabilidad oxidativa durante el almacenamiento hasta por 60 días, al igual que la evaluación de las características organolépticas y sensoriales de los huevos. Para la evaluación del perfil lipídico y la estabilidad oxidativa, fue necesario determinar el contenido de ácidos grasos de cadena larga y las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARs), mientras que la calidad se evaluó mediante la determinación de las características físicas color de la yema, alto de la albúmina, grosor de la cascara y unidades haugh, las sensoriales se midieron mediante la realización de un panel de degustación.

1. Revisión de literatura

1.1 Ácidos grasos poliinsaturados - AGPI

Los ácidos grasos (AG), agrupados como lípidos, son biomoléculas solubles en sustancias orgánicas como el éter, cloroformo y acetona, pero no en el agua, dentro de sus funciones, son componentes estructurales de las membranas celulares (fosfolípidos, esfingolípidos, colesterol) (McKee y McKee., 2003). Las grasas y aceites (triglicéridos) son una forma de almacenamiento eficiente de energía, se oxidan en menor grado que los carbohidratos, por tanto, su degradación libera más energía, alrededor de 38.9 kJ/g de grasa, comparado con 17.2 kJ/g de carbohidrato (Nelson y Cox., 2005). Otras moléculas lipídicas tienen funciones como señales químicas (esteroides), vitaminas (tocoferol) o pigmentos (carotenoides) (Castro, 2002).

Desde el punto de vista químico los AG son cadenas rectas de hidrocarburos con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro. Convencionalmente son clasificados por el grado de saturación, de acuerdo con la presencia de enlaces dobles en la estructura se dividen en saturados e insaturados (Figura 1 – 2), estos últimos pueden ser monoinsaturados (AGMI) o poliinsaturados (AGPI). Por longitud de la cadena carbonada, pueden clasificarse en AG de cadena corta (4 a 6 carbonos), media (8 a 12 carbonos), larga (14 a 18 carbonos) o muy larga (20 o más carbonos) (Tabla 1 – 4) (Castro, 2002; Leeson y Zubair, 1996).

Según la posición del primer doble enlace en la cadena desde el extremo metilo, denominado *omega*, existen tres familias de AGPI ω -3, ω -6 y ω -9. Castro (2002), sugiere que algunos de estos AG no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y deben ser suministrados en la dieta por ser necesarios en funciones vitales del organismo, específicamente las familias ω -6 y ω -3, razón por la cual son denominados como ácidos grasos esenciales (Tabla 1 – 5)(FAO/OMS, 1997, tomado de FAO, 2002).

Figura 1-1: Estructura química ácidos grasos de cadena larga (FAO, 2002)

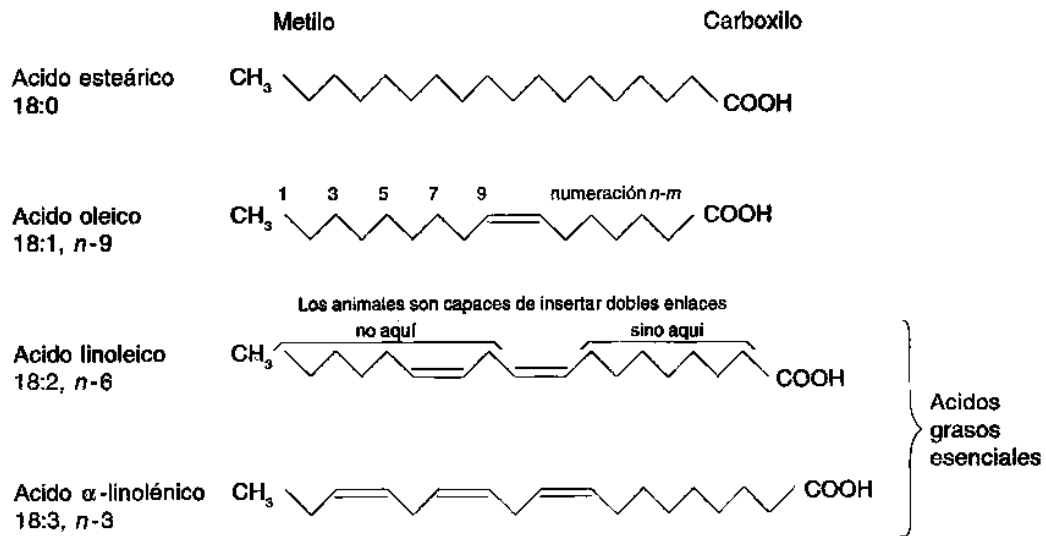


Tabla 1-1: Algunos ácidos grasos presentes en los alimentos (FAO, 2002)

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura
Cáprico	Decaenoico	10:0
Láurico	Dodecanoico	12:0
Mirístico	Tetraenoico	14:0
Palmítico	Hexaenoico	16:0
Esteárico	Octadecaenoico	18:0
Araquídico	Eicosaenoico	20:0
Behénico	Docosanoico	22:0
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0
Palmitoleico	Cis-9-gexadecenoico	16:1
Oleico	Cis-9-octadecenoico	18:1
Gadoleico	Cis-11-eicosaenoico	20:1
Cetoleico	Cis-11-docasaenoico	22:1
Erúcico	Cis-13-docasaenoico	22:1
Nervónico	Cis-15-tetracosanoico	24:1

Los AGPI como el ácido eicosapentaenoico – EPA y docosahexaenoico – DHA son de gran importancia en el desarrollo del cerebro y la retina durante la gestación y en los primeros años de vida de los niños. Tienen propiedades hipocolesterolémicas y ayudan en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, inmunológicas, diabetes, enfermedades del sistema nervioso, cáncer de colon, reducen procesos inflamatorios, entre otras. Los compuestos sintetizados a partir de las familias ω -6 y ω -3 tienen efectos opuestos, el ácido araquidónico – ARA y linoleico – LA, principales representantes de la serie ω -6, son precursores de prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 y de leucotrienos de la serie 4, potentes vasoconstrictores y favorecen la formación de trombos, procesos inflamatorios y adherencias, mientras que el ácido eicosapentaenoico – EPA (ω -3) y docosahexaenoico – DHA (ω -3) cumplen funciones de vasodilatación y regulación de la pared de vasos sanguíneos, ya que son precursores de prostaglandinas y tromboxanos de la serie 3, que tienen efecto vasodilatador y reducen la formación de trombos (FAO, 2002; Castro, 2002).

Tabla 1-2: Nomenclatura ácidos grasos esenciales (Dupont, 1999; tomado de Castro, 2002)

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Fórmula
Familia ω – 6			
Linoleico (LA)	Cis-9,12-octadecadienoico	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
γ - linolénico	Cis-6,9,12-octadecatrienoico	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Dihomo-g-linolénico	Cis-8,11,14- eicosatrienoico	20:3	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
Araquidónico (AA)	Cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
Adrénico	Cis-7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4	C ₂₂ H ₃₆ O ₂
Osmond	Cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5	C ₂₂ H ₃₄ O ₂
Familia ω – 3			
α – linolénico (ALA)	Cis-9,12-,15 – octadecatrienoico	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Estearidónico	Cis-6,9,12-,15 – octadecatetraenoico	18:4	C ₁₈ H ₂₈ O ₂
Timnodónico (EPA)	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
Clupanodónico (DPA)	Cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5	C ₂₂ H ₃₄ O ₂
Cervónico (DHA)	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6	C ₂₂ H ₃₂ O ₂

1.2 Enriquecimiento de huevos con ácidos grasos poliinsaturados

Debido a la estrecha relación con efectos benéficos sobre la salud a nivel cardiovascular, los consumidores han centrado su preocupación en el consumo de alimentos bajos en colesterol y con algún contenido de AGPI (Leeson y Zubair, 1996), llevando a la búsqueda de estrategias que favorezcan la concentración de estas moléculas en los alimentos. El huevo es una fuente rica en lípidos (Tabla 1 – 6), por esta razón, la composición lipídica de los huevos ha sido un tema de interés particular por parte de los consumidores en los últimos años (Leeson y Zubair, 1996). La concentración de colesterol en el huevo alcanza valores entre 200 – 250 mg de colesterol por huevo y la modificación en la concentración no ha sido exitosa, ya que, en los casos en los que se ha logrado una reducción significativa, se han visto efectos negativos sobre la producción, especialmente sobre el tamaño del huevo. Estos resultados se consideran, producto de la función biológica del colesterol en el huevo, ya que interviene en el desarrollo del embrión como componente estructural de membranas celulares, como precursor del sexo, hormonas adrenales, vitamina D y ácidos biliares (Leeson y Zubair, 1996).

Tabla 1-3: Composición de la yema de huevo de gallina (Adaptado de Ordoñez y de la Hoz, 1999)

	Cáscara (%)	Clara (%)	Yema (%)
Agua	1.0	88.5	47.5
Lípidos	-	0.2	31.9
Proteínas	4.0	10.9	16.1
Carbohidratos	-	0.5	0.2
Minerales	95	0.5	1.1
Otros componentes	-	-	0.8
Ácidos grasos de la yema de huevo gallinas (%)			
Saturados – (C10:0 a C16:0)			26.9
Esteárico – C18:0			9.3
Oleico – C18:1			44.1
Linoleico – C18:2			13.4
Linolénico – C18:3			0.3
Otros AGPI ω 6			1.0
Otros AGPI ω 3			Traza

El contenido AG del huevo puede variarse en mayor magnitud a partir de la suplementación dietaria con AG, siendo esta la alternativa en busca de mejorar el valor nutricional de los huevos (Van Elswyk, 1997). En el sector avícola, la principal estrategia de enriquecimiento usada, ha sido el suministro de dietas con niveles altos de AGPI de cadena larga, especialmente de la serie $\omega-3$, mediante la formulación con inclusión de fuentes vegetales como semillas o aceites de lino, canola, colza o con fuentes de origen animal, principalmente aceites y harinas de pescado, caracterizados por tener concentraciones considerables de AGPI, particularmente EPA y DHA, favoreciendo así la relación $\omega-6/\omega-3$, partiendo de la consideración que las dietas normalmente aportan niveles considerables de AG de la serie $\omega-6$, caso del ácido linoleico (Tabla 1 – 7).

Tabla 1-4: Perfil de AG de materias primas empleadas en formulación (Fedna, 2010)

AG ¹	Maíz	Soja		Salvado	Semillas		Aceite	
		Torta	Extruida	Trigo	Colza	Lino	Palma	Pescado
C14:0			0.04		0.08		0.99	7.0
C16:0	0.35	0.15	2.01	0.48	1.93	2.14	42.57	19
C16:1			0.04	0.03	0.15		0.3	9
C18:0	0.06	0.05	0.73	0.03	0.77	1.65	4.8	4.9
C18:1	0.85	0.29	4.01	0.38	21.65	6.92	39.6	16
C18:2	1.76	0.72	9.85	1.44	8.51	4.29	10	2
C18:3	0.03	0.11	1.46	0.13	3.48	16.81	Trazas	0.9
C≥20		0.01	0.07	0.03	1.55	0.33	0.12	44.1

¹ Ácido graso expresado como % del alimento en base seca

Van Elswyk (1997) y Leeson y Zubair (1996) sugirieron que es posible mejorar el valor nutricional de los huevos al incrementar el contenido de EPA y DHA en la dieta de ponedoras mediante la inclusión de aceites de pescado, dando lugar a huevos enriquecidos con estos AG. Ellos reportaron que gallinas alimentadas con un 3% de aceite de pescado en la dieta producen huevos con concentraciones más bajas de AA y más altas de EPA y DHA sin afectar los parámetros productivos. Castillo y col., (2005)

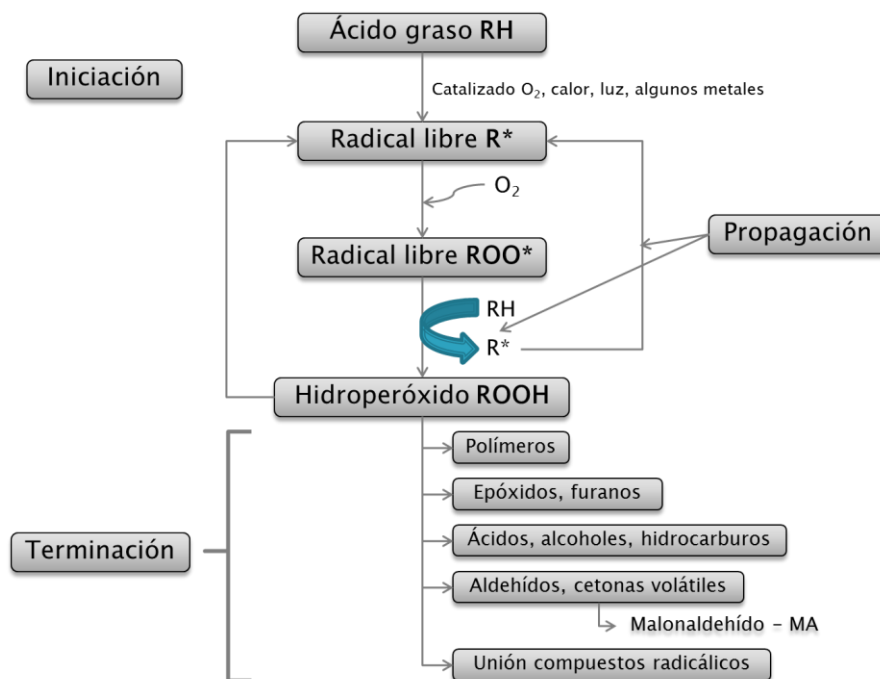
evaluaron el aceite de atún en dietas de ponedoras marrón, ellos encontraron que el LA (C18:2), AA (C20:4) y el ALA (C18:3) disminuyeron con el incremento de aceite de atún en la dieta hasta inclusiones del 2%, mientras que EPA y DHA aumentaron con la incorporación del aceite de atún en la dieta. Por otra parte, las materias primas vegetales se han empleado como alternativa de enriquecimiento con AG omega 3 con menor tendencia de transmisión de características organolépticas indeseables a los huevos enriquecidos. Caston y Leeson (1990; citados por Leeson y Zubair, 1996) usaron dietas con 0, 10, 20 y 30% de semilla de lino, logrando una relación C18:2/C18:3 de 1.5:1 para la inclusión más alta de semilla de lino comparado con 35.1:1 de la dieta sin suplementar, Cherian y col., (1996) en un estudio similar, obtuvieron un 2.4% de ácido linoleico en la yema con la inclusión de 16% de harina de canola comparado con un 8.8% en dietas con semilla de lino, mientras que la concentración de EPA y DHA en la yema aumento en el mismo nivel por efecto de la suplementación de semilla de canola o lino. Estos resultados sugieren que es posible enriquecer huevos con AGPI de la serie omega 3, mediante el uso de recursos disponibles para formulación (Leeson y Zubair, 1996), sin embargo, el éxito del enriquecimiento no solo está en función de incrementar la concentración de AGPI en la yema, también debe considerarse la aceptación por parte del consumidor, aspecto en el cual, diversos autores sugieren que es necesaria la investigación en estrategias que reduzcan la trasmisión de características indeseables a los huevos, ya que en las evaluaciones sensoriales con panel de personas entrenadas, los huevos de ponedoras alimentadas con harina o aceite de pescado en inclusiones cercanas al 5% o con semilla de lino recibieron las calificaciones más bajas al ser comparadas con dietas control (Leeson y Zubair, 1996).

1.3 Oxidación lipídica

Derivado de la modificación de los lípidos y AG en los huevos a través del alimento suministrado a las ponedoras, se favorece la oxidación de los lípidos, especialmente en productos enriquecidos y que son sometidos a periodos de almacenamiento, este fenómeno se ha reconocido como un proceso de deterioro que afecta la calidad sensorial y nutricional de los alimentos, producto de esta reacción, se presenta la producción de radicales libres, situación que es más crítica cuando son enriquecidos con AGPI (Yannakopoulos y col., 2005; Meluzzi y col., 2000). Los radicales libres en exceso dan origen a una serie de reacciones en cadena en la que se generan nuevos radicales libres

y una serie de compuestos volátiles como aldehídos y otros compuestos volátiles (Figura 1 – 3) que son los responsables de la pérdida de las características organolépticas de los alimentos enriquecidos con AGPI (Saura, 2006). En el proceso de oxidación, los radicales libres (ROO^* , RO^* y OH^*) son producidos a partir de ácidos grasos (RH) que contienen grupos metileno unidos por enlaces dobles en la posición Cis. Según Mayes (1988), el proceso se divide en iniciación, propagación y finalización. En la primera fase, el oxígeno se combina con los ácidos grasos insaturados para producir principalmente peróxidos (ROOH) y radicales libres (ROO^* , RO^* y OH^*), que son muy reactivos. Durante la propagación, los productos de la primera fase pueden reaccionar con moléculas lipídicas adicionales, donde una molécula de oxígeno se adhiere al enlace libre, para generar un peróxido, el cual puede luego extraer un átomo de hidrógeno de otro AG para formar un hidroperóxido y continuar así la cadena de reacciones, generando otras formas químicas reactivas, mientras que en la finalización se forman productos relativamente no reactivos, tales como hidrocarburos, aldehídos y cetonas, responsables de las características organolépticas indeseables.

Figura 1-2: Esquema de la oxidación de ácidos grasos insaturados (Adaptado de Saura, 2006)



1.4 Uso de antioxidantes en sistemas de alimentación de ponedoras

El uso de aditivos es una práctica normal en la formulación de dietas cuyo objetivo principal es mejorar el rendimiento productivo y el aprovechamiento de las dietas suministradas (Isabel y Santos, 2002). Estas sustancias son adicionadas a los alimentos en cantidades pequeñas con el objetivo de modificar las características organolépticas o mejorar su proceso de elaboración o conservación; la clasificación de los aditivos alimentarios incluye una amplia lista de compuestos con diferentes actividades, uno de estos grupos hace referencia a sustancias con potencial de inhibición de la oxidación lipídica o antioxidantes.

Los antioxidantes son definidos por la FDA como sustancias usadas para preservar los alimentos del deterioro, la rancidez y la decoloración debido a la oxidación, son empleados para retardar o minimizar el deterioro oxidativo de productos con tendencia a este fenómeno, como son los aceites, grasas y recursos alimenticios altos en grasa, evitando así la formación de sabores no deseables y de compuestos tóxicos que se originan en este proceso (Botsoglou y col., 2002). El uso de antioxidantes sintéticos como inhibidores de la oxidación lipídica es bien conocido en la industria de alimentos, los más empleados son el BHT (Butil hidroxitolueno) y BHA (Butil hidroxianisol), a pesar de presentar inconvenientes como su inestabilidad a temperaturas altas y por aspectos de volatilización (Milos y col., 2000). La inclusión de estos antioxidantes ha sido recientemente debatida, regulada y restringida en muchos países, debido a evidencias que señalan que la inclusión de altos niveles de estas sustancias ocasionan alteraciones en el peso del hígado, disminución del crecimiento y caída del pelo en ratas, hiperplasia de las células epiteliales y presentan efecto tóxico sobre las células del mono (Hirose y col., 1986), adicional a estos reportes se suma la sospecha de la actividad promotora de la carcinogénesis y el rechazo general de aditivos sintéticos en los alimentos por parte de los consumidores (Pokorny, 1991).

Debido a las crecientes restricciones en el uso de las sustancias antes mencionadas y a preferencias del consumidor por aditivos naturales, se ha generado gran interés en el estudio de sustancias naturales, derivadas principalmente de plantas aromáticas, medicinales y sus extractos, en los cuales se ha reportado algún grado de actividad antimicrobiana y antioxidante, en busca de alternativas que permitan prolongar la vida útil

de los alimentos (Maguna y col., 2006). Se han evaluado los aceites esenciales de las plantas de la familia Labiatae, romero (*Rosmarinus officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*) y orégano (*Origanum vulgare*), que han demostrado su efectividad como antioxidantes naturales cuando son comparados con los antioxidantes sintéticos tanto en modelos in Vitro (Dorman y Deans, 2000) como en modelos in Vivo (Young y col., 2003; Botsoglou y col., 2003; 2002; Economou y col., 1991). Los antioxidantes naturales han sido ampliamente estudiados por su capacidad de proteger organismos y células del daño inducido por estrés oxidativo, siendo este último considerado como una causa de enfermedades degenerativas y desarrollo de cáncer (Cozzi y col., 1997). Los aceites esenciales (AE), han sido definidos como sustancias vegetales olorosas, originadas principalmente como metabolitos secundarios con funciones de defensa y atracción, se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos volátiles pertenecientes a diferentes clases orgánicas: terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles (Puertas-Mejía y col., 2002). Dicha composición está influenciada por factores como el origen, especie, órgano de la planta, condiciones climáticas y de crecimiento, temperatura, condiciones de cultivo, extracción y forma de almacenamiento (Zekaria, 2000). Los extractos de plantas y especias como compuestos únicos o en mezclas pueden jugar un papel importante en el apoyo de desempeño y estatus sanitario de los animales (Cabuk y col., 2006).

1.5 Aceite esencial de orégano

Con el nombre de orégano se conocen mínimo 61 especies de 17 géneros agrupados en seis familias. Los oréganos turcos y griegos pertenecen al género *Origanum* contenido en la familia *Labiatae*, mientras que el género *Lippia* que pertenece a la familia *Verbenaceae* es característico en América (Ariza y col., 2011). En Colombia suele encontrarse un orégano de monte perteneciente al género *Lippia* (*Lippia origanoides* Kunth) en los departamentos de Guajira, Magdalena, Cauca (Alto Patía), Cundinamarca, Norte de Santander y Santander. En éste último se encuentra a altitudes entre 500 – 800 m.s.n.m formando asociaciones vegetales con otras especies características de la región (Ruiz y col., 2007). Las especies de orégano del género *Lippia* son generalmente reconocidas

como seguras para el consumo humano como aromatizantes naturales y condimento. *Lippia origanoides* es un arbusto aromático, con olor a orégano, en la mayoría de quimiotipos, alcanza hasta 3.5 m de alto, muy ramificado, de hojas subredondeadas, estriadas y flores blancas. Esta especie crece bien en regiones semidesérticas, suele encontrarse en grandes extensiones silvestres en asociación con otras especies, tiene buena adaptación al estrés, y no son susceptibles al chinche, que suelen atacar fuertemente a *Lippia alba* de origen mexicano (Stashenko y col., 2010).

Castañeda y col., (2007) estudiaron los AE de las hojas de 10 plantas aromáticas colombianas, entre ellas *Lippia origanoides*, encontrando dos quimiotipos para el AE de esta especie. El quimiotipo A cuyos componentes mayoritarios fueron: carvacrol (36.6%), p-cimeno (14.0%), terpineno (13.3%), timol (9.1%), y α -terpineno (3.8%); mientras que, para el quimiotipo B, los componentes mayoritarios fueron: p-cimeno (15.7%), trans- β -cariofileno (9.4%), α -felandreno + d-3-careno (8.7%), limoneno (6.9%) y β -felandreno + eucaliptol; en ambos casos, diferentes al AE de *Lippia origanoides* Kunth, proveniente del Alto Patía, que presento un 67.2% a 78.7% de timol y 0.9% a 1.2% de carvacrol, como componentes mayoritarios, junto con precursores y otros compuestos en menores cantidades (Ariza y col., 2011).

1.6 Actividad antioxidante y mecanismo de acción del timol y carvacrol

Las hierbas y especias son posibles fuentes inocuas para la obtención de antioxidantes, con interés particular en especias de la familia *Lamiaceae*, las cuales se han evaluado en la estabilización de lípidos contra cambios oxidativos y en la estabilización del aceite de girasol a temperaturas de fritura con resultados promisorios. En las plantas de la familia *Lamiaceae* el timol (5-methyl-2-isopropylphenol), está siempre acompañado de su isómero carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) (Figura 1 – 4), y son considerados como los compuestos mayoritarios de estos extractos vegetales, con actividad biológica importante como antiséptico y antifúngico, respectivamente (Yanishlieva y col., 1999). Aeschbach y col., (1994) mostraron que el timol y carvacrol inhibieron la peroxidación de liposomas de fosfolípidos en función de la concentración de dichos compuestos, resultados similares para la oxidación de lípidos fueron expuestos por Yanishlieva y col.,

(1999) como respuesta al uso de aceites esenciales provenientes de plantas de la familia *Lamiaceae*, caracterizados por altos contenidos de carvacrol y timol. El mecanismo de acción de estos fenoles (timol y carvacrol), como posibles inhibidores de la oxidación lipídica, se encuentra explicado por los conceptos de eficiencia y fuerza de inhibición dentro de la cinética de oxidación. La introducción de un antioxidante (Inhibidor, InH) en la cadena de oxidación lipídica, lleva a cambios en los mecanismos de reacción, modificando el proceso cinético, como se describe en la tabla 1 – 8. El efecto del inhibidor InH está en función de la participación de sus moléculas y los radicales formados desde este último en una serie de reacciones (tabla 1 – 8) (Denisov y Khudyakov; citado por Yanishlieva y col., 1999). En la secuencia de reacciones, LH, corresponde al lípido como sustrato de oxidación, LO_2^* es el radical peróxido y el inhibidor se encuentra definido por InH. La eficacia del InH representa la posibilidad de bloquear el progreso de la cadena de radicales por interacción del inhibidor con los radicales peróxido (Reacción 9), los cuales son responsables de la duración del periodo de inducción IP y la fuerza, expresa la posibilidad de participación en otras reacciones de los restos del inhibidor (Reacciones 10, 13, 14, 15, 17), llevando a cambios en la tasa de oxidación durante el IP (Yanishlieva y Marinova., 1992).

Figura 1-3: Estructura de los componentes principales del AEO timol (1) y carvacrol (2) (Pokorny y col, 1991).

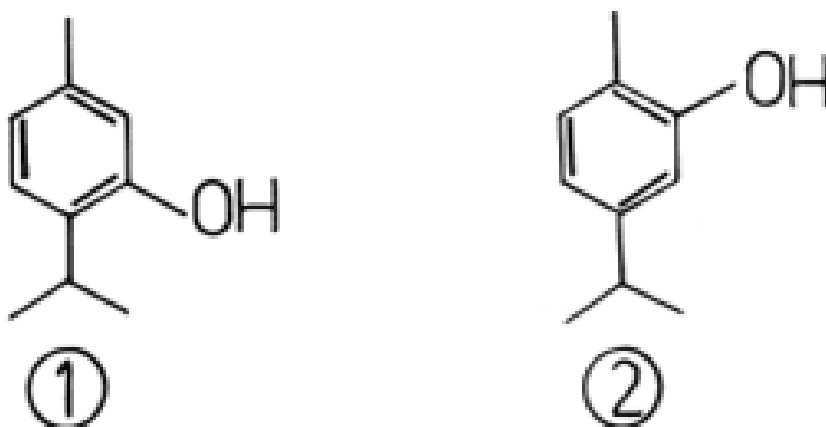


Tabla 1-5: Cinética de oxidación lipídica sin y con inclusión de inhibidor (Antioxidante) – Adaptado de Yanishlieva y col., 1999.

Cinética 1: Oxidación sin inhibición	Cinética 2: Oxidación inhibida
0. $2LH + O_2 \longrightarrow 2L^{\bullet} H_2O_2$	9. $LO_2^{\bullet} + InH \longrightarrow LOOH + In^{\bullet}$
1. $L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LO_2^{\bullet}$	10. $In^{\bullet} + LOOH \longrightarrow InH + LO_2^{\bullet}$
2. $LO_2^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$	11. $In^{\bullet} + LO_2^{\bullet} \longrightarrow In-OOL$
3. $LOOH \longrightarrow LO^{\bullet} + ^{\bullet}OH$	12. $In^{\bullet} + In^{\bullet} \longrightarrow \text{productos}$
4. $2LOOH \longrightarrow LO_2^{\bullet} + LO^{\bullet} + H_2O$	13. $In^{\bullet} + LH \longrightarrow InH + L^{\bullet}$
5. $LOOH + LH \longrightarrow LO^{\bullet} + L^{\bullet} + H_2O$	14. $InH + LOOH \longrightarrow \text{productos}$
6. $L^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow L-L$	15. $InH + O_2 \longrightarrow In^{\bullet} + HO_2^{\bullet}$
7. $L^{\bullet} + LO_2^{\bullet} \longrightarrow LOOL$	16. $InOOL \longrightarrow InO^{\bullet} + LO^{\bullet}$
8. $LO_2^{\bullet} + LO_2^{\bullet} \longrightarrow \text{productos}$	17. $In^{\bullet} + O_2 \longrightarrow InOO^{\bullet}$

1.7 Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano

Las propiedades antioxidantes de los AEO se han evaluado en sebo almacenado a 75 °C, con una mayor efectividad de los AEO en la estabilización del sebo comparado con otros extractos como tomillo y mejorana (Economou y col., 1991). El timol y el carvacrol muestran fuertes propiedades antioxidantes (Baratta y col., 1998), razón por la cual, ha llevado a considerar que la actividad antioxidante reportada en varios estudios (Botsoglou y col., 2003; Economou y col., 1991) se encuentra definida por la presencia de estos compuestos fenólicos, que por su capacidad de secuestrar radicales libres, se razona, son los responsables del potencial antioxidante de los extractos de orégano (Botsoglou y col., 2003; 2002; Zekaria, 2000). Otros compuestos minoritarios tal como γ -terpineno y p -cimeno, dos monoterpenos hidrocarbonados que constituyen alrededor del 5 y 7% del total del aceite, respectivamente, también contribuyen a esta actividad en forma directa y como precursores del timol y carvacrol (Botsoglou y col., 2003).

La tabla 1–9 resume los resultados obtenidos en algunos trabajos donde realizan la inclusión de orégano como antioxidante natural en dietas de ponedoras; Bernal y col., (2003) evaluaron la estabilidad oxidativa en huevos de ponedoras alimentadas durante 30 días con dietas que tenían 0 y 12.7% de semilla de linaza molida como fuente de enriquecimiento con AGPI y que incluían una mezcla de antioxidantes sintéticos (BHA –

100 mg/Kg y BHT – 100 mg/Kg), o una de dos posibilidades de antioxidante natural, orégano (200 mg/Kg) o romero (200 mg/Kg), ellos reportaron que el uso de antioxidantes sintéticos o naturales, disminuyeron la concentración de MDA como indicador del grado de peroxidación lipídica, sugirieron una relación directa entre el aumento del contenido de MDA en yema de huevo y el tiempo de almacenamiento en huevos enriquecidos con AGPI, sin importar el tipo de antioxidante empleado en la dieta. El grupo de Botsoglou y col., (2005), evaluó por 56 días una dieta basal con 30 mg de acetato α -tocoferol/Kg, derivado de una premezcla comercial y la comparo con dietas suplementadas con acetato de α -tocoferol adicional (200 mg/Kg) y material vegetal seco molido a 2 mm de romero (5 g/Kg), orégano (5 g/Kg) y azafrán (20 mg/Kg), ellos encontraron diferencias significativas por efecto del tratamiento, donde el grupo control presento la menor estabilidad oxidativa, mientras que las dietas con α -tocoferol presentaron la menor concentración de MDA en yema, seguidas del azafrán, los grupos con orégano y romero no mostraron diferencias significativas entre ellos y presentaron una concentración de MDA mayor comparado con α -tocoferol y azafrán. El tiempo de almacenamiento no fue significativo sobre la estabilidad oxidativa. Un trabajo similar fue realizado por Florou-Paneri y col., (2005), ellos trabajaron en gallinas de 32 semanas de edad alimentadas por 60 días con una dieta control, una dieta suplementada con 200 mg/Kg de vitamina E y dos niveles de suplementación con aceite esencial de orégano (50 y 100 mg/Kg), en forma semejante, se presentaron diferencias significativas para la estabilidad oxidativa por efecto del tratamiento, pero sin cambios durante el tiempo de almacenamiento ($P > 0.05$); el grupo control presentó una mayor oxidación en comparación con la dosis más baja de orégano, que a su vez presentó un mayor grado de oxidación lipídica respecto a la dosis más alta, la vitamina E presento el menor contenido de MDA en comparación con los otros tratamientos, de estos resultados, ellos sugirieron que el AEO ejerce una actividad antioxidante dependiente de la dosis en la dieta. Radwan y col (2008) evaluaron dietas experimentales con cuatro tipos de hierbas (Orégano, romero, tomillo y cúrcuma) como antioxidantes naturales en dos niveles (0.5% y 1%) y las compararon con dietas suplementadas con 100 y 200 mg/Kg de vitamina E y una dieta control sin vitamina E, ellos concluyeron que la adición de 1% de orégano o romero o 0.5% y 1% de cúrcuma redujeron en forma significativa la formación de MDA en la yema

de huevo y mostraron un efecto positivo sobre la estabilidad oxidativa de los huevos en almacenamiento. Orhan y Eren (2011) alimentaron durante 16 semanas ponedoras de 34 semanas de edad con uno de cuatro tratamientos, una dieta control negativo sin suplementación con aceite de pescado como fuente de AGPI y sin suplementación de aditivos antioxidantes, un tratamiento control que incluía un 1.5% de aceite de pescado sin la inclusión de aditivo antioxidante, dieta control suplementada con una mezcla de hierbas (Hojas de orégano, tomillo, aceite esencial de tomillo, orégano, ajo, anís e hinojo) y una dieta control suplementada con una mezcla de antioxidantes sintéticos (Etoxiquin, BHT, BHA, ácido cítrico), en los resultados ellos no reportaron diferencias significativas en el contenido de MDA en yema de huevo entre los tratamientos control negativo y control a los 42 días de almacenamiento a 4°C, mientras que la adición de la mezcla de hierbas redujo la concentración de MDA en la yema hasta los 56 días de almacenamiento. En estos trabajos, los autores sugieren que los componentes antioxidantes incluidos en el alimento de ponedoras pueden ser transferidos a la yema de huevo. Krause y Ternes (1999) sugirieron que aproximadamente se logra una transferencia de 0.004% de cimeno-2,3-diol y 0.006% de timol a la yema de huevo después de 12 días de alimentación con dietas que incluían aceite esencial de orégano, evidencia que demuestra que los compuestos antioxidantes presentes en los AE, pueden ser absorbidos, quedando disponibles en el sistema circulatorio después de la ingestión. Sin embargo, la biodisponibilidad de estos compuestos y los mecanismos de deposición no es clara debido a la falta de un método capaz de identificar y cuantificar cada constituyente antioxidante del aceite esencial depositado en diferentes tejidos (Zekaria, 2000).

Efecto del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth sobre el desempeño productivo de ponedoras marrón y la Peroxidación lipídica de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados durante su almacenamiento

Tabla 1-6: Resumen de resultados del uso de AEO en la dieta de ponedoras

Autor	Tratamientos	Aditivo antioxidante	Respuesta productiva	Respuesta antioxidante
Orhan and Eren, 2011	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control negativo: 1.5% aceite de soya, sin enriquecimiento o compuesto antioxidante. 2. Control: 1.5% aceite de pescado + 1.5% aceite de soya. 3. Dieta control + 0.5 g/Kg de MH (Mezcla de hierbas y aceites esenciales). 4. Dieta control + 0.5 g/Kg de antioxidante sintético (Mezcla etoquixin + BHT + BHA) 	Hojas secas de orégano, tomillo, anís, ajo, hinojo mezclado con aceites esenciales de tomillo, orégano, ajo e hinojo.	La producción de huevos, consumo de alimento, conversión alimenticia, peso del huevo y huevos rotos no presento diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.	El uso del antioxidante sintético o la mezcla de hierbas en las dietas con aceite de pescado, mejoraron la estabilidad oxidativa de los huevos en almacenamiento.
Radwan y col., 2008	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dieta control 2. Dieta control + 100 o 200 mg/Kg de dieta. 3. Dieta control + 0.5 o 1% de aceites esencial 	Aceites esenciales de orégano, tomillo, romero y cúrcuma	1% de tomillo, orégano o romero incremento la masa y producción de huevos y mejoro la conversión. Se redujo la concentración total de lípidos en la yema.	La adición de 1% de orégano y romero redujo la formación de MDA en yema de huevo y mejoro la estabilidad de los huevos en almacenamiento.
Florou-Paneri y col., 2005	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dieta basal (maíz – soya) 2. Dieta basal + 50 mg/Kg de aceite esencial 3. Dieta basal + 100 mg/Kg de aceite esencial 4. Dieta basal + 200 mg/kg de α-tocoferol 	Aceite esencial de orégano	No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la producción de huevo, consumo de alimento, conversión alimenticia, peso y forma del huevo entre tratamientos dietarios.	El grado de oxidación lipídica fue mayor en el control respecto a la inclusión de fuentes antioxidantes, la vitamina E (α -tocoferol) presento la tasa de oxidación lipídica más baja.
Botsoglou y col., 2005	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dieta control (30 mg/Kg de vitamina E). 2. Dieta control + 200 mg/Kg de vitamina E adicionales. 3. Control +5 g/Kg romero. 4. Control+5g/Kg oregano. 5. Control+20mg/Kg azafrán. 	Material vegetal seco de hojas, tallos y flores de romero, orégano, azafrán.	La producción de huevos, consumo de alimento y conversión alimenticia, junto con las características de peso y forma del huevo, grosor de la cascará, unidades haugh no fueron afectadas significativamente ($P > 0.05$) por los tratamientos.	La estabilidad oxidativa fue diferente ($P < 0.05$) entre tratamientos, sin efecto del tiempo de almacenamiento. MDA fue menor con de vitamina E, romero y orégano sin diferencias entre ellos solo superaron al tratamiento control.
Bernal y col., 2003	<ol style="list-style-type: none"> 1. Control 0% linaza 2. Control + BHT/BHA 3. Control + orégano 4. Control + romero 5. Control 12.7% linaza 6. 12.7% linaza+ BHT/BHA 7. 12.7% linaza + orégano 8. 12.7% linaza + romero 	Aceite esencial de orégano y romero	No se mencionan resultados a nivel productivo	MDA fue mayor en tratamientos con linaza. La estabilidad oxidativa presento diferencias significativas ($P < 0.05$) por la inclusión del antioxidante en las dietas. El uso de antioxidantes, mejoro la protección de la fracción lipídica en almacenamiento.

2. Desempeño productivo de ponedoras marrón alimentadas con dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth

2.1 Introducción

La industria avícola en los últimos años ha realizado esfuerzos considerables en la oferta de productos con valor agregado y no se ha mostrado distante de la preocupación de los consumidores en cuanto al tema de las grasas saturadas en los alimentos, especialmente en el tema del colesterol dietario y su relación con enfermedades coronarias y el desarrollo de algunas formas de cáncer (Simopoulos, 2000; Hargis y van Elswyk, 1991). Por su función biológica un huevo contiene entre 200 – 250 mg de colesterol y la modificación en su concentración no ha sido exitosa, ya que, en los casos donde se ha logrado una reducción significativa, se han visto efectos negativos sobre la producción, especialmente sobre el tamaño del huevo (Leeson y Zubair. 1996), mientras que, el contenido de ácidos grasos (AG) del huevo puede modificarse en mayor magnitud desde la suplementación dietaria, siendo esta la alternativa en busca de mejorar el valor nutricional de los huevos (Hargis y Van Elswyk, 1991).

La inclusión de aceites de pescado y el uso de fuentes vegetales en dietas de ponedoras se ha empleado como una estrategia exitosa en el enriquecimiento de huevos con ácidos grasos poli insaturados (AGPI); Hargis y Van Elswyk (1991) concluyeron que el perfil lipídico de los huevos de gallinas alimentadas con 3% de aceite de pescado fue diferente al compararlo con los de aves suplementadas con aceite de lino, observándose un incremento con el uso de pescado de 3.5 y 0.52% de los ácidos docosahexanoico (DHA) y eicosapentanoico (EPA), respectivamente. La estrategia del enriquecimiento con AGPI parece una alternativa viable para mejorar la concentración con AG esenciales, sin embargo, el aumento en el contenido de AGPI en la yema de huevo promueve la

susceptibilidad a la oxidación lipídica, razón por la cual, los antioxidantes sintéticos o de origen natural han sido considerados en la industria de alimentos balanceados (Yannakopoulos y col., 2005). Cabuk y col., (2006) mencionaron que los extractos vegetales pueden desempeñar un papel importante en el desempeño y el estado sanitario de los animales, con posibles efectos benéficos como la estimulación del apetito y consumo de alimento, mejoras en la secreción de enzimas digestivas endógenas y respuesta inmune, y han cobrado interés como sustitutos de antioxidantes sintéticos (Radwan y col., 2008; Botsoglou y col., 2005; Baratta y col., 1998), con particular énfasis en los extractos de la familia *Labiatae*, especialmente romero, tomillo y orégano (Botsoglou y col., 2002).

Los fenoles carvacrol y timol son los componentes principales del aceite esencial de orégano (AEO), en el caso del orégano griego (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*) constituyen alrededor del 90.3% carvacrol y 3.5% timol, respectivamente (Ariza y col., 2011) y se considera, son los principales responsables de la actividad antioxidante (Adam y col., 1998). El orégano como aceite esencial o material vegetal seco se ha usado en dietas de pollo de engorde (Botsoglou y col., 2003), pavos (Florou-Paneri y col., 2005a) y ponedoras (Orhan y Eren., 2011; Radwan y col., 2008; Cabuk y col., 2006; Florou-Paneri y col., 2005b), sin efecto negativo sobre el desempeño productivo de los animales suplementados con inclusiones hasta de 200 mg/Kg como AEO o 1% de la dieta en hojas secas, excepto para el peso del huevo, variable para la cual se ha reportado una reducción en el peso y que se considera es resultado de la inclusión de aceite o harina de pescado en la dieta (Castillo y col., 2005). El AEO proveniente del Alto Patía en Nariño – Colombia (*Lippia origanoides* Kunth) es característico respecto a otras variedades de orégano, ya que su composición es predominante en timol (67.2% - 78.7%) y bajo carvacrol (0.9% - 1.2%), razón por la cual, es posible presente una mayor actividad antioxidante, ya que el timol presenta un mayor impedimento estérico del grupo -OH, en comparación con el carvacrol (Yanishlieva y col., 1999). Sin embargo, la inclusión del aceite esencial en las dietas de ponedoras y su efecto sobre el desempeño productivo es poco documentado, por esta razón, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación del efecto de inclusión de aceite esencial de orégano *Lippia origanoides*

Kunth en dietas con aceite de palma o pescado como fuente de enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados sobre el desempeño productivo de ponedoras marrón.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Ubicación

El estudio se realizó en la unidad de Avicultura del Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica, ubicado en el kilómetro 14 vía Mosquera en el occidente de la sabana del departamento de Cundinamarca, a una altitud de 2516 m.s.n.m., con una temperatura promedio entre 12 y 14°C.

2.2.2 Animales y dietas

Se utilizaron 216 ponedoras de la estirpe Babcock Brown de 48 semanas de edad alojadas individualmente en jaulas de postura; Las aves fueron distribuidas y asignadas aleatoriamente en uno de seis tratamientos, cada uno de ellos con seis réplicas de seis ponedoras (Figura 2–1). Las dietas se formularon mediante la herramienta Solver de Excel®, teniendo en consideración los requerimientos nutricionales para ponedoras reportados por Rostagno (2005). Una de las dietas se formuló con inclusión de aceite de palma y la otra con aceite de pescado como fuente de enriquecimiento con AGPI (Tabla 2–1), el perfil de ácidos grasos de cadena larga de las dietas basales se encuentra resumido en la tabla 2–2 (Determinado mediante protocolo para la derivatización de ácidos grasos de cadena larga adaptado por el laboratorio de nutrición animal del Centro de Biotecnología y Bioindustria – CBB de Corpoica) Los tratamientos (Tabla 2–3) consistieron en 1) Dietas con inclusión de 2% de aceite de palma sin ningún tipo de suplementación (CONTP), 2) Dietas con inclusión de 2% de aceite de pescado sin suplementación (CONT), 3) Pescado con adición de 200 g/Ton de vitamina E (VITE), 4) Pescado con inclusión de 100 g/Ton de AEO (O100), 5) Pescado con inclusión de 150 g/Ton de AEO (O150) y 6) Pescado con inclusión de 200 g/Ton de AEO (O200). Diariamente se ofrecieron 120 g/ave de alimento en harina y 2 g/ave de carbonato de calcio grueso en el comedero, el suministro de agua durante el ensayo fue a voluntad.

Efecto del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth sobre el desempeño productivo de ponedoras marrón y la Peroxidación lipídica de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados durante su almacenamiento

Tabla 2-1: Composición dieta basal (Formulación realizada en Solver – Excel®)

Ingrediente	Inclusión (%)
Maíz	53,06
Harina de arroz	6
Torta soya – 49%	21
Soya extruida	5
Harina pescado	1
Aceite de pescado o palma	2
Carbonato de Ca	9
Fosfato tricálcico	1,61
Sal	0,3
Bicarbonato de sodio	0,5
DL – Metionina	0,16
Cloruro colina – 60%	0,07
Premezcla minerales y vitaminas	0,3
Análisis estimado	
EMAn (Mcal/kg)	2.8
PC (%)	19
EE (%)	6.3
Ca (%)	4.2

Tabla 2-2: Perfil ácidos grasos dietas basales

Aceite	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C22:6	AGS	AGMI	AGPI
Palma	1.7	11.0	1.9	20.4	20.5	-	24.1	20.4	54.4
Pescado	2.5	12.1	2.9	20.2	26.1	6.4	15.9	20.2	63.7

C14:0 – Mirístico, C16:0 – Palmítico, C18:0 – Estearico, C18:1 Oleico, C18:2 – Linoleico, C22:6 – Docosahexaenoico (DHA), AGS – Ácidos grasos saturados, AGMI – Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI – Ácidos grasos poliinsaturados

Figura 2-1: Distribución de las gallinas en cada réplica



2.2.3 Registros productivos

El periodo de alimentación con las dietas experimentales se realizó durante 8 semanas (Semana 47 a 54 de edad), la primer semana se consideró como fase de acostumbramiento y el desempeño productivo se evaluó en un periodo de 7 semanas. Diariamente se suministró el alimento alrededor de las ocho de la mañana, mientras que los huevos fueron recogidos y almacenados a las dos de la tarde, aproximadamente. Al final de cada semana se realizó el pesaje de los residuales de alimento, junto con el conteo, pesaje y clasificación de huevos para cada réplica. El consumo diario de alimento (CDA - g/ave/día), el porcentaje de postura (PP - %), el peso del huevo (PH - g), la conversión masa de huevo (CMH) y conversión por docena de huevo (CDH) se calcularon semanalmente para cada uno de los tratamientos de acuerdo con los registros de alimentación y postura.

Tabla 2-3: Descripción tratamientos experimentales

Tratamiento	Abreviatura
Dieta basal (2% aceite de palma) + 0 g/Ton AEO	CONT
Dieta basal (2% aceite de pescado) + 0g/Ton AEO	CONTP
Dieta basal (2% aceite de pescado) + 200 g/Ton Vitamina E	VITE
Dieta basal (2% aceite de pescado) + 100 g/Ton AEO	O100
Dieta basal (2% aceite de pescado) + 150 g/Ton AEO	O150
Dieta basal (2% aceite de pescado) + 200 g/Ton AEO	O200

2.2.4 Análisis estadístico

Los datos productivos de la semana 47 se usaron como covariable para ajustar las diferencias iniciales entre tratamientos. El análisis de varianza para el efecto del aceite de palma o pescado en la dieta y la suplementación con antioxidantes (Vitamina E o AEO) sobre la respuesta productiva (CDA, PP, PH, CMH, CDH), se analizó bajo un diseño completo al azar. La comparación de medias se realizó por medio de contrastes ortogonales con el objetivo de determinar las diferencias por efecto del tipo de aceite incluido en la dieta y dentro de las dietas con aceite de pescado, establecer la comparación por la fuente o el nivel de antioxidante suplementado. Los contrastes evaluados fueron:

1. Dietas con aceite de Palma vs Dietas con aceite de Pescado
2. Dietas con aceite de Pescado Sin antioxidante vs. Dietas con aceite de Pescado con antioxidante

3. Dietas con aceite de Pescado con Vitamina E vs Dietas con aceite de Pescado con cualquier nivel de AEO
4. Tendencia lineal por inclusión del AEO en las Dietas con aceite de Pescado
5. Tendencia cuadrática por inclusión del AEO en las Dietas con aceite de Pescado

Los análisis se realizaron en el paquete estadístico SAS, mediante el programa GLM (SAS versión 9.2, Cary, NC, USA, 2008). El modelo empleado fue el siguiente:

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

y_{ij} = corresponde a las variables productivas analizadas

μ = media general

τ_i = efecto tipo de aceite o inclusión del antioxidante

Cov_{ij} = Ajuste por covariable, datos productivos durante la semana 47

e_{ij} = error experimental

2.3 Resultados y discusión

El ajuste para las variables productivas analizadas por el valor registrado en la semana 47 como covariable, fue significativo. El efecto del aceite de palma o pescado en la dieta y la suplementación con la Vitamina E o AEO como antioxidante en las dietas con aceite de pescado sobre el desempeño productivo se encuentra resumido en la Tabla 2–4.

El CDA no fue diferente ($P > 0.05$) por efecto del tipo de aceite o antioxidante suplementado en la dieta. La dieta formulada con aceite de palma presentó un PP superior en 3.4% comparado con los tratamientos formulados con aceite de pescado (Figura 2–2). Por efecto de la inclusión de antioxidantes, el PP fue numéricamente superior ($P < 0.1$) en la dieta con aceite de pescado sin inclusión de antioxidantes (91.7 %) en comparación con las dietas con aceite de pescado que incluían cualquier antioxidante (89 %) (Figura 2–3). La CDH fue diferente ($P < 0.05$) entre dietas con aceite de pescado (1.46) y palma (1.39), este último grupo presentó una mayor eficiencia en el uso de alimento por docena de huevo (Figura 2–4), mientras que la CMH para el grupo de ponedoras alimentadas con aceite de palma fue numéricamente ($P < 0.1$) menor (1.72), comparado con los grupos de aves alimentadas con dietas que incluían aceite de

pescado (1.77) (Figura 2–5). Por efecto de la inclusión de antioxidantes dentro de las dietas con aceite de pescado, la eficiencia de conversión en docenas de huevo (CDH) fue numéricamente mejor ($P<0.1$) para el tratamiento sin uso de antioxidantes (1.41), respecto al uso de estos aditivos (1.47) (Figura 2–6), mientras que la CMH no fue significativamente diferente por adición o no del antioxidante en la dieta. La CDH no presentó diferencias significativas por efecto de la vitamina E o AEO, mientras que para CMH, la dieta con adición de vitamina E (1.41) fue mejor ($P<0.05$) en comparación con la inclusión de AEO en los niveles evaluados (1.47) (Figura 2–7). Los resultados de este trabajo para CDA concuerdan con los efectos reportados por efecto del tipo de aceite de Meluzzi y col (2000) quienes no encontraron diferencias productivas al usar diferentes fuentes de ácidos grasos en la dieta, en forma similar, Castillo y col (2005) no encontraron diferencias en los parámetros productivos de ponedoras alimentadas con dietas que tenían aceite de atún en niveles de 1 y 2%, sin embargo, ellos reportaron diferencias para el peso del huevo, este fue menor en las dietas ricas en AGPI producto de la inclusión del aceite de atún respecto al grupo control, resultado que es contrastante con el comportamiento observado para el PH del presente trabajo, ya que, los huevos provenientes de aves alimentadas con dietas que tenían aceite de pescado (68.3 g) fueron significativamente más pesados respecto a la dieta con aceite de palma (67.1 g) (Figura 2–8).

Tabla 2-4: Efecto de los tratamientos experimentales sobre el desempeño productivo de ponedoras marrón

Tratamiento ¹	CDA	CDH	CMH	PH	PP
CONT ¹	108.6	1.39	1.72	67.1	92.9
CONT	109.5	1.43	1.78	67.5	91.7
VITE	109.1	1.45	1.70	68.3	89.2
O100	109.7	1.51	1.80	69.5	88.4
O150	108.6	1.42	1.73	69.9	89.5
O200	109.4	1.48	1.82	66.2	88.9
ESM ²	1.16	0.019	0.027	0.33	1.45
Contrastes			Pr >t		
Palma vs Pescado	0.6103	0.0003	0.0928	0.0049	0.0383
Pescado Sin vs Pescado Antioxidante	0.7973	0.0602	0.7316	0.0191	0.0940
Pescado VitE vs AEO	0.9401	0.1600	0.0231	0.5488	0.8700
Pescado AEO lineal	0.7720	0.3644	0.6365	0.0247	0.2391
Pescado AEO cuadrático	0.7857	0.6754	0.2275	<0.0001	0.3508

¹ CONT¹: Dieta basal con 2% aceite palma, CONT: Dieta basal con 2% aceite pescado, VITE: Pescado con 200 g/Ton de vitamina E, O100: Pescado con 100 g/Ton AEO, O150: Pescado con 150 g/Ton AEO, O200: Pescado con 200 g/Ton AEO

² Error estándar de la media; CDA – Consumo diario de alimento (g/ave/día); CDH – Conversión docena huevo; CMH – Conversión masa huevo; PH – Peso huevo (g); PP – Porcentaje de postura (%).

Figura 2-2 Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre el porcentaje de postura (Contraste Palma vs Pescado, $Pr>t = 0.0383$)

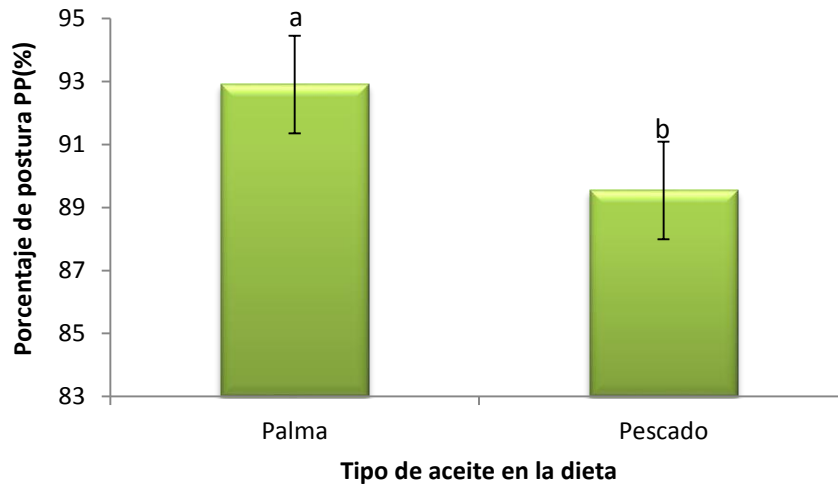
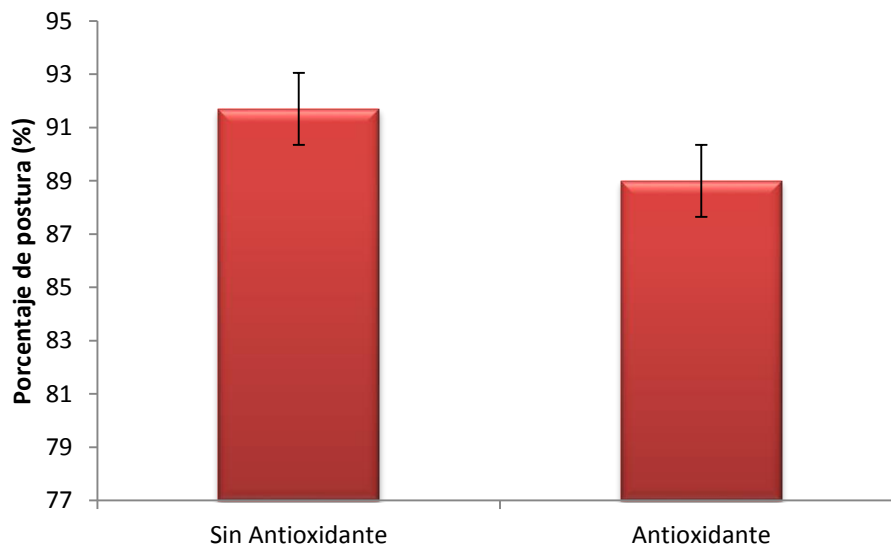


Figura 2-3 Efecto de la inclusión de antioxidantes en dietas con aceite de pescado sobre el porcentaje de postura (Contraste Pescado sin vs Pescado antioxidante, $Pr>t = 0.0940$)



El peso de huevos de ponedoras alimentadas con dietas que tenían aceite de pescado y que se les adiciono algún antioxidante (68.5 g) fueron más pesados ($P<0.05$) que los huevos de ponedoras alimentadas con dietas con aceite de pescado y sin suplementación del aditivo (67.3 g) (Figura 2–9), sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en el peso de huevos de los tratamientos suplementados con

vitamina E o AEO. Van Elswyk (1997) sugirió que la reducción en el peso de los huevos asociada a dietas enriquecidas con AGPI, puede ser resultado de la reducción en los niveles de triglicéridos en sangre a causa de los ω -3 presentes en la dieta, aspecto que limitaría los lípidos disponibles para la formación de la yema de huevo, este argumento no explicaría los resultados aquí presentados, ya que el peso de huevo fue mayor en las dietas con aceite de pescado, estas diferencias pueden ser producto del efecto del AEO incluido en las dietas enriquecidas con AGPI, ya que al reducir la presentación de procesos oxidativos, permitiría una mayor disponibilidad de AG para deposición en el huevo, sin embargo, en este trabajo no se consideró la evaluación del efecto de los tratamientos sobre variables sanguíneas, limitando la conclusión desde la variación de perfiles lipídicos en sangre y su disponibilidad durante la formación del huevo.

Figura 2-4: Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre la conversión docena huevo– CDH (Contraste Palma vs Pescado, $Pr>t = 0.0003$).

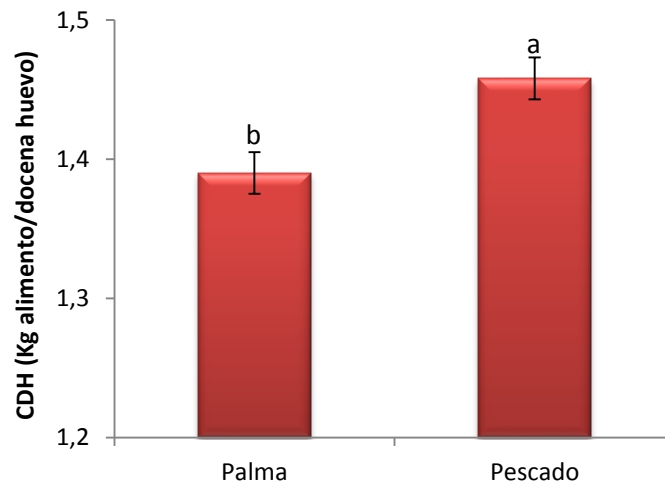
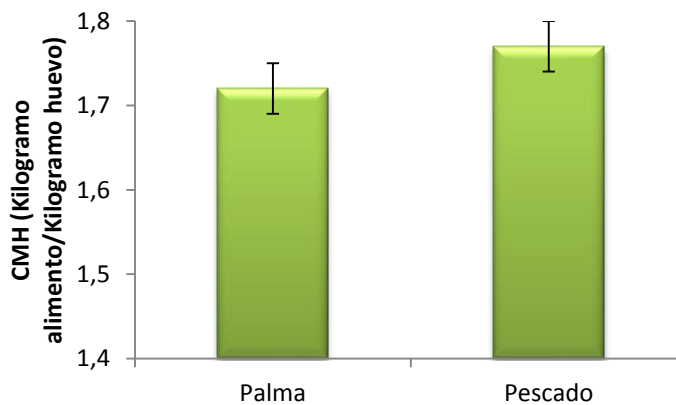


Figura 2-5: Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre la conversión masa huevo – CDH (Contraste Palma vs Pescado, $Pr>t = 0.0928$)



El peso de los huevos mostró una respuesta con tendencia lineal ($Y = 0.02 \cdot \text{AEO} + 67.6$; $R^2 = 0.97$) – cuadrática ($Y = -0.0003 \cdot \text{AEO}^2 + 0.06 \cdot \text{AEO} + 67.4$; $R^2 = 0.88$) en función de la inclusión del AEO en la dieta (Figura 2–10), los pesos más altos se presentaron con los tratamientos O100 (69.5 g) y O150 (69.9 g), mientras que O200 (66.2 g) mostro el menor peso. En cuanto al efecto del AEO, los resultados están de acuerdo con los datos reportados por Florou-Paneri y col (2005b), ellos no encontraron diferencias significativas en los parámetros consumo de alimento y producción de huevo con dietas maíz – soya suplementadas hasta con 100 g/Ton de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), al igual que Orhan y Eren (2011) quienes no encontraron diferencias en los parámetros productivos de ponedoras alimentadas con dietas suplementadas con 0.5 g/Kg de una mezcla de hojas secas de plantas aromáticas (*Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*) y aceites esenciales (Tomillo, orégano, ajo, hinojo y anís), mientras que, Radwan y col (2008) reportaron que la única variable productiva que no fue afectada por la suplementación de hojas de orégano, tomillo, romero o curcuma en inclusiones de 0.5 y 1% en la dieta, fue el consumo de alimento, mientras que la inclusión más alta de las hierbas y de 200 g/Ton de Vitamina E, mejoro significativamente las variables peso del huevo, masa de huevo, peso corporal, porcentaje de producción y conversión alimenticia en comparación con el grupo control.

Figura 2-6: Efecto de la adición de antioxidantes en dietas con aceite de pescado sobre la conversión docena huevo – CDH (Contraste Pescado sin vs Pescado antioxidante, $Pr > t = 0.0602$)

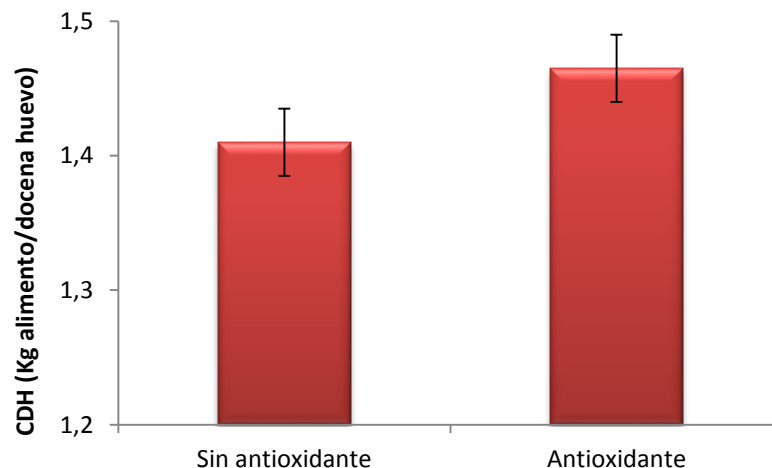
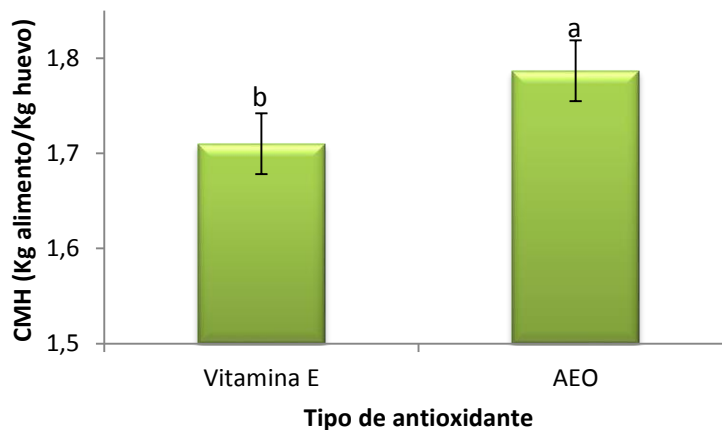


Figura 2-7: Efecto de la adición de vitamina E o AEO en dietas con aceite de pescado sobre la conversión masa huevo – CMH (Contraste Pescado VitE vs AEO, $P > t = 0.0231$).



En los estudios realizados en cuanto al uso de aceites esenciales de orégano en sistemas de alimentación de ponedoras, no se ha dado un consenso respecto al efecto de su inclusión sobre el desempeño productivo. Radwan y col (2008) sugieren que las inclusiones de hojas de orégano secas en niveles del 1%, mejoran los parámetros productivos respecto a dietas sin suplementación, este resultado parece ser consecuencia de los compuestos fenólicos presentes en las plantas de la familia Labiatae, que se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante, determinando así, una mejor utilización de nutrientes por parte del ave, en otras especies se reportó que la inclusión de una mezcla de salvia – orégano mejoró la relación profundidad de la cripta/altura de la vellosidad, aumentando el área de absorción, resultado que se vio reflejado en un mayor crecimiento y estado sanitario de los animales suplementados (Radwan y col, 2008). Las diferencias entre estudios pueden ser resultado de las condiciones particulares en cada ensayo, como edad de las aves, dietas basales empleadas, presentación del orégano y en el caso del presente trabajo, del aceite esencial, ya que los estudios mencionados usaron orégano griego (*Oreganum vulgare* subsp. Hirtum), el cuál presenta una composición diferente al aceite esencial de orégano obtenido de la especie *Lippia origanoides* Kunth, del Alto Patía en Nariño, que se caracteriza por presentar una mayor proporción de timol, respecto a carvacrol (Ariza y col., 2011), que es el metabolito mayoritario en gran parte de las especies de orégano, y que puede ser el responsable del comportamiento diferencial respecto a los estudios con otros aceites esenciales o materiales vegetales.

Figura 2-8: Efecto del tipo de aceite en la dieta sobre el peso del huevo (Contraste Palma vs Pescado, $Pr > t = 0.0049$)

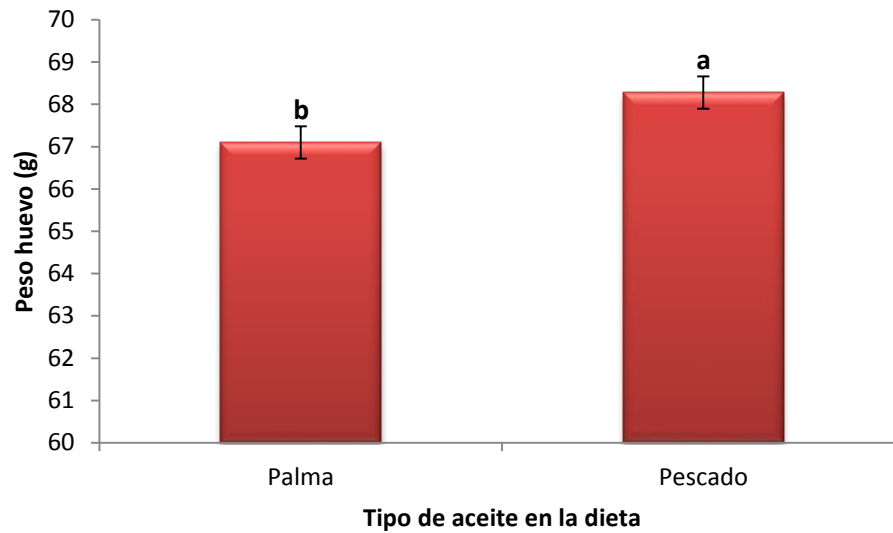


Figura 2-9: Efecto de la inclusión de antioxidantes en dietas con aceite de pescado sobre el peso del huevo (Contraste Pescado sin vs Pescado antioxidante, $Pr > t = 0.0191$)

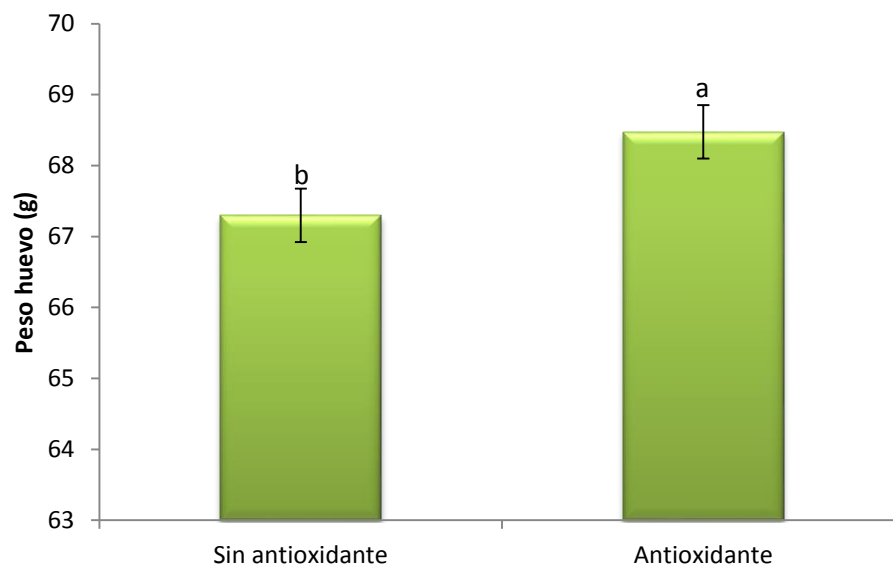
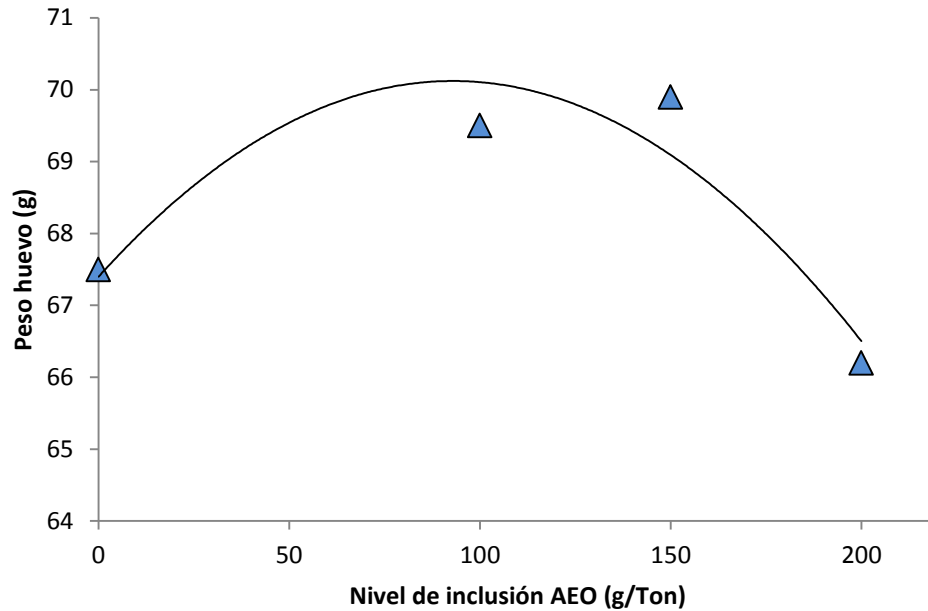


Figura 2-10: Efecto de la inclusión del AEO (*Lippia origanoides* Kunth) en dietas con aceite de pescado sobre el peso del huevo de ponedoras marrón (Tendencia lineal AEO: $Y = 0.02 \cdot \text{AEO} + 67.6$; $R^2 = 0.97$, $\text{Pr}>t = 0.0247$; Tendencia cuadrática AEO: $Y = -0.0003 \cdot \text{AEO}^2 + 0.06 \cdot \text{AEO} + 67.4$; $R^2 = 0.88$, $\text{Pr}>t = <0.0001$)



2.4 Conclusiones

El consumo diario de alimento por ave no fue diferente entre tratamientos experimentales, este resultado puede estar explicado por la densidad energética y proteica similar en las dietas experimentales, junto con el efecto de la estrategia de alimentación comercialmente empleada en sistemas de producción de ponedoras, en la cual, se acude a la oferta restringida de alimento como una estrategia enfocada a evitar el engrasamiento de las aves en ciclo productivo.

Se presentó una mejor eficiencia de conversión del alimento por docena y kg de huevo de la dieta con 2% de aceite palma, siendo más baja la CDH y CMH en 4.7 y 2.8%, respectivamente, en comparación con las dietas que tenían 2% de aceite de pescado, mientras que el PP fue mayor en 3.4% para palma, sin embargo el peso de los huevos fue superior en 1.1 g en los tratamientos con aceite de pescado.

Por efecto de la inclusión de antioxidantes en la dieta, se presentó un 3.9% más de eficiencia en la conversión de alimento por docena de huevos y 4% más de postura en

los tratamientos sin uso de antioxidantes, mientras que los huevos de las dietas que fueron suplementadas con los antioxidantes fueron más pesados en 1.2 g.

El desempeño productivo de las aves no fue afectado por la suplementación con vitamina E (200 g/Ton) o AEO hasta niveles de 200 g/Ton en las dietas formuladas con aceite de pescado, sin embargo, la eficiencia de conversión de alimento por kg de huevo fue mayor (4.3%) para el tratamiento con vitamina E.

El peso del huevo mostró un comportamiento lineal – cuadrático en función del nivel de AEO incluido en la dieta, con un incremento en el peso del huevo de 0.02 g por unidad de AEO incluido en la dieta en dosis hasta de 150 g/Ton. El mayor peso se obtuvo para la superficie entre 100 y 150 g/Ton de AEO (69.7 g).

La suplementación de aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth en niveles hasta 100 g/ton en dietas para ponedoras no afectó el desempeño productivo de las ponedoras, sin embargo, mejoró el peso promedio del huevo.

3. Suplementación de dietas con aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth y su efecto sobre la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en almacenamiento

3.1 Introducción

El concepto de seguridad alimentaria considera el acceso que toda persona debería tener a la comida, tanto en cantidad como en la calidad necesaria para suplir las necesidades nutricionales y poder tener una vida saludable y para el sector avícola es bien conocido el rol que juega el huevo en este campo, al ser la proteína de mayor valor nutricional, accesibilidad y menor costo (Fenavi, 2013b). El huevo es considerado como uno de los alimentos naturales más completos por su equilibrada proporción de proteínas, carbohidratos, grasa, minerales y vitaminas (Lozano, 2012); en colesterol alcanza los 200 a 250 mg por unidad, razón por la cual, el consumo excesivo se ha asociado con el riesgo de padecer enfermedades coronarias y el desarrollo de algunas formas de cáncer relacionadas con el consumo excesivo de grasas saturadas (Simopoulos, 2000; Hargis y van Elswysk, 1991), razón por la cual, Leeson y Zubair (1996) mencionaron que durante la década de los 90, el consumo de huevo se redujo como resultado de la preocupación de los consumidores por las grasas saturadas en los alimentos, especialmente por el colesterol dietario. Por esta razón, y sumado a la intención del sector avícola en consolidar nuevos mercados y propender por dar acceso a poblaciones con acceso limitado a ciertos alimentos y sus aportes nutricionales, específicamente alimentos pesqueros y su aporte de ácidos grasos esenciales, se ha pensado en la generación de valor agregado como la estrategia a seguir en los sistemas avícolas (Fenavi, 2014). Bajo este enfoque, una de las posibilidades para generar valor

agregado, ha sido el enriquecimiento de huevos con vitaminas y por demanda de los consumidores se han realizado esfuerzos importantes en el incremento de los contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), particularmente ácidos grasos (AG) de las familias ω -6 y ω -3 que son considerados como esenciales, ya que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y son necesarios en funciones vitales del organismo (FAO, 2002), razón por la cual, deben ser suministrados en la dieta (Castro, 2002). Los AGPI de cadena larga como el ácido eicosapentaenoico – EPA y docosahexaenoico – DHA son de gran importancia en el desarrollo del cerebro y la retina durante la gestación y en los primeros años de vida de los niños. Tienen propiedades hipocolesterolémicas y ayudan en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, inmunológicas, diabetes, enfermedades del sistema nervioso, cáncer de colon, reducen procesos inflamatorios, entre otras. Los compuestos sintetizados a partir de las familias ω -6 y ω -3 tienen efectos opuestos, el ácido araquidónico – ARA y linoleico – LA, principales representantes de la serie ω -6, son precursores de prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 y de leucotrienos de la serie 4, potentes vasoconstrictores y favorecen la formación de trombos, procesos inflamatorios y adherencias plaquetarias, mientras que el ácido eicosapentaenoico – EPA (ω -3), es precursor de prostaglandinas y tromboxanos de la serie 3, que tienen efecto vasodilatador y reducen la formación de trombos (Castro, 2000; FAO, 2002).

La inclusión de aceites de pescado y el uso de fuentes vegetales en dietas de ponedoras da lugar al enriquecimiento de los huevos con ácidos grasos poli insaturados (AGPI), el perfil lipídico de los huevos de gallinas alimentadas con 3% de aceite de pescado fue diferente al compararlo con los de aves suplementadas con aceite de lino, observándose un incremento con el uso de pescado de 3.5 y 0.52% de los ácidos DHA y EPA, respectivamente (Hargis y Van Elswyk, 1991). Sin embargo, el aumento en el contenido de AGPI en la yema de huevo promueve la susceptibilidad a la oxidación lipídica, razón por la cual, los antioxidantes sintéticos o de origen natural han sido considerados en la industria de alimentos balanceados (Yannakopoulos y col., 2005), sin embargo, por la relación que han mostrado los compuestos sintéticos con procesos cancerígenos (Hirose y col., 1986), los extractos vegetales han cobrado interés como sustitutos de este tipo de antioxidantes (Radwan y col., 2008; Botsoglou y col., 2005; Baratta y col., 1998), con

particular énfasis en los extractos de la familia *Labiatae*, específicamente romero, tomillo y recientemente orégano (Botsoglou y col., 2002).

Los AEO han demostrado su efectividad como antioxidantes naturales cuando son comparados con los antioxidantes sintéticos descritos tanto en modelos in Vitro (Dorman y Deans, 2000) como en modelos in Vivo (Young y col., 2003). Economou y col (1991) reportaron que el AEO mejoró la estabilidad del sebo almacenado comparado con extractos vegetales de tomillo. El orégano como aceite esencial o material vegetal seco se ha usado en dietas de pollo de engorde (Botsoglou y col., 2003), pavos (Florou-Paneri y col., 2005b) y ponedoras (Orhan y Eren., 2011; Radwan y col., 2008; Cabuk y col., 2006; Florou-Paneri y col., 2005a), sin efecto negativo sobre el desempeño productivo de los animales suplementados con inclusiones hasta de 200 mg/Kg como AEO o 1% de la dieta en hojas secas. El AEO proveniente del Alto Patía en Nariño – Colombia (*Lippia origanoides* Kunth) es característico respecto a otras variedades de orégano, ya que su composición es predominante en timol (67.2% - 78.7%) y bajo carvacrol (0.9% - 1.2%); el timol se caracteriza por tener un mayor impedimento estérico comparado con el compuesto carvacrol (Yanishlieva y col., 1999), razón por la cual se presume el AEO *Lippia origanoides* Kunth, presenta una mejor capacidad antioxidante. Sin embargo, los efectos de este extracto sobre la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos se desconoce, por esta razón, el objetivo de este trabajo fue la evaluación del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth en dietas enriquecidas con AGPI sobre el perfil lipídico y la estabilidad oxidativa de huevos en almacenamiento.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Ubicación

El estudio se realizó en la unidad de Avicultura del Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica, ubicado en el kilómetro 14 vía Mosquera en el occidente de la sabana del departamento de Cundinamarca, a una altitud de 2516 m.s.n.m., la temperatura promedio se ubica entre 12 y 14°C.

3.2.2 Animales y dietas

Para evaluar la posibilidad de enriquecer huevos con AGPI como resultado de incluir aceite de pescado en la formulación de la dieta y la estabilidad oxidativa por efecto del AEO (*Lippia origanoides* Kunth) en almacenamiento se realizaron dos experimentos.

Experimento 1: Se usaron 144 ponedoras de la estirpe Babcock Brown de 47 semanas de edad alojadas individualmente en jaulas de postura; Las ponedoras se asignaron aleatoriamente en uno de cuatro tratamientos, cada uno con seis réplicas de seis ponedoras. Se formularon dos dietas basales con la herramienta Solver de Excel®, según los requerimientos nutricionales de ponedoras en producción reportados por Rostagno (2005), una con inclusión de 2% de aceite de palma y otra con aceite de pescado, (Tabla 3 – 1). Los tratamientos consistieron en 1) Dieta basal con aceite de palma sin suplementación (CONTP), 2) Dieta basal palma con inclusión de AEO a razón de 100 g/Ton (P100), 3) Dieta basal con 2% de aceite de pescado sin suplementación (CONT) y 4) Dieta basal pescado con adición de 100 g/Ton del AEO (O100).

Experimento 2: Se utilizaron 216 ponedoras de la estirpe Babcock Brown de 47 semanas de edad alojadas individualmente en jaulas de postura; Las ponedoras se asignaron aleatoriamente en uno de seis tratamientos, cada uno con seis réplicas de seis ponedoras. Las dietas experimentales fueron formuladas en condiciones similares a las descritas para el experimento 1 y la composición se encuentra descrita en la Tabla 3 – 1. Los tratamientos consistieron en 1) Dieta con inclusión de 2% de aceite de palma sin suplementación (CONTP), 2) Dieta con 2% de aceite de pescado sin suplementación (CONT), 3) Dieta basal con aceite de pescado con adición de 200 g/Ton de vitamina E (VITE), 4) Dieta basal pescado con inclusión de 100 g/Ton AEO (O100), 5) Dieta basal pescado con inclusión de 150 g/Ton AEO (O150) y 6) Dieta basal pescado con inclusión de 200 g/Ton AEO (O200). En los dos experimentos, diariamente se ofrecieron 120 g/ave de alimento en harina y 2 g/ave de carbonato de calcio grueso en el comedero; el suministro de agua durante el ensayo fue a voluntad.

3.2.3 Recolección de muestras

En los dos experimentos, se realizó la alimentación de las ponedoras con las dietas experimentales durante 8 semanas, los huevos de la última semana de alimentación

fueron pesados y clasificados para realizar la selección homogénea de los huevos destinados a los análisis respectivos. **Experimento 1:** Se recogieron 6 huevos por réplica experimental para un total de 144 huevos, de estos, se tomaron 2 por réplica para separar las yemas al tiempo cero de almacenamiento y llevar a -20° , los huevos restantes fueron almacenados por 30 y 60 días a 4°C , al finalizar cada tiempo de almacenamiento, se realizó la extracción de la yema de 2 huevos por réplica las cuales fueron congeladas a -20°C . Una vez completadas las muestras, las yemas fueron liofilizadas (Vac Clean 8) para realizar la posterior derivatización de los ácidos grasos de cadena larga y la evaluación de la estabilidad oxidativa. **Experimento 2:** Se tomaron 14 huevos por réplica experimental, para un total de 504 huevos. Para valorar el estado inicial de la oxidación lipídica, se seleccionaron 2 huevos por réplica para separar las yemas frescas y almacenarlas a -20°C , los huevos restantes fueron empleados para valorar la estabilidad oxidativa en huevos almacenados por 15, 30 y 60 días a 4°C y -10°C , al finalizar cada tiempo de almacenamiento se separaron las yemas de 2 huevos por réplica, para luego almacenar a -20°C hasta la realización de los análisis de estabilidad oxidativa después de realizar el respectivo proceso de liofilización de las muestras.

Tabla 3-1: Composición dieta basal (Formulación realizada en Solver – Excel®)

Ingrediente	Inclusión (%)
Maíz	53,06
Harina de arroz	6
Torta soya – 49%	21
Soya extruida	5
Harina pescado	1
Aceite de pescado o palma	2
Carbonato de Ca	9
Fosfato tricálcico	1,61
Sal	0,3
Bicarbonato de sodio	0,5
DL – Metionina	0,16
Cloruro colina – 60%	0,07
Premezcla minerales y vitaminas	0,3
Análisis estimado	
EMAn (Mcal/kg)	2.8
PC (%)	19
EE (%)	6.3
Ca (%)	4.2

3.2.4 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico – TBARs en la yema de huevo

El malonaldehído (MDA) es un producto secundario de la degradación lipídica y es usado como indicador del grado oxidativo de muestras biológicas, la cuantificación se fundamenta en la reacción con ácido tiobarbitúrico. Para la realización de este procedimiento, se siguió el protocolo para la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) adaptado por el laboratorio de nutrición animal del Centro de Biotecnología y Bioindustria – CBB de Corpoica, en este procedimiento se tomó 1 g., de yema liofilizada en tubos falcon de 50 ml, se realizó la homogenización con 9 ml de una solución TCA (ácido tricloro acético) al 5% y 5 ml de solución BHT al 0.8%, se llevó a centrifuga por 5 minutos a 3000 RPM, luego se realizó el descarte de la fase hexano, de la muestra restante, en un tubo de ensayo se tomó una alícuota de 2.5 ml de la fase acuosa y se le adicionó 1.5 ml de TBA 0.8%, se llevó a vórtex por 10 segundos y luego se realizó la incubación por 30 min., a 70°C. Finalmente se realizó un baño con agua de la llave para detener la reacción química, las muestras se agitaron en vórtex para posterior lectura a una longitud de onda de 532 nm (Lector de microplatos Sinergy HT).

3.2.5 Determinación del extracto etéreo (EE – %) en yema de huevo

La determinación del extracto etéreo se realizó en el digestor de ácidos grasos Foss (Foss Soxtec™ 2050), siguiendo el protocolo adaptado por el laboratorio de nutrición animal del Centro de Biotecnología y Bioindustria – CBB de Corpoica. Se realizó el pesaje de 1 g., de yema liofilizada en papel absorbente, esta fue ubicada en los dedales del equipo y en los vasos se colocaron 40 ml de éter etílico, los dedales y los vasos se colocaron por una hora y media en el digestor, al finalizar el tiempo se realizó la recuperación del éter y los vasos con la muestra fueron colocados en desecador hasta que se alcanzó la temperatura ambiente, finalmente la determinación del extracto etéreo se obtuvo por pesaje y aplicación de la fórmula:

$$EE(\%) = \frac{\text{Peso grasa extraída}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

3.2.6 Determinación del perfil lipídico en yema de huevo

Después de realizar la extracción del EE se obtuvo el perfil lipídico de las yemas de huevo siguiendo el protocolo adaptado para la derivatización de ácidos grasos de cadena larga adaptado por el laboratorio de nutrición animal del Centro de Biotecnología y Bioindustria – CBB de Corpoica. En este procedimiento se tomaron 50 mg de grasa seca, se le adicionaron 0.5 ml de una solución 1N KOH en metanol con agitación vigorosa, luego se adicionaron 0.7 ml de xileno, se llevó a agitación y posterior reposos para obtener la separación en dos fases. De la fase oleosa se tomó una muestra para inyectar directamente al cromatógrafo (Perkin Elmen Auto System XL). Finalmente se realizó el siguiente cálculo:

$$[FAME] = \text{Lectura equipo} \left(\frac{\text{Área}}{A} \right) - B$$

$$\%[FAME] = \frac{[FAME] * \text{Volumen final} * \text{factor de dilución}}{\text{Peso del EE} * 10.000}$$

[FAME], corresponde a la concentración de metil ester correspondiente en µg/ml

A es la pendiente de la curva de calibración

B es el intercepto de la curva de calibración

3.2.7 Análisis estadístico

Experimento 1: En este ensayo se evaluó el efecto del tipo de aceite usado en la dieta (palma o pescado) y la inclusión de AEO en la dieta sobre la variación en el perfil lipídico de los huevos y la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento. En este caso se usó un diseño completo al azar con arreglo factorial 2*2 con arreglo de medidas repetidas en el tiempo, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \rho_j + \theta_k + (\tau_i * \rho_j) + (\tau_i * \theta_k) + (\rho_j * \theta_k) + (\tau_i * \rho_j * \theta_k) + o_{ij} + e_{ij}$$

y_{ij} = Perfil lipídico o MDA en la yema de huevo (ng/g de yema)

μ = media general

τ_i = efecto del tipo de aceite en la dieta (palma o pescado)

ρ_j = efecto de la inclusión de AEO (Sin AEO o 100 g/Ton de AEO)

$\theta_k = \text{efecto del tiempo de almacenamiento (0, 30 y 60 días)}$

$(\tau_i * \rho_j); (\tau_i * \theta_k); (\rho_j * \theta_k); (\tau_i * \rho_j * \theta_k) = \text{efecto de las interacciones}$

$o_{ij} = \text{error aleatorio entre aves (réplicas)}$

$e_{ij} = \text{error aleatorio dentro de aves (medida repetida)}$

Experimento 2: El efecto de los tratamientos sobre la estabilidad oxidativa de los huevos frescos se evaluó mediante un diseño completo al azar, de acuerdo al siguiente modelo:

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

$y_{ij} = \text{concentración de MDA en la yema de huevo (ng/g de yema)}$

$\mu = \text{media general}$

$\tau_i = \text{efecto del tratamiento}$

$e_{ij} = \text{error experimental}$

Para las yemas frescas la comparación de medias se realizó por medio de contrastes ortogonales con el objetivo de determinar el efecto del tipo de aceite incluido en la dieta o el nivel de antioxidante suplementado. Los contrastes evaluados fueron:

1. Palma vs Pescado
2. Palma vs Palma100
3. Pescado Sin vs. Pescado con antioxidante
4. Pescado Vitamina E vs AEO
5. Tendencia lineal por inclusión del AEO

La evaluación de la estabilidad oxidativa en el tiempo por efecto de los tratamientos se realizó mediante un diseño completo al azar con arreglo factorial 6*2 y ajuste de medidas repetidas en el tiempo, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \rho_j + \theta_k + (\tau_i * \rho_j) + (\tau_i * \theta_k) + (\rho_j * \theta_k) + (\tau_i * \rho_j * \theta_k) + o_{ij} + e_{ij}$$

$y_{ij} = \text{MDA en la yema de huevo (ng/g de yema)}$

$\mu = \text{media general}$

$\tau_i = \text{efecto del tratamiento}$

$\rho_j = \text{efecto de la temperatura de almacenamiento (4°C y - 10°C)}$

$\theta_k = \text{efecto del tiempo de almacenamiento (15, 30 y 60 días)}$

$(\tau_i * \rho_j); (\tau_i * \theta_k); (\rho_j * \theta_k); (\tau_i * \rho_j * \theta_k) = \text{efecto de las interacciones}$

$o_{ij} = \text{error aleatorio entre aves (réplicas)}$

$e_{ij} = \text{error aleatorio dentro de aves (medida repetida)}$

Para la ejecución de los diseños con ajuste de medidas repetidas en el tiempo en los dos experimentos, la selección de la estructura varianza/covarianza que mejor se ajustó a los datos (Para medidas con espaciamiento igual, caso del experimento 1, se probaron las estructuras Autoregresiva de primer orden – AR (1), Autoregresiva de primer orden heterogéneo – ARH (1), Toeplitz – TOEP, Toeplitz heterogéneo – TOEPH; en el experimento 2 con medidas igualmente espaciadas se evaluaron las estructuras Simetría compuesta – CS, Simetría compuesta heterogénea – CSH, ANTE(1), Sin estructura – UN) y la definición de los factores significativos del modelo, se utilizó el algoritmo de máxima verosimilitud restringida (REML). La comparación de medias se realizó por la prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$). Los análisis estadísticos de los dos experimentos se realizaron con el procedimiento GLIMMIX del paquete estadístico SAS (SAS versión 9.2, Cary, NC, USA, 2008).

3.3 Resultados y discusión

Experimento 1: Los resultados para el efecto del tipo de aceite (palma o pescado), la suplementación con AEO y el tiempo de almacenamiento sobre la estabilidad oxidativa y el perfil de AG de la yema de huevo se encuentran resumidos en la tabla 3–2. El efecto de las interacciones entre factores principales sobre la concentración de MDA y el contenido de ácidos grasos en la yema de huevo no fue significativo. El EE, AGS y la relación Insaturados/Saturados (I/S) no fue diferente ($P > 0.05$) entre dietas con aceite de palma o pescado, mientras que, para el contenido de AGMI, AGPI, DHA y la estabilidad oxidativa evaluada por la concentración de MDA en la yema de huevo, fue diferente ($P < 0.05$). El contenido de AGMI fue mayor (49.4%) en las dietas con 2% de aceite de palma respecto a las dietas con aceite de pescado (47.3%), mientras que el contenido de DHA y AGPI fue menor para los tratamientos con palma (0% y 14.5%, respectivamente) en comparación con las dietas con pescado (1.4% y 16.8%, respectivamente). El mayor contenido de AGPI favoreció el contenido de MDA en el huevo, siendo mayor la

concentración en las dietas con aceite de pescado (41.6 ng MDA/g de yema) respecto a palma (32.6 ng MDA/g de yema), resultados similares fueron reportados por Castillo-Badillo y col (2005), quienes no encontraron diferencias en la cantidad total de lípidos en el huevo en dietas con 1% (32%) ó 2% (31.8%) de aceite de atún, comparado con la dieta control con aceite de cártamo (31.6%), pero con modificaciones en la concentración de ácidos grasos en el perfil lipídico del huevo, con aumentos significativos en las concentraciones de EPA y DHA. En el trabajo de Orhan y Eren (2011) se presentaron diferencias significativas para AGS y AGPI, con una mayor concentración de AGS (37.5%) en la dieta control (32.2%), resultado que difiere del obtenido en el presente trabajo, donde no se encontraron diferencias para AGS en el huevo entre dietas con 2% de aceite de palma o pescado, mientras que, concuerdan en el resultado obtenido para AGPI y DHA, con una mayor concentración en los AG poliinsaturados de cadena larga y DHA en el perfil de AG de los huevos de aves alimentadas con dietas que tenían aceite de pescado en su elaboración. Por efecto de la suplementación de AEO, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos para EE y la concentración de MDA en la yema, esta última variable mostró un menor contenido para las dietas con suplementación de 100 g/Ton de AEO (31.1 ng MDA/g de yema) comparadas con las dietas sin adición de AEO (34.1 ng MDA/g de yema), resultado que es correspondiente con el mayor contenido de EE encontrado en las dietas con AEO (53.3%) respecto a las dietas sin AEO (52.4%), mostrando que la inclusión del AEO mejoro la estabilidad oxidativa de la matriz lipídica de los huevos en almacenamiento; para estabilidad oxidativa, los resultados concuerdan con los reportes de Florou-Paneri y col (2005a), quienes encontraron diferencias significativas entre tratamientos para el grado de oxidación lipídica medida por la formación de MDA en la yema, donde el uso de aceite esencial de orégano a razón de 100 g/Ton (25 ng MDA/g de yema) mostró un valor más bajo de MDA en la yema respecto al uso de 50 g/Ton (35 ng MDA/g de yema) y el grupo control sin uso de antioxidantes (41 ng MDA/g de yema); Orhan y Eren (2011) concluyeron que el uso de una mezcla de material vegetal seco y aceites esenciales de plantas como tomillo, orégano, ajo, anís e hinojo, mejoró la estabilidad oxidativa en almacenamiento, al reducir la concentración de MDA en la yema de huevo (0.24 mg/Kg de yema vs 0.31 mg/Kg de yema); Radwan y col (2008) reportaron resultados similares, ellos sugirieron una reducción significativa en los valores de MDA en los huevos de gallinas con dietas que incluían un 1% de orégano o romero o 0.5% a 1% de cúrcuma respecto al grupo control

(2.3 mg/100g de yema vs 2.8 mg/100g de yema, respectivamente), mientras que difiere en cuanto al resultado de EE, ya que, los resultados de este grupo muestran que no se presentó una variación significativa en los lípidos totales de la yema de huevo en los tratamientos con inclusión de 0.5% o 1% de AEO. El efecto del tiempo de almacenamiento no mostró efectos significativos sobre el EE y el perfil de ácidos grasos de los huevos, mientras que la concentración de MDA mostró diferencias ($P < 0.05$), con incrementos en la concentración de MDA en la yema de huevo a mayor tiempo de almacenamiento, siendo más baja en los huevos frescos (28.3 ng MDA/g de yema), en comparación con 30 y 60 días (31.4 y 38 ng MDA/g de yema, respectivamente), este resultado difiere de lo reportado por otros autores quienes no encontraron diferencias en la concentración de MDA en la yema de huevos refrigerados hasta por 60 días de almacenamiento (Radwan y col., 2008; Botsoglou y col., 2005; Florou-Paneri y col., 2005a).

Tabla 3-2: Efecto del tipo de aceite en dietas de ponedoras y la inclusión de AEO (*Lippia origanoides* Kunth) sobre la estabilidad oxidativa y el contenido de ácidos grasos de huevos en almacenamiento

	Efecto	EE	AGS	AGMI	AGPI	I/S	DHA	MDA
Aceite	Palma	53.0	32.8	49.4a	14.5b	1.9	0b	23.6b
	Pescado	52.6	31.9	47.3b	16.8a	2.0	1.4a	41.6a
	Valor-P	0.2991	0.1354	<0.0001	<0.0001	0.2122	<0.0001	<0.0001
Aditivo	0	52.4b	32.1	48.6	15.6	2.0	0.7	34.1a
	100	53.3a	32.6	48.1	15.7	1.9	0.7	31.1b
	Valor-P	0.0480	0.3914	0.1077	0.8278	0.3142	0.2065	0.0021
Día	0	52.7	31.6	48.6	15.9	2.04	0.7	28.3c
	30	53.2	32.8	48.2	15.3	1.9	0.6	31.4b
	60	52.5	32.5	48.3	15.7	1.9	0.7	38a
	Valor-P	0.4915	0.2721	0.6379	0.2678	0.2826	0.4749	<0.0001
Interacciones factores principales								
	Aceite*Aditivo	0.6319	0.9325	0.1301	0.4629	0.8256	0.2065	0.0563
	Aceite*Día	0.1727	0.3710	0.8504	0.4447	0.4097	0.4749	0.9066
	Aditivo*Día	0.1176	0.4243	0.2108	0.5991	0.5479	0.3564	0.5919
	Aceite*Aditivo*Día	0.1717	0.9263	0.5867	0.8061	0.8420	0.3564	0.3090

EE: Extracto etéreo (%), AGS: Ácidos grasos saturados (%), AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados (%), AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados (%), I/S: Relación insaturados/saturados, DHA: Ácido docosahexaenico (%), MDA: Malonaldehído (ng/g de yema).

Experimento 2: En la Tabla 3–3 se resumen los resultados obtenidos sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos. La concentración de MDA en las yemas de huevo fue significativamente diferente por efecto del tipo de aceite usado en la dieta, siendo mayor en los huevos provenientes de ponedoras alimentadas con dietas con aceite de pescado (36.1 ng MDA/g de yema) en comparación con las dietas elaboradas con aceite de palma (19.4 ng MDA/g de yema) (Figura 3–1). Dentro de las dietas formuladas con aceite de pescado, la oxidación en la yema de huevos frescos fue menor ($P < 0.05$) cuando se usó algún tipo de antioxidante en la dieta respecto al tratamiento sin inclusión del aditivo (34.7 vs 41.6 ng MDA/g de yema, respectivamente) (Figura 3–2), mientras que el tratamiento con vitamina E (37.4 ng MDA/g de yema) presentó un promedio numéricamente mayor ($P < 0.1$) respecto a las dietas que incluían AEO como antioxidante (33.8 ng MDA/g de yema) (Figura 3–3).

Tabla 3-3: Efecto de la inclusión del AEO (*Lippia origanoides* Kunth) en dietas con aceite de pescado sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos

Tratamiento ¹	MDA
CONTP	19.4
CONT	41.6
VITE	37.4
O100	36.6
O150	35.8
O200	29
ESM ²	2
Valor-P	<0.0001
Contrastes	Pr>t
Palma vs Pescado	<0.0001
Pescado Sin vs Pescado Antioxidante	0.0005
Pescado Vitamina E vs AEO	0.0588
Pescado AEO lineal	<0.0001
Pescado AEO cuadrático	0.5579

¹ CONTP: Dieta basal con 2% aceite palma, CONT: Dieta basal con 2% aceite pescado, VITE: Pescado con 200 g/Ton de vitamina E, O100: Pescado con 100 g/Ton AEO, O150: Pescado con 150 g/Ton AEO, O200: Pescado con 200 g/Ton AEO.

² Error estándar de la media.

Figura 3-1: Estabilidad oxidativa de huevos frescos por efecto del tipo de aceite en la dieta (Palma vs Pescado, $P < 0.0001$).

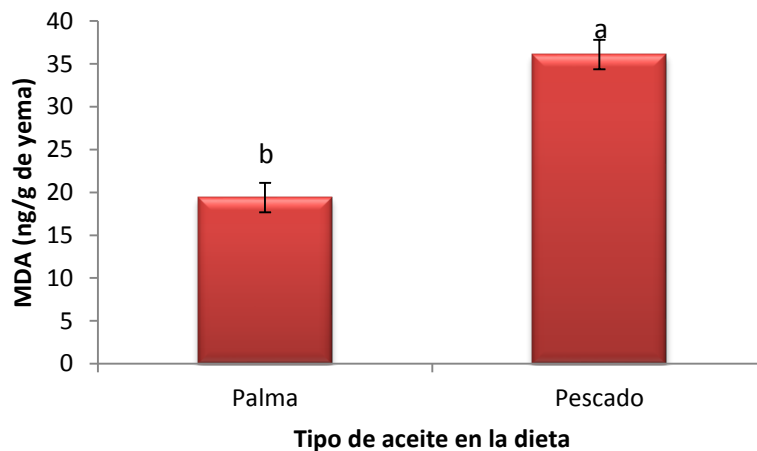


Figura 3-2: Estabilidad oxidativa de huevos frescos por efecto de la inclusión de antioxidantes en la dieta (Sin Antioxidante vs Antioxidante, $P = 0.0005$).

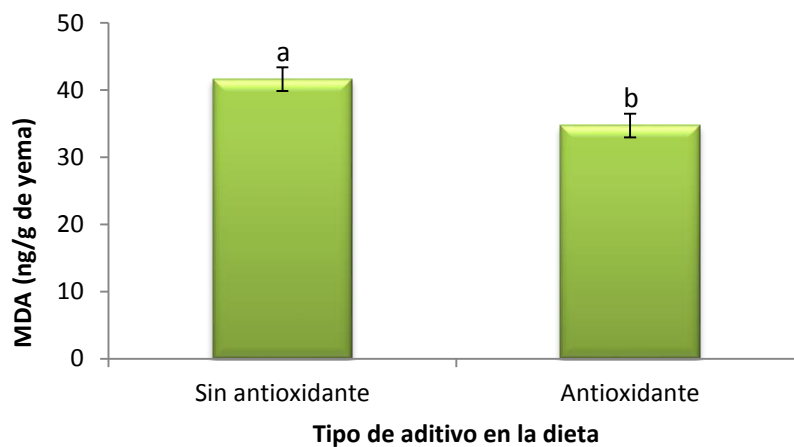
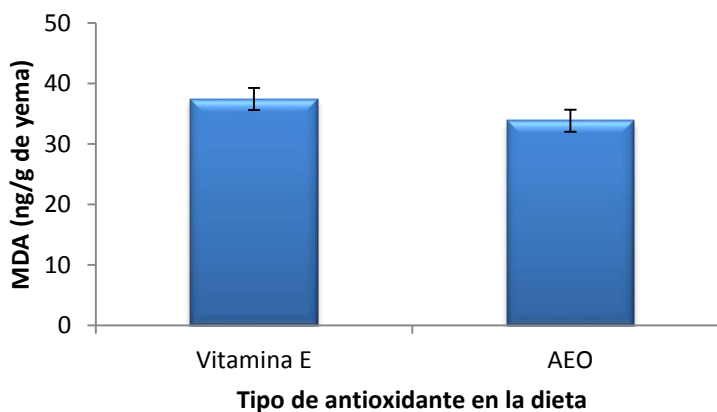


Figura 3-3: Estabilidad oxidativa de huevos frescos por efecto del tipo de antioxidante incluido en la dieta (Vitamina E vs AEO, $P = 0.0588$).



En las yemas de huevos frescos se presentó una respuesta lineal ($P < 0.05$) en la concentración de MDA por efecto de la inclusión de AEO en la dieta, dicha relación fue inversamente proporcional con una reducción de 0.06 ng de MDA en la yema por cada unidad porcentual de AEO incluida en la dieta (Figura 3–4), el valor de oxidación más bajo se presentó con la inclusión de 200 g/Ton de AEO en la dieta (29 ng MDA/g de yema). Estos resultados concuerdan con los trabajos de Radwan y col (2008), Florou-Paneri y col (2005a) y Botsoglou y col (2005) quienes reportaron una mayor estabilidad oxidativa de huevos provenientes de gallinas alimentadas con dietas que incluían vitamina E o algún tipo de aceite esencial o material vegetal de romero, orégano, tomillo, curcuma o sus combinaciones, mientras que los trabajos de Orhan y Eren (2011) y Galobart y col (2001) no encontraron diferencias en el contenido de MDA en la yema de huevos frescos entre dietas con inclusiones de vitamina E o romero en comparación con el grupo control. Los resultados de estos mismos autores para la comparación entre el uso de vitamina E o AEO mostraron una mayor estabilidad oxidativa de los huevos con la inclusión de tocoferol (vitamina E), resultados que son diferentes a los valores obtenidos en el presente trabajo, donde la inclusión de AEO en la dieta, redujo significativamente la concentración de MDA en la yema, respecto al tratamiento con vitamina E como antioxidante, mientras que, por efecto de la dosis de AEO usada en los tratamientos Radwan y col., (2008) reportaron una reducción en la concentración de MDA en yema de huevo con la suplementación de 1% de AEO en la dieta, resultados similares fueron obtenidos por Florou-Paneri y col (2005a) y concuerdan con los resultados obtenidos para la concentración de MDA en yema del presente trabajo, donde se observó una reducción en la concentración de MDA con el aumento de la dosis de AEO hasta 200 g/Ton de alimento.

Los resultados del efecto de la inclusión de AEO en dietas de ponedoras marrón sobre la estabilidad oxidativa de huevos almacenados por 60 días a dos temperaturas se encuentran resumidos en la tabla 3–4. La concentración de MDA no fue diferente ($P > 0.05$) por efecto de la interacción entre tratamientos, temperatura y tiempo de almacenamiento. Las interacciones Tratamiento*Temperatura y Tratamiento*Día mostraron diferencias significativas sobre el contenido de MDA en la yema de huevo.

Figura 3-4: Efecto de la inclusión de AEO (*Lippia origanoides* Kunth) sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos ($Y = -0.06X + 42.2$; $R^2 = 0.8979$; $P < 0.0001$. X = nivel de inclusión de AEO)

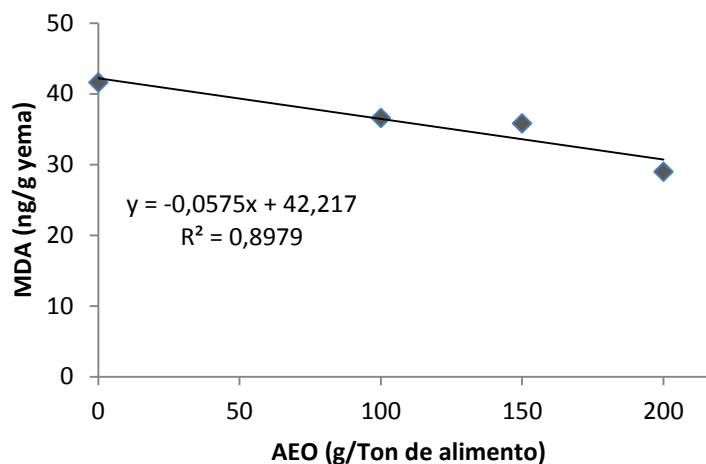


Tabla 3-4: Efecto de la inclusión del AEO (*Lippia origanoides* Kunth) en dietas con aceite de pescado sobre la estabilidad oxidativa de huevos almacenados a 4 y -10°C

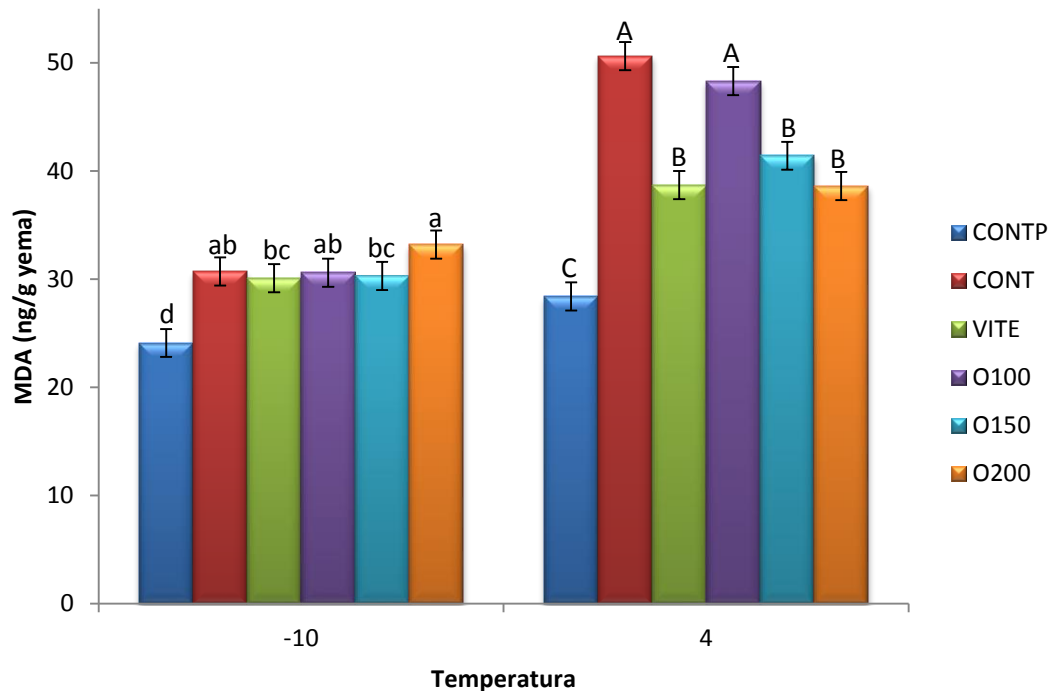
Factor de clasificación		MDA ¹
Tratamiento	CONTP	26.2
	CONT	40.6
	VITE	34.4
	O100	39.5
	O150	35.8
	O200	34.4
	ESM ²	0.8362
	Valor-P	<0.0001
Temperatura (°C)	4	40.9
	-10	29.8
	ESM	0.5173
	Valor-P	<0.0001
Tiempo (Días)	15	34.8
	30	34.5
	60	36.9
	ESM	0.6446
	Valor-P	0.0111
Interacciones	Tratamiento*Temperatura	<0.0001
	Tratamiento*Día	0.0868
	Temperatura*Día	<0.0001

^{1.} Malonaldehído expresado como ng/g de yema de huevo. ² Error estándar de la media.

CONTP: Dieta basal con 2% aceite palma, CONT: Dieta basal con 2% aceite pescado, VITE: Pescado con 200 g/Ton de vitamina E, O100: Pescado con 100 g/Ton AEO, O150: Pescado con 150 g/Ton AEO, O200: Pescado con 200 g/Ton AEO.

La figura 3–5, muestra el comportamiento de la estabilidad oxidativa de huevos almacenados por efecto de la interacción entre el tratamiento y la temperatura de almacenamiento, mientras que la tabla 3–5 muestra las comparaciones entre tratamientos dentro de cada temperatura de almacenamiento. Los huevos almacenados a -10°C mostraron una menor concentración de MDA en comparación con los huevos almacenados a 4°C , excepto para el tratamiento con aceite de palma que presentó un valor similar a los valores obtenidos en los huevos almacenados a la temperatura más baja. A -10°C , la menor concentración de MDA se observó en el tratamiento con aceite de palma (CONTP) con 24.1 ng de MDA/g de yema, cuyo valor fue menor ($P<0.05$) en 6.5, 6.4, 6.2, 9.1 y 6.0 ng de MDA/g de yema respecto a los tratamientos con aceite de pescado (CONT), vitamina E (VITE), 100 g/Ton (O100), 150 g/Ton (O150) y 200 g/Ton (O200) de AEO, respectivamente, el tratamiento con vitamina E presentó 3.1 ng/g menos de MDA respecto a la dieta suplementada con 200 g/Ton de AEO, este último grupo tuvo 2.9 ng/g más de MDA en comparación con los tratamientos con 150 g/Ton de AEO, mientras que la estabilidad oxidativa no fue diferente ($P>0.05$) entre los niveles 100, 150 g/Ton de AEO y vitamina E. A 4°C el tratamiento con aceite de palma (CONTP) presentó la mayor estabilidad oxidativa durante el almacenamiento (28.4 ng MDA/g de yema), con valores de MDA menores ($P<0.05$) respecto a los tratamientos con aceite de pescado sin antioxidante (CONT) y con suplementación de cualquier tipo de antioxidante (Vitamina E y AEO en las dosis de 100, 150 y 200 g/Ton) en 22.2, 10.3, 19.9, 12.9 y 10.2 ng MDA/g de yema, respectivamente. En los tratamientos con aceite de pescado, el uso de vitamina E y orégano en niveles de 150 y 200 g/Ton (38.7, 41.4 y 38,6 ng MDA/g de yema, respectivamente) no se encontraron diferencias significativas para el contenido de MDA en la yema, estos mostraron una mayor ($P<0.05$) estabilidad oxidativa en comparación con los tratamientos de pescado sin antioxidantes y pescado con 100 g/Ton de AEO (50.6 y 48.3 ng MDA/g de yema, respectivamente). La estabilidad oxidativa fue mayor ($P<0.05$) en los tratamientos con vitamina E y AEO en inclusiones de 150 y 200 g/Ton en comparación con el grupo control en 11.9, 9.2 y 12 ng de MDA/g, respectivamente.

Figura 3-5: Efecto de la interacción Tratamiento*Temperatura sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos (Efecto separado por temperatura, $P < 0.0001$; Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre medias a -10°C y letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre medias a 4°C).



En el análisis de la interacción temperatura*tiempo de almacenamiento sobre la estabilidad oxidativa se muestra en la figura 3–6, mientras que las comparaciones en el tiempo dentro de cada temperatura se resumen en la tabla 3–6. A -10°C , se encontraron diferencias significativas para la concentración de MDA a los 15 días de almacenamiento en comparación con 30 y 60 días (31.8 vs 28.7 y 29 ng MDA/g, respectivamente), mientras que a 4°C , se observó un incremento en la cantidad de MDA en la yema de huevo con el tiempo de almacenamiento, siendo diferente ($P < 0.05$) entre los tiempos 15, 30 y 60 días de almacenamiento (37.8, 40.2 y 45 ng MDA/g de yema, respectivamente).

Tabla 3-5: Comparación entre tratamientos de la estabilidad oxidativa de huevos en almacenamiento por efecto de la interacción Tratamiento*Temperatura (efecto separado por temperatura; $P < 0.0001$).

Temperatura	Tratamiento	Estimador	ESM ¹	Pr>t	
-10	CONTP	CONT	-6.5	1.43	<0.0001
-10	CONTP	VITE	-6.0	1.43	0.0002
-10	CONTP	O100	-6.4	1.43	<0.0001
-10	CONTP	O150	-6.2	1.43	0.0002
-10	CONTP	O200	-9.1	1.43	<0.0001
-10	CONT	VITE	0.6	1.43	0.6997
-10	CONT	O100	0.1	1.43	0.9471
-10	CONT	O150	0.4	1.43	0.7943
-10	CONT	O200	-2.6	1.43	0.0840
-10	O100	VITE	0.5	1.43	0.7493
-10	O100	O150	0.3	1.43	0.8458
-10	O100	O200	-2.6	1.43	0.0736
-10	O150	VITE	0.2	1.43	0.9003
-10	O200	VITE	3.1	1.43	0.0375
-10	O150	O200	-2.9	1.43	0.0492
4	CONTP	CONT	-22.2	1.43	<0.0001
4	CONTP	VITE	-10.3	1.43	<0.0001
4	CONTP	O100	-19.9	1.43	<0.0001
4	CONTP	O150	-12.9	1.43	<0.0001
4	CONTP	O200	-10.2	1.43	<0.0001
4	CONT	VITE	11.9	1.43	<0.0001
4	CONT	O100	2.2	1.43	0.2738
4	CONT	O150	9.2	1.43	<0.0001
4	CONT	O200	12.0	1.43	<0.0001
4	O100	VITE	9.6	1.43	<0.0001
4	O100	O150	6.9	1.43	0.0017
4	O100	O200	9.7	1.43	<0.0001
4	O150	VITE	2.6	1.43	0.1915
4	O200	VITE	-0.1	1.43	0.9590
4	O150	O200	2.8	1.43	0.1753

¹ Error estándar de la media. CONTP: Dieta basal con 2% aceite palma, CONT: Dieta basal con 2% aceite pescado, VITE: Pescado con 200 g/Ton de vitamina E, O100: Pescado con 100 g/Ton AEO, O150: Pescado con 150 g/Ton AEO, O200: Pescado con 200 g/Ton AEO.

Figura 3-6: Efecto de la interacción Temperatura*Día sobre la estabilidad oxidativa de huevos frescos (efecto separado por temperatura, $P < 0.0001$; Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre medias a -10°C y letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre medias a 4°C).

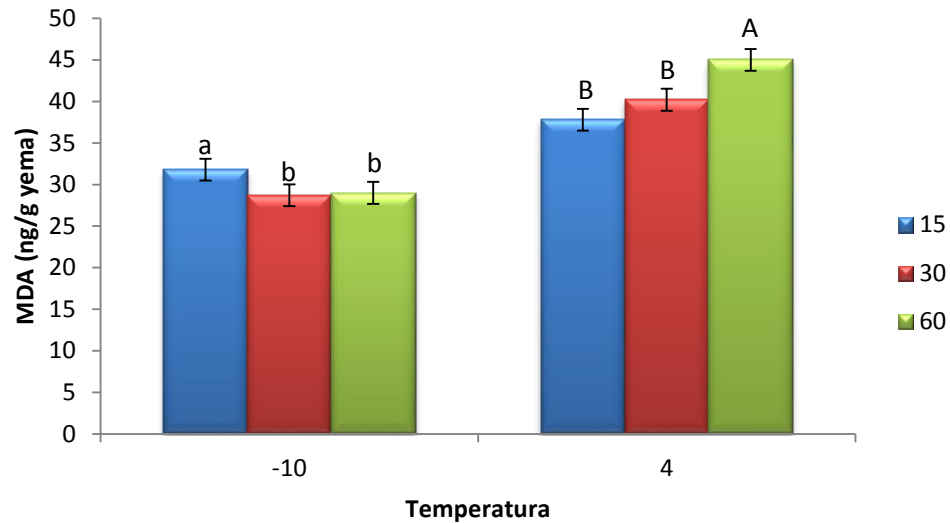


Tabla 3-6: Comparación de la estabilidad oxidativa de huevos en almacenamiento por efecto de la interacción Temperatura*Tiempo (efecto separado por temperatura; $P < 0.0001$).

Temperatura	Día	Estimador	Pr>t	
-10	15	30	3.2	0.0145
-10	15	60	2.8	0.0306
-10	30	60	-0.3	0.6999
4	15	30	-2.5	0.1080
4	15	60	-7.2	<0.0001
4	30	60	-4.7	0.0030

Por efecto de la temperatura, no se encontraron trabajos en los que se consideraran evaluaciones de la estabilidad oxidativa de huevos almacenados a temperaturas inferiores a los 0°C , la cual fue evaluada en este experimento, pensando en las posibles condiciones de almacenamiento en las que se mantendrían principalmente los huevos rotos, sin embargo a -10°C , el comportamiento en la concentración de MDA en la yema de huevo por efecto del tratamiento, mantuvo un comportamiento similar al reportado en el experimento 1, en el que, huevos de aves alimentadas con una dieta elaborada con un aceite con bajo contenido de AGPI presento un menor contenido de MDA, mientras que la adición de los antioxidantes a dietas con aceite de pescado como fuente de AGPI, permitieron a los huevos mantener un nivel de MDA similar a la dieta control. Por efecto

del almacenamiento, a 4°C se observó un incremento en la cantidad de MDA en la yema de huevo, resultado que sería contrastante con los reportes de Radwan y col (2008), Florou-Paneri y col (2005a) y Botsoglou y col (2005), quienes no encontraron diferencias significativas por efecto del almacenamiento hasta por 60 días, estas diferencias pueden ser resultado de las dietas empleadas, ya que en los estudios mencionados no se realizó la inclusión en la dieta de materias primas ricas en AGPI, se trabajaron dietas comerciales maíz-soya, aspecto que pudo favorecer la estabilidad oxidativa en almacenamiento en los huevos al tener una menor posibilidad de presentar altas concentraciones de AGPI en la yema. En cuanto al efecto de los tratamientos, estos resultados concuerdan con los reportes de Radwan y col (2008), Florou-Paneri y col (2005a) y Botsoglou y col (2005), quienes reportaron diferencias significativas por efecto de los tratamientos empleados en sus trabajos, donde los huevos de aves alimentadas con dietas sin inclusión de aditivos antioxidantes presentaron una menor estabilidad oxidativa, con una mayor eficiencia de protección a la oxidación de la matriz lipídica en las dietas con inclusiones de Vitamina E (α -tocoferol) hasta niveles de 200 g/Ton de alimento, respecto a los tratamientos con uso de hierbas secas o aceites esenciales de romero, tomillo, cúrcuma (Botsoglou y col., 2005) y orégano (Radwan y col., 2008; Florou-Paneri y col., 2005a; Botsoglou y col., 2005), este último resultado difiere de los resultados obtenidos en este trabajo para huevos almacenados a 4°C, donde los niveles de 150 y 200 g/Ton de AEO (*Lippia origanoides* Kunth), mostraron una capacidad antioxidante similar a la vitamina E en niveles de 200 g/Ton. En cuanto al efecto del AEO en diferentes dosis Radwan y col (2008) sugirieron una mayor efectividad del AEO en niveles de 1% en la dieta comparado con 0.5% de inclusión, resultado similar al expuesto por Florou-Paneri y col (2005) quienes encontraron una menor concentración de MDA en los tratamientos con 100 g/Ton en comparación con una dosis de 50 g/Ton de alimento, estos resultados estarían de acuerdo con los datos observados en este trabajo, donde se observó una dependencia de la concentración de MDA, en función de la dosis de AEO empleada, mostrando una reducción en la oxidación lipídica de la yema con los niveles más altos de AEO. Las diferencias en los resultados entre vitamina E y AEO de los estudios mencionados y el presente trabajo pueden ser atribuidos principalmente a la especie de orégano usada para la obtención del AEO, ya que, el aceite esencial usado en los estudios anteriores proviene del orégano griego (*Origanum vulgare* Hirtum), caracterizado por presentar una mayor proporción de carvacrol respecto a timol, mientras

que el orégano *Lippia origanoides* Kunth aquí empleado presenta una composición con el timol como compuesto predominante (Ariza y col., 2011), que presenta un mayor potencial antioxidante, ya que presenta un mayor impedimento estérico producto de la ubicación del grupo fenólico respecto a su isómero carvacrol (Yanishlieva y col., 1999).

3.4 Conclusiones

El perfil de AG se modificó por la inclusión de 2% de aceite de pescado en la dieta de ponedoras como fuente de AGPI, aumentando en 1.4% y 15.5% el contenido de DHA y AGPI, respectivamente, este aumento favoreció el aumento en la concentración de MDA en el huevo, con incrementos del 27,6% en la yema de huevos de gallinas alimentadas con dietas que incluían aceite de pescado como fuente de enriquecimiento. El uso de AEO no generó modificaciones en el perfil de AG de la yema, aspecto que mostraría el efecto potencial de este extracto vegetal como alternativa antioxidante, ya que se redujo la oxidación de la matriz lipídica sin afectar en forma negativa el contenido de AGPI presentes en la yema.

La concentración de MDA en la yema de huevo mostró un comportamiento dependiente de la cantidad de AEO incluido en la dieta, alcanzando una reducción hasta de un 20.7% con inclusiones de 200 g/Ton de alimento, por tanto, la inclusión de AEO puede favorecer la estabilidad oxidativa de los huevos frescos y almacenados hasta por 60 días. Los resultados del efecto del AEO en niveles entre 150 y 200 g/Ton sobre la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con AGPI fueron similares a los resultados obtenidos con vitamina E (200 g/Ton).

La concentración de MDA en la yema de huevo aumentó con el tiempo de almacenamiento hasta los 60 días, sin embargo, es necesario resaltar que la inclusión de AEO en las dosis empleadas en este trabajo ocasionó una reducción del proceso de oxidación de la matriz lipídica de huevos enriquecidos mediante el uso de aceite de pescado como fuente de enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados en la dieta de las ponedoras marrón.

El almacenamiento a -10°C mantuvo la estabilidad oxidativa de los huevos hasta por 60 días, este efecto puede ser favorecido por el uso de AEO en la dieta de ponedoras, ya que el efecto antioxidante de este extracto puede favorecer tiempos de almacenamiento de mayor duración, aspecto que cobraría gran importancia en la conservación de huevos rotos destinados principalmente a procesos de panadería.

El uso de aceites de pescado en las dietas de ponedoras se ha mostrado como una estrategia de enriquecimiento de huevos con AGPI, sin embargo, deben considerarse los niveles máximos de inclusión, en cuyo caso, se sugiere no debe ser superior al 3% de la dieta con el objetivo de evitar rechazo en el consumidor. De acuerdo a los presentes resultados, se puede considerar que la inclusión hasta del 2% de aceite de pescado en la dieta, es un nivel que favorece el enriquecimiento con AGPI sin generar efectos negativos a nivel productivo, aunque falta realizar la consideración del efecto ocasionado a nivel del consumidor, mas, si se contempla que en la formulación de la dieta también se realizó la inclusión de harina de pescado (1.5%), sobrepasando el nivel máximo sugerido de fuentes marinas incluidas en la dieta de ponedoras. En cuanto a los resultados del AEO sobre la estabilidad oxidativa y el perfil de AG de la yema de huevo, niveles de inclusión entre 100 y 200 g/Ton de alimento favorecen la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos almacenados hasta por 60 días a 4°C, mostrando la viabilidad de este extracto como una alternativa natural a otros antioxidantes sintéticos usados convencionalmente en la industria de elaboración de alimentos.

4. Efecto de la suplementación de dietas con aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth sobre la calidad y percepción sensorial por el consumidor de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)

4.1 Introducción

El concepto de seguridad alimentaria considera el acceso que toda persona debería tener a la comida, tanto en cantidad como en la calidad necesaria para suplir las necesidades nutricionales y poder tener una vida saludable y para el sector avícola es bien conocido el rol que juega el huevo en este campo, al ser la proteína de mayor valor nutricional, accesibilidad y menor costo (Fenavi, 2013). El huevo es considerado como uno de los alimentos naturales más completos por su equilibrada proporción de proteínas, carbohidratos, grasa, minerales y vitaminas (Lozano, 2012); sin embargo por su contenido de colesterol, su consumo ha sido relacionado con el riesgo de padecer enfermedades coronarias y el desarrollo de algunas formas de cáncer (Simopoulos, 2000; Hargis y van Elswysk, 1991). Aunque los efectos negativos mencionados asociados al consumo de huevo, se encuentran relacionados más a la forma de cocción, los ingredientes adicionados en la preparación (Fenavi, 2013) o el consumo excesivo de huevos por al menos 10 días consecutivos (Leeson y Zubair, 1996), la modificación del contenido nutricional, específicamente la reducción del contenido de colesterol o el enriquecimiento con nutrientes funcionales para la salud del consumidor, caso de los ácidos grasos poli insaturados (AGPI) es un tema de interés en el sector avícola . En el caso del colesterol, Leeson y Zubair (1996) mencionaron que estrategias como la reducción de la densidad energética en la dieta, mediante la reducción efectiva de la

energía de alimento o la restricción en la oferta diaria o el uso de fuentes de fibra efectiva han mostrado reducciones en la cantidad de colesterol transferido, pero con efectos negativos sobre el desempeño productivo de las aves, mientras que, la modificación significativa del perfil de ácidos grasos, particularmente ácidos grasos (AG) de las familias ω -6 y ω -3, ha sido exitosa mediante la inclusión de fuentes de AGPI, con particular interés en el ácido eicosapentaenoico – EPA y docosahexaenoico – DHA, por su efecto benéfico sobre la salud a nivel cardiovascular e inmunológicos (Castro, 2000).

Los aceites de pescado han sido considerados como uno de los ingredientes más aceptados para el enriquecimiento con AGPI, ya que contienen un alto contenido de EPA y DHA (Castillo-Badillo y col., 2005) y su efectividad sobre el aumento en la concentración de AG omega-3 en la yema de huevo, ha sido demostrada en varios estudios, en los que se sugieren niveles inferiores al 3% de la ración con el objetivo de evitar efectos negativos en el sabor y en las variables productivas de las aves (Cherian, 1996; Hargis y col., 1991). Los ingredientes vegetales como semillas o aceites de lino o colza se han empleado como estrategia de enriquecimiento con un menor efecto sobre la aceptación sensorial por parte del consumidor, sin embargo, al realizar la comparación entre el aceite de pescado y el uso de fuentes vegetales en dietas de ponedoras y su efectividad en la modificación del perfil lipídico de los huevos, las gallinas alimentadas con dietas que incluían 3% de aceite de pescado mostraron contenidos de AG en la yema diferentes al compararlo con los de aves suplementadas con aceite de lino, observándose un incremento de los ácidos DHA y EPA con el uso de pescado (Hargis y Van Elswyk, 1991). Sumado al posible efecto sobre la aceptación del consumidor, el aumento en el contenido de AGPI en la yema de huevo promueve la susceptibilidad a la oxidación lipídica, aspecto que puede determinar una mayor pérdida de la calidad sensorial, razón por la cual, los antioxidantes sintéticos o de origen natural se hacen necesarios en la industria de los alimentos enriquecidos (Yannakopoulos y col., 2005). Recientemente se ha dado mayor interés al uso de compuestos naturales, ya que los sintéticos se han relacionado con procesos cancerígenos (Hirose y col., 1986). Por sus componentes principales, carvacrol y timol, el aceite esencial de orégano (AEO) ha cobrado interés como antioxidante natural, siendo común el uso del extracto proveniente del orégano griego (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*), cuyo potencial antioxidante se ha evaluado tanto en modelos in Vitro (Dorman y Deans, 2000) como en modelos in Vivo

(Orhan y Eren., 2011; Radwan y col., 2008; Cabuk y col., 2006; Florou-Paneri y col., 2005a; Florou-Paneri y col., 2005b; Botsoglou y col., 2003; Young y col., 2003). En Colombia se encuentra una especie de orégano de monte (*Lippia origanoides* Kunth), cuya composición es característica respecto a otras variedades de orégano, ya que es predominante en timol (67.2% - 78.7%) y bajo en carvacrol (0.9% - 1.2%); el timol se caracteriza por tener un mayor impedimento estérico comparado con el compuesto carvacrol (Yanishlieva y col., 1999), razón por la cual, se considera, tiene una mayor capacidad antioxidante respecto a otros AEO. Como se mencionó, el aceite de pescado como fuente de enriquecimiento puede determinar la reducción en la calidad sensorial de los huevos, ocasionando una menor aceptación del consumidor, mientras que el efecto del AEO sobre la calidad sensorial no está documentado, por tanto, el objetivo del trabajo fue la evaluación del efecto de incluir el aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* Kunth en dietas con inclusión de aceite de pescado sobre la calidad sensorial y la aceptación del consumidor de huevos enriquecidos con AGPI.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Ubicación

El trabajo se realizó en la unidad de Avicultura del Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica, ubicado en el kilómetro 14 vía Mosquera en el occidente de la sabana del departamento de Cundinamarca, a una altitud de 2516 m.s.n.m., con una temperatura promedio entre 12 y 14°C.

4.2.2 Animales y dietas

Para evaluar las características organolépticas y la aceptación por parte del consumidor de huevos enriquecidos con AGPI mediante la inclusión aceite de pescado en la dieta y el uso de AEO (*Lippia origanoides* Kunth) como fuente antioxidante se alimentaron 216 ponedoras de la estirpe Babcock Brown de 47 semanas de edad alojadas individualmente en jaulas de postura. Las ponedoras se asignaron aleatoriamente en uno de seis tratamientos, cada uno con seis réplicas de seis ponedoras. Los tratamientos

consistieron en dietas con inclusión de 2% de aceite de palma sin suplementación (CONTP) y dietas con 2% de aceite de pescado sin suplementación (CONT), con adición de 200 g/Ton de vitamina E (VITE) y con inclusión en niveles de 100 (O100), 150 (O150) y 200 (O200) g/Ton del AEO, respectivamente. Diariamente se ofrecieron 120 g/ave de alimento en harina y 2 g/ave de carbonato de calcio grueso en el comedero; el suministro de agua durante el ensayo fue a voluntad.

4.2.3 Recolección de muestras

El suministro de las dietas experimentales a las ponedoras se realizó durante 8 semanas, al finalizar, los huevos de la última semana fueron pesados y clasificados, con el fin de seleccionar huevos con peso homogéneo (64 ± 4 g) destinados a los análisis de características organolépticas y panel sensorial, donde se evaluó la aceptación por parte del consumidor. Se recogieron 2 huevos por réplica experimental para un total de 72 huevos, de estos, se tomaron la mitad para realizar la medición de las variables físicas definidas y los huevos restantes se almacenaron a 4°C por 20 días para realizar la valoración de la aceptación en un panel de percepción sensorial.

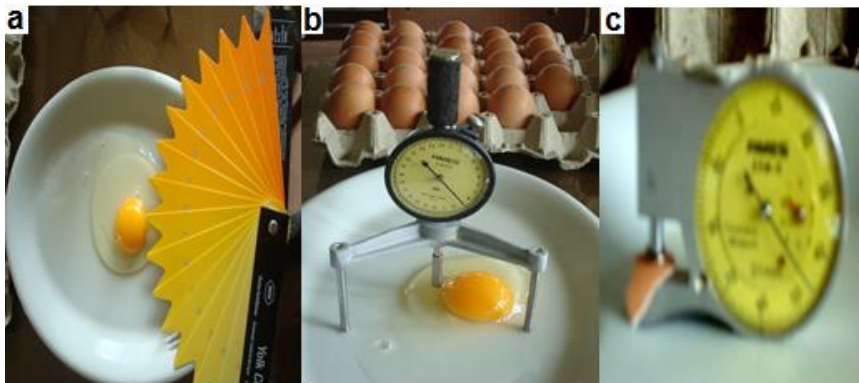
4.2.4 Determinación características organolépticas

Las características organolépticas medidas fueron el color de la yema, grosor de la cáscara, alto de la albúmina y se estimaron las unidades Haugh (UH) como medida representativa del grado de frescura del huevo. El color de la yema se determinó con la escala colorimétrica de Roche (Figura 4–1a), el alto de la albúmina se midió a un centímetro de la yema con un micrómetro de trípode Baxlo (Figura 4–1b) y el grosor de la cáscara se tomó en un fragmento de cascara, con ayuda de un micrómetro de mano (Figura 4–1c). Para este procedimiento se rompió el huevo, se colocó en una superficie plana, se registró el valor de color de la yema, alto de la albúmina y el grosor de la cascara. Las unidades haugh (Hu) se calcularon con la fórmula propuesta por Brant y col., 1951 (Carraro y Antunes, 2001):

$$UH = 100 \log \left[H - \frac{\sqrt{G(30W^{0.37} - 100)}}{100} + 1.9 \right]$$

H es la altura de la albumina en milímetros; G es la constante gravitacional de valor 32 y W es el peso del huevo en gramos. El resultado se expresó en una escala numérica donde el valor más alto es 100 para un huevo superior y 20 es el valor más bajo que corresponde a un huevo de calidad inferior.

Figura 4-1: Características evaluadas dentro de la calidad organoléptica del huevo. a- Color de yema; b- Alto de la albumina; c- Grosor de la cáscara



4.2.5 Evaluación percepción sensorial

El panel sensorial se realizó con un grupo de panelistas no entrenado, se seleccionaron 12 personas, entre hombres y mujeres mayores de edad que consumían regularmente huevos en su dieta. Cada uno de los panelistas calificó tres huevos cocidos sin sal. Los huevos fueron numerados de acuerdo con el número del comedero al que pertenecían y fueron cocidos una hora antes de realizar la prueba de degustación, para garantizar un proceso de cocción uniforme, se trabajaron grupos de cocción de 12 huevos, los cuales se mantuvieron en ebullición durante 10 minutos. Los huevos fueron distribuidos en forma aleatoria a cada uno de los participantes, ellos debían retirar la cáscara, realizar un corte longitudinal y degustar la tercera parte de una de las mitades cortadas. A cada persona se le pidió que evaluara tres huevos en intervalos de 15 minutos entre cada degustación, en cada espacio de tiempo se proporcionó 1 galleta de soda sin sal y agua a voluntad. En la prueba se pidió a los panelistas que diligenciaran una encuesta (Anexo A) y realizaran la calificación de las características organolépticas de tres huevos cocidos

(sabor, olor y la apariencia global) en una escala hedónica de 1 a 9, donde el número más bajo indicaba “Me gusta mucho”, mientras que el valor superior representaba “Me disgusta mucho” (Tabla 4–1).

4.2.6 Análisis estadístico

Se analizó la normalidad de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk, esta se usó para definir en qué variables era necesario el uso de herramientas no paramétricas en la comparación del efecto de los tratamientos experimentales sobre las variables de calidad sensorial y organoléptica de los huevos. En el caso de variables con distribución normal, el análisis de varianza se realizó con un diseño completo al azar, de acuerdo al siguiente modelo:

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

y_{ij} = Variables organolépticas y sensoriales de los huevos

μ = media general

τ_i = efecto del tratamiento

e_{ij} = error experimental

La comparación de medias se realizó por medio de los siguientes contrastes ortogonales:

1. Palma vs Pescado
2. Pescado Sin vs. Pescado con antioxidante
3. Pescado Vitamina E vs AEO
4. Tendencia lineal por inclusión del AEO
5. Tendencia cuadrática por inclusión del AEO

Las variables que no presentaron distribución normal fueron analizadas mediante la prueba de puntaje en rangos Wilcoxon, también conocida como Prueba Kruskal – Wallis (SAS®, 2008), descrita dentro los estadísticos de rango lineales simples como:

$$S = \sum_{j=1}^n C_j a(R_j)$$

R_j = Rango de la observación j

$a(R_j)$ = puntaje basado en el rango de la observación j

c_j = Indicador de la variable clase a la cual pertenece la observación j th

n = numero total de observaciones

En los casos en los que se presentaron diferencias significativas entre tratamientos se realizó una prueba de comparación múltiple para separar las medias (Surco y Alvarado, 2011; Catania y Avagnina, 2007). La evaluación de los supuestos experimentales se realizó con el procedimiento “Proc Univariate”, para las comparaciones no paramétricas se usó el procedimiento “Proc Npar1way”, mientras que, para las comparaciones paramétricas y separación de medias se siguió el procedimiento “Proc GLM”, del paquete estadístico SAS (SAS versión 9.2, Cary, NC, USA, 2008).

Tabla 4-1: Escala Hedónica empleada en el panel sensorial.

Escala	Calificación
1	Me gusta muchísimo
2	Me gusta mucho
3	Me gusta bastante
4	Me gusta ligeramente
5	Mi me gusta ni me disgusta
6	Me disgusta ligeramente
7	Me disgusta bastante
8	Me disgusta mucho
9	Me disgusta muchísimo

4.3 Resultados y discusión

La probabilidad de la prueba Shapiro-Wilk para las variables peso del huevo, alto de la albúmina, grosor de la cáscara y UH fue mayor a 0.05, es decir que mostraron un comportamiento con distribución normal, mientras que las variables apariencia global, olor y sabor, junto con el color de la yema, tuvieron un probabilidad $W < 0.05$, por tanto la comparación entre tratamientos se realizó con comparaciones no paramétricas. Los resultados de las variables peso, albúmina, cáscara y UH se muestran en la tabla 4–2. Los huevos seleccionados fueron más pesados a los 64 g propuestos para las unidades a seleccionar para la evaluación organoléptica, sin embargo, fue homogéneo entre tratamientos (66.7 ± 1.1 g). El alto de la albúmina no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos, estos resultados son similares a los reportes de Radwan y col (2008) quienes no encontraron diferencias por inclusión de 0.5% de hojas de orégano

en la dieta. La comparación de esta variable con otros reportes de literatura no puede realizarse, ya que en los trabajos de Orhan y Eren (2011) y Botsoglou y col (2005), la albúmina fue evaluada en peso relativo respecto al huevo completo, unidades no comparables con la unidad utilizada en este trabajo. Estos resultados podrían explicarse por lo reportado por Soler y col (2011), quienes sugieren que los cambios sobre la calidad de la albúmina son ocasionados principalmente por cambios en el nivel o el perfil de proteína de la dieta, aspecto que no fue considerado en este trabajo, donde se realizó una modificación sobre el perfil de ácidos grasos y se evaluó el efecto de AEO como aditivo antioxidante, siendo esta una posible razón a la poca variación en el alto de la albúmina en respuesta a los tratamientos empleados. El grosor de la cáscara por efecto del tipo de aceite usado en la dieta o por la inclusión de antioxidantes (Vitamina E o AEO) en las dietas con aceite de pescado respecto al grupo control, no mostro diferencias ($P>0.05$). La huevos de ponedoras alimentadas con dietas que tenían aceite de pescado y suplementados con vitamina E (40.5 μm) presentaron cáscaras significativamente más delgadas en comparación con las dietas con AEO como antioxidante (43.6 μm) (Figura 4-2).

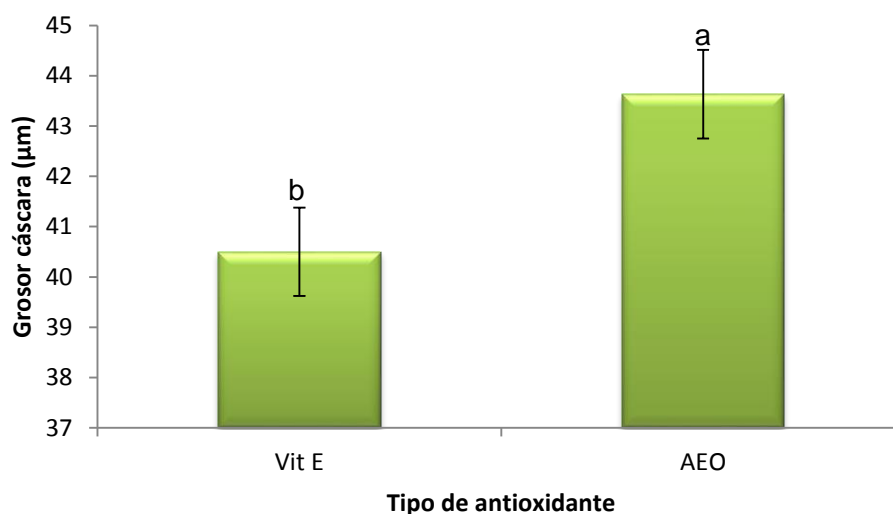
Tabla 4-2: Efecto del tipo de aceite y suplementación con antioxidantes en la dieta sobre la calidad organoléptica del huevo

Tratamiento	Peso (g)	Albúmina (mm)	Cáscara (μm)	Haugh
CONTP	67.5	5.7	42.8	82.9
CONT	65.2	5.8	44.0	86.4
VitE	67.0	5.5	40.5	84.3
O100	68.2	6.3	46.2	89.5
O150	66.3	5.1	44.0	81.9
O200	66.0	5.5	40.7	81.9
ESM ¹	1.21	0.42	0.76	1.68
Valor-P	0.5564	0.4742	<0.0001	0.0227
Contrastes			Pr>t	
Palma vs Pescado	--	0.9207	0.7817	0.3270
Pescado Sin vs Pescado Antiox	--	0.7256	0.1810	0.3134
Pescado VitE vs AEO	--	0.7510	0.0013	0.9285
Pescado AEO lineal	--	0.3004	0.0012	0.0097
Pescado AEO cuadrático	--	0.8906	0.0011	0.3535

¹ Error estándar de la media. CONTP: Dieta basal con 2% aceite palma, CONT: Dieta basal con 2% aceite pescado, VITE: Pescado con 200 g/Ton de vitamina E, O100: Pescado con 100 g/Ton AEO, O150: Pescado con 150 g/Ton AEO, O200: Pescado con 200 g/Ton AEO

El grosor de la cáscara presentó un comportamiento lineal – cuadrático ($P < 0.05$) en función del nivel de inclusión del AEO (Figura 4–3), con una reducción en el grosor de la cáscara con el incremento de la cantidad de aceite esencial adicionado a la dieta, el menor valor se obtuvo con 200 g/Ton de AEO ($40.7 \mu\text{m}$), siendo menor en $3.3 \mu\text{m}$, respecto al grupo CONT y O150, mientras que la cáscara más gruesa se observó en los huevos provenientes de la dieta O100 ($46.2 \mu\text{m}$). Los resultados de Botsoglou y col (2005), no mostraron diferencias en el grosor de la cáscara por inclusión de 5 g/Kg de hojas de orégano o romero o 200 mg de α -tocoferol en la dieta y concuerdan con los datos de Radwan y col (2008), quienes no encontraron diferencias por la suplementación con hojas de cúrcuma, romero, orégano o tomillo en la dieta, sin embargo, este último grupo señaló diferencias numéricas por la inclusión de hojas de cúrcuma respecto al grupo control, mientras que la inclusión de AEO no mostró diferencias en el grosor de la cáscara en niveles de 0.5 o 1% en la dieta, ellos sugieren que las diferencias numéricas se generaron por el efecto antioxidante, aspecto que puede ocasionar un mejor ambiente en el útero sitio de deposición de calcio, esta teoría podría explicar el comportamiento del grosor de la cáscara por efecto de la inclusión del AEO *Lippia origanoides* Kunth.

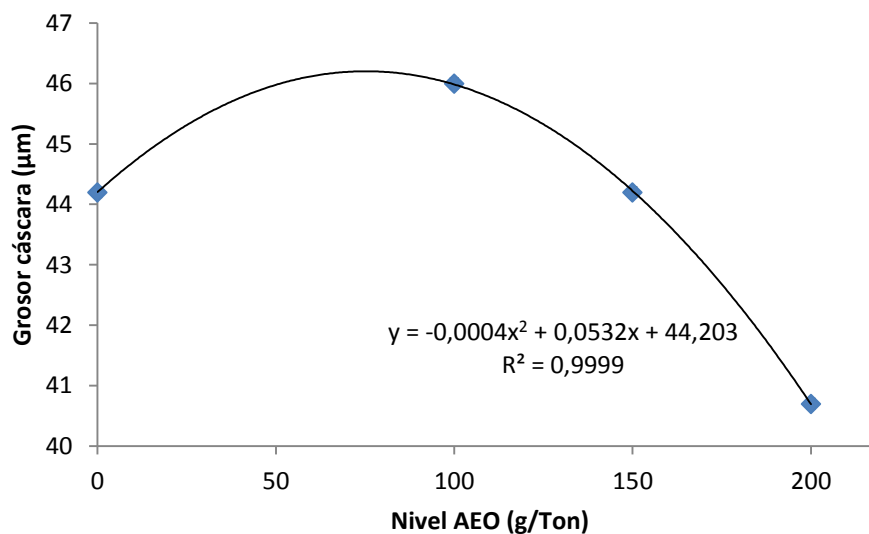
Figura 4-2: Efecto de la inclusión de antioxidantes en dietas de ponedoras formuladas con aceite de pescado sobre el grosor de la cáscara (Contraste Vitamina E vs AEO; $P=0.0013$)



Las unidades Haugh mostraron un comportamiento lineal ($P < 0.05$) por efecto de la inclusión del AEO, se observó una reducción de 0.0275 unidades por cada punto de incremento en la dosis del aceite esencial ($Y = -0.0275X + 88$; $R^2 = 0.39$; $P < 0.05$). Los niveles de inclusión de 150 g/Ton (82) y 200 g/Ton de AEO (81.9) presentaron los valores

de unidades Haugh más bajos respecto al grupo con 100 g/Ton de AEO (89.5), que presentó el valor más alto, mientras que las dietas control con aceite de palma, control con aceite de pescado y vitamina E mostraron valores intermedios (83, 86.4 y 84.3, respectivamente). Este resultado es opuesto a lo reportado por Orhan y Eren (2011) quienes no encontraron diferencias en las unidades Haugh de huevos frescos por efecto de incluir una mezcla de hierbas y aceites esenciales de orégano, tomillo, ajo e hinojo, respecto al grupo control, resultados similares fueron reportados por Radwan y col (2008), ellos no encontraron variaciones en las unidades Haugh de huevos obtenidos de ponedoras alimentadas con dietas que tenían aceites esenciales de orégano, romero, tomillo o cúrcuma en niveles de 0.5 o 1%, resultados similares a estos estudios fueron mostrados por Botsoglou y col (2005), donde no encontraron variación en las unidades Haugh en dietas suplementadas con 5 g/Kg de hojas de orégano o romero en la dieta de ponedoras. Las diferencias en los resultados de estos trabajos pueden explicarse por la forma de suplementación del orégano en las dietas, ya que en el presente trabajo se usó el aceite esencial el cual presenta una mayor concentración de los compuestos mayoritarios timol y carvacrol, respecto a las hojas secas de la misma planta, además de tratarse de dos especies de orégano diferentes, con cambios considerables en su composición, definiendo un comportamiento biológico diferente.

Figura 4-3: Efecto de la inclusión de tres niveles de AEO en dietas de ponedoras formuladas con aceite de pescado sobre el grosor de la cáscara del huevo ($Y = -0.0004 \cdot AEO^2 + 0.0532 \cdot AEO + 44.2$, $R^2 = 0.99$)



Los resultados de la suplementación con aceite esencial de orégano y vitamina E en dietas con aceite de pescado o palma sobre el color de la yema y la aceptación de huevos por parte del consumidor se encuentran resumidos en la Tabla 4–3. El color de la yema mostro diferencias significativas entre tratamientos, el grupo control con aceite de palma presentó el valor de coloración más alto (14), que indica pigmentación con tendencia al color naranja, mientras que la coloración más baja, con tendencia al amarillo se encontró en los huevos de los tratamientos control con aceite de pescado y con inclusión de 200 g/Ton de AEO, por su parte los huevos de los tratamientos suplementados con vitamina E, 100 y 150 g/Ton de AEO mostraron una coloración intermedia entre la pigmentación del amarillo al naranja. Estos resultados difieren de los reportes de Radwan y col (2008), este grupo no encontró diferencias en el color de la yema de huevos por efecto de la inclusión de 0.5 o 1% de hojas de romero, orégano, tomillo o cúrcuma en la dieta, resultados similares fueron reportados por Botsoglou y col (2005), quienes no encontraron diferencias en el color de la yema en dietas con inclusión de 5 g/Kg de hojas secas de orégano, romero o azafrán. Las diferencias mostradas en el presente estudio, donde se observó una mayor pigmentación en los huevos de dietas con aceite de palma y sin inclusión de ningún tipo de antioxidante, pudo corresponder a la pigmentación propia de los carotenoides presentes en el aceite de palma.

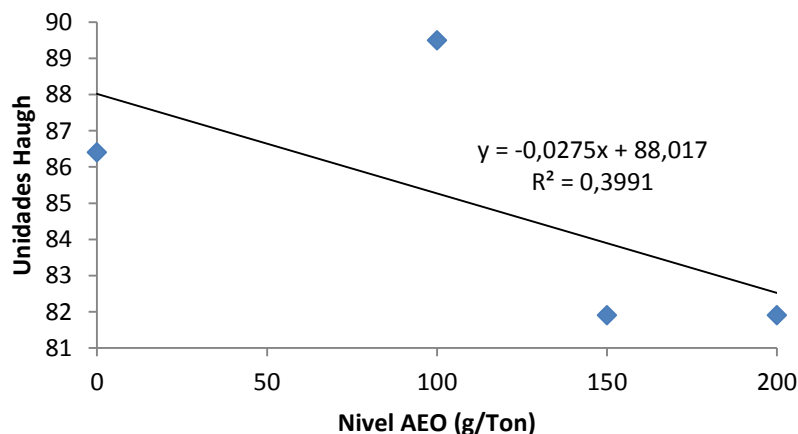
Tabla 4-3: Medianas para el efecto del tipo de aceite y suplementación con antioxidantes en la dieta sobre el color de la yema y aceptación del consumidor

Tratamiento	Yema	Apariencia global	Olor	Sabor
CONTP	14	3	3	3
CONT	11	3.5	4.5	6
Vitamina E	12	2	3.5	4
O100	12	3	3	5
O150	12	6	5	6
O200	11	2	2	6
Valor-Chi ²	0.0063	0.0324	0.0897	0.3657

El sabor no mostro diferencias significativas entre tratamientos, la calificación de los consumidores vario desde me gusta bastante en el caso del huevos del tratamiento con aceite de palma hasta me disgusta ligeramente en los tratamientos con aceite de pescado sin AEO y con niveles de 150 y 200 g/Ton. Para el olor se observaron diferencias numéricas ($\text{Chi}^2 < 0.1$) entre tratamientos, la inclusión de 150 g/Ton recibió la calificación más baja con 5 (“Ni me gusta ni me disgusta”), mientras que, los huevos del

tratamiento con 200 g/Ton recibieron la mejor calificación con 2 (“Me gusta mucho”) los tratamientos restantes recibieron valoraciones intermedias, las cuales expresaban un gusto ligero por parte del consumidor. La apariencia global mostró diferencias significativas entre tratamientos, la peor calificación la recibió el tratamiento con 150 g/Ton de AEO, comparado con los tratamientos control con aceite de palma, vitamina E y niveles de 100 y 200 g/Ton de AEO que presentaron la mejor calificación por parte del consumidor con evaluaciones de “Me gusta mucho” a “Me gusta bastante”. No se encuentran reportes en literatura donde se realice la comparación de tratamientos que incluyan AEO sobre la aceptación por parte del consumidor, en cuanto al tipo de aceite usado como fuente de enriquecimiento con AG omega-3 en la elaboración del alimento, los trabajos de Carrillo y col (2012) y Cherian (2008) sugirieron que las inclusiones superiores al 3% de aceite o harina de pescado tienen efecto negativo sobre el olor y sabor de los huevos provenientes de aves alimentadas con este tipo de dietas, ya que existe una transferencia de estas características al huevo durante la formación, junto con la mayor susceptibilidad a la peroxidación de los AGPI en la yema producto del enriquecimiento, proceso en el que se promueve la formación de compuestos volátiles secundarios que determinan la pérdida de la calidad sensorial de los huevos enriquecidos. Esta explicación puede sustentar las bajas calificaciones recibidas por los huevos de dietas con aceite de pescado, ya que las dietas empleadas en el presente trabajo tenían un 2% de aceite de pescado y 1.5% de harina de pescado, superando el límite sugerido en los trabajos mencionados.

Figura 4-4: Efecto de la inclusión de tres niveles de AEO en dietas de ponedoras formuladas con aceite de pescado sobre las unidades Haugh del huevo ($Y = -0.0275X + 88$, $R^2 = 0.39$; $P = 0.0097$. X corresponde a la inclusión de AEO)



4.4 Conclusiones

El grosor de la cáscara presentó una reducción de 7.6% por efecto del uso de vitamina E como antioxidante respecto a las dietas que incluían AEO, mientras que, por efecto del nivel de inclusión del aceite esencial, se observó un comportamiento cuadrático sobre la cáscara, alcanzando el mayor grosor con 100 g/Ton (46.2 μm) de AEO en la dieta, con dosis superiores se redujo en 11.9% hasta el valor más bajo alcanzado con 200 g/Ton.

El grado de frescura de los huevos evaluado por unidades Haugh se mantuvo sobre 80, considerándose como huevos muy buenos, sin embargo el valor más alto se observó con el tratamiento que incluía 100 g/Ton que fue superior en 7.9%, 3.6% y 6.2%, respecto al grupo control con palma, pescado o vitamina E, respectivamente.

El olor y sabor no fue diferente en su evaluación por parte del consumidor en los diferentes tratamientos, pero se observó una tendencia en los huevos de dietas con aceite de pescado a tener la mayor calificación, ubicada en la escala hedónica empleada como expresión de indiferencia o un ligero disgusto hacia las características.

La apariencia global mostró un ligero disgusto por los huevos del tratamiento con inclusión de 150 g/Ton de AEO, en los demás tratamientos los panelistas expresaron mucho gusto por los huevos, este resultado es contrastante con la evaluación obtenida para olor y sabor, ya que no existe concordancia en la evaluación de las características por parte de los panelistas, este resultado pudo ser consecuencia de la metodología empleada en la realización de la prueba de degustación, donde posiblemente los tiempos entre cada muestra evaluada no fueron suficientes, ocasionando una saturación en los evaluadores, determinando una reducción en la evaluación realizada en las muestras finales de cada panelista, sumado a una aleatorización no controlada de las réplicas experimentales dadas a cada panelista.

El color de la mostró una mayor pigmentación para la dieta con aceite de palma, los huevos de menor pigmentación se encontraron en las dietas con aceite de pescado sin suplementación de antioxidantes y con 200 g/Ton, este resultado puede estar definido por el mayor contenido de carotenos presentes en el aceite de palma

De los resultados obtenidos para la calidad sensorial y organoléptica por efecto de los tratamientos evaluados, se puede concluir que la dosis óptima de AEO *Lippia origanoides* Kunth se encuentra en dosis entre 100 y 150 g/Ton, superficie en la cual las características organolépticas y sensoriales mejoran o son similares a las huevos de ponedoras alimentadas con dieta control sin enriquecimiento con AGPI, in embargo, es necesario evaluar el efecto del AEO, el tiempo de almacenamiento y su posible interacción sobre las características de calidad del huevo, ya que el presente estudio se enfocó en la evaluación en huevos frescos, que si bien, aporta valores de referencia, no aborda la realidad de la cadena de producción de huevo, en la que, normalmente se tienen periodos de almacenamiento de al menos 15 días.

5. Conclusiones, Discusión y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

El consumo diario de alimento con un promedio de 109.1 ± 0.4 g por ave no presentó diferencias entre tratamientos, sin embargo, se presentó una mejor eficiencia de conversión del alimento por docena y kg de huevo de la dieta con 2% de aceite palma, siendo más bajo el consumo de alimento necesario para producir una docena o un Kg de huevos en 4.7 y 2.8%, respectivamente. El porcentaje de postura fue mayor en 3.4% para las dietas con aceite de palma, mientras que el peso de los huevos fue superior en 1.1 g por unidad en los tratamientos con aceite de pescado.

La eficiencia de conversión de alimento por docena de huevos mejoró en 3.9% y aumento en 4% el porcentaje de postura cuando no se usaron antioxidantes en las dietas elaboradas con 2% de aceite de pescado, mientras que la inclusión de vitamina E o AEO mejoró en 1.2 g el peso promedio de los huevos.

La suplementación con vitamina E (200 g/Ton) o AEO hasta niveles de 200 g/Ton en las dietas formuladas con aceite de pescado no afectó el desempeño productivo de las ponedoras, excepto para la CMH, donde se observó una mayor eficiencia (4.3%) para la conversión del alimento del tratamiento con vitamina E.

El peso del huevo mostró un comportamiento lineal – cuadrático en función del nivel de AEO incluido en la dieta, alcanzando el mayor peso en niveles entre 100 y 150 g/Ton de AEO (69.7 g), con niveles superiores se presentó una reducción de 2.2 g para niveles de 200 g/Ton de AEO.

El perfil de AG fue modificado por los tratamientos empleados, con un aumento de 4.4% en AGMI en las dietas con 2% de aceite de palma, mientras que el contenido de DHA y

AGPI fue mayor en un 1.4% y 15.5%, respectivamente, en las dietas con aceite de pescado. El incremento en el contenido de AGPI aumento la concentración de MDA en la yema en 27.6% en los huevos provenientes de dietas con aceite de pescado.

En los huevos frescos el grado de oxidación lipídica fue mayor en 86% en las dietas enriquecidas con AGPI, sin embargo la inclusión de vitamina E o AEO redujo en 16.6% la oxidación de los lípidos de la yema.

Durante el almacenamiento se incrementó la oxidación lipídica, alcanzando 10.3 ng más de MDA en los huevos almacenados hasta por 60 días. El grado de oxidación de la matriz lipídica de yemas de huevos provenientes de aves alimentadas con dietas que incluían aceite de pescado se redujo en 0.06 ng de MDA por cada unidad de AEO incluida en la dieta, alcanzando una reducción de 20.7% con la inclusión de 200 g/Ton de AEO.

El almacenamiento a -10°C mantuvo en un 27% más, la estabilidad oxidativa de los huevos hasta por 60 días, sin embargo esta no es una temperatura de almacenamiento usada convencionalmente. Los huevos de tratamientos sin uso de aceite de pescado almacenados a 4°C mostraron un 53.2% menos de oxidación lipídica, mientras que, en los tratamientos enriquecidos con AGPI, la inclusión de AEO en niveles de 150 y 200 g/Ton mejoro en 19.1% la estabilidad oxidativa de la matriz lipídica de los huevos almacenados resultado comparable al efecto de usar 200 g/Ton de vitamina E en la dieta como fuente antioxidante.

El alto de la albúmina no fue afectado por el uso de aceite de palma o pescado o por la inclusión de vitamina E o AEO. El grosor de la cáscara presentó una reducción de 7.6% por efecto del uso de vitamina E como antioxidante respecto a las dietas que incluían AEO, mientras que, por efecto del nivel de inclusión del aceite esencial, se observó una tendencia lineal – cuadrática sobre la cáscara, alcanzando el mayor grosor con 100 g/Ton (46.2 μm) de AEO en la dieta, con dosis superiores se redujo en 11.9% hasta alcanzar el menor grosor obtenido con 200 g/Ton de AEO.

El grado de frescura de los huevos evaluado por unidades Haugh fue mayor con la inclusión de 100 g/Ton de AEO. El olor y sabor no fue diferente en su evaluación por parte del consumidor en los diferentes tratamientos, pero se observó una tendencia en los huevos de dietas con aceite de pescado a tener la mayor calificación, ubicada en la escala hedónica empleada como expresión de indiferencia o un ligero disgusto hacia las características. La apariencia global mostró un ligero disgusto por los huevos del tratamiento con inclusión de 150 g/Ton de AEO, en los demás tratamientos los panelistas expresaron “mucho gusto” por los huevos.

El color de la yema fue diferente entre tratamientos, mostrando una mayor pigmentación para la dieta con aceite de palma sin uso de antioxidantes, los huevos de menor pigmentación se encontraron en las dietas con aceite de pescado sin suplementación de antioxidantes y con 200 g/Ton de AEO.

De los resultados obtenidos para las variables consideradas en el trabajo se puede concluir que el enriquecimiento de huevos con AGPI se logró con la inclusión de aceite de pescado en niveles de 2% en la dieta de ponedoras, mientras que la dosis óptima de AEO *Lippia origanoides* Kunth se encuentra en dosis entre 100 y 150 g/Ton, superficie en la cual las características productivas de las aves no fueron afectadas negativamente y se logró reducir el proceso de degradación oxidativa de los huevos enriquecidos con AGPI durante periodos de almacenamiento hasta de 60 días, mientras que las características organolépticas y sensoriales fueron similares a las huevos de ponedoras alimentadas con dieta control sin enriquecimiento con AGPI.

5.2 Discusión

Los estudios realizados en cuanto al uso de aceites esenciales de orégano en sistemas de alimentación de ponedoras, son escasos y no se ha dado un consenso respecto al efecto de su inclusión sobre el desempeño productivo. Radwan y col (2008) sugieren que las inclusiones de hojas de orégano secas en niveles del 1%, mejoran los parámetros productivos respecto a dietas sin suplementación, este resultado parece ser consecuencia de los compuestos fenólicos presentes en las plantas de la familia

Labiatae, que se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante, determinando así, una mejor utilización de nutrientes por parte del ave, en otras especies se reportó que la inclusión de una mezcla de salvia – orégano mejoró la relación profundidad de la cripta/altura de la vellosidad, aumentando el área de absorción, resultado que se vio reflejado en un mayor crecimiento y estado sanitario de los animales suplementados (Radwan y col., 2008), mientras que los resultados de Florou-Paneri y col (2005), Botsoglou y col (2003), Orhan y Eren (2008) sugieren que no se presentan diferencias en la expresión productiva por efecto de incluir aceites esenciales en la dieta. En cuanto al efecto antioxidante, los autores mencionados concuerdan en el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la estabilidad oxidativa, la cual se reduce con periodos prolongados hasta por 60 días, mientras que por efecto del aceite esencial de orégano se mejoró la estabilidad oxidativa de los huevos respecto a tratamientos sin uso de antioxidantes, pero sin ser superiores a los resultados obtenidos con inclusiones de vitamina E en niveles hasta 200 g/Ton, este resultado difiere a lo encontrado en el presente trabajo, en el que, niveles entre 150 y 200 g/Ton mostraron un comportamiento superior a la vitamina E. La respuesta sobre variables de calidad de huevo reportadas en trabajos anteriores se centran en evaluar unidades haugh y grosor de la cascara, variables para las cuales no se reportaron diferencias por inclusión de los AEO, mientras que reportes sobre la aceptación del consumidor no se encontraron en los trabajos revisados, aspecto que impide la comparación de estas variables y los resultados aquí presentados. Las diferencias entre estudios pueden considerarse resultado de las condiciones particulares en cada ensayo, como edad de las aves, dietas basales empleadas, presentación del orégano y en el caso del presente estudio, del aceite esencial, ya que los estudios mencionados usaron orégano griego (*Oreganum vulgare* subsp. Hirtum), el cuál presenta una composición diferente al aceite esencial de orégano obtenido de la especie *Lippia origanoides* Kunth, del Alto Patía en Nariño, que se caracteriza por presentar una mayor proporción de timol, respecto a carvacrol (Ariza y col., 2011), que es el metabolito mayoritario en gran parte de las especies de orégano, y que puede ser el responsable del comportamiento diferencial respecto a los estudios con otros aceites esenciales o materiales vegetales.

5.3 Recomendaciones

Realizar la valoración sensorial y de calidad organoléptica de los huevos durante periodos de almacenamiento, para determinar en forma clara el efecto del enriquecimiento y la reducción del proceso oxidativo de los huevos enriquecidos sobre la percepción final del consumidor.

Ampliar la evaluación del perfil de AG de cadena larga y su estabilidad oxidativa bajo el efecto de la superficie de inclusión del AEO evaluada, ya que, la valoración bajo un solo nivel (100 g/Ton) no permite estimar un nivel de optimización para la inclusión del aceite esencial.

Incluir la determinación del EPA en el perfil de AG, ya que es otro ácido graso poli insaturado de interés en la formulación de estrategias de enriquecimiento y también presenta alta susceptibilidad a procesos degradativos por oxidación.

A. Anexo: Encuesta usada en el panel sensorial

PRUEBA DE DEGUSTACIÓN

FECHA: _____

NOMBRE: _____

¿Usted Fuma? Si_ No_

— —

En los últimos 3 meses con qué frecuencia consume huevos (Marque una sola opción)

- () Al menos uno al mes
 () Más de uno pero al menos uno a la semana
 () Más de uno a la semana

1. **Registre el número del huevo**, pélelo y córtelo por la mitad
2. Enjuague su boca con agua antes de comenzar
3. Consuma una galleta sin sal y agua entre cada huevo
4. Clasifique las características organolépticas (sabor, olor y apariencia global) de cada huevo según la siguiente escala:

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Me gusta muchísimo 2. Me gusta mucho 3. Me gusta bastante 4. Me gusta ligeramente 5. Mi me gusta ni me disgusta 6. Me disgusta ligeramente 7. Me disgusta bastante 8. Me disgusta mucho 9. Me disgusta muchísimo |
|---|

Número de huevo	Apariencia global	Olor	Sabor

--	--	--	--

Observaciones: _____

B. Anexo: Instrucciones para los autores Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Directrices para autores

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
ISSN 0120-2952

La *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* publica reportes de caso y artículos científicos, de revisión y de opinión de todas las áreas de la medicina veterinaria y la zootecnia. Para el envío de artículos a consideración del comité editorial de la revista es indispensable cumplir con los siguientes requisitos:

1. Los artículos deben ser inéditos y no deben haber sido publicados o sometidos a consideración en otras revistas o publicaciones técnico-científicas (excepto cuando hayan sido publicados como tesis de grado o como resumen en un congreso). Enviar simultáneamente un mismo artículo a consideración de dos o más revistas es una falta grave a la ética académica.

2. Los autores transfieren los derechos de publicación a la revista, tanto en su versión impresa como en línea, incluyendo esta última las diferentes bases de datos en las que se encuentre indexada la revista.
3. La publicación del artículo debe haber sido aprobada por todos los coautores (si los hubiese) y por las autoridades responsables de la institución donde se llevó a cabo la investigación.
4. El documento debe cumplir a cabalidad con las instrucciones para autores establecidas por el comité editorial descritas en el presente documento. Los artículos que no se ajusten a estas pautas serán devueltos los autores sin haber sido considerados para evaluación.

Los artículos que sean aceptados para evaluación serán enviados a un mínimo de dos pares académicos reconocidos para su evaluación. En caso de una decisión dividida por parte de los evaluadores, será el editor o el comité editorial en pleno quien determine la inclusión o el rechazo del documento. Si los artículos son aceptados para publicación, los autores deberán corregirlos de acuerdo con las observaciones de los pares y el comité editorial dentro del tiempo otorgado para ello. Las observaciones que no sean aceptadas por los autores deberán contar con un sustento apropiado que será evaluado por el editor correspondiente. El editor y el comité editorial se reservan el derecho de rechazar o aceptar los materiales enviados para su publicación.

Bibliografía

1. Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., and Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 1998. 46: 1736 – 1745.
2. Aeschbach R., Lölliger J., Scott B.C., Murcia A., Butler J., Halliwell B., and Aruoma O.T. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* 1994; 32: 31 – 36.
3. Ariza C., Afanador G., Betancourt L., Hurtado A., Arango O., y Toro I. Aceites esenciales de orégano: un aditivo funcional con amplio potencial de uso en la industria avícola. Capítulo 2: Caracterización de los aceites esenciales del Cordón Panamericano del Alto Patía. 2011; pp: 12 – 17.
4. Baratta, M. T., Dorman H. J. D., Deas S. G., Figueredo A. C., and Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Frag J.* 1998; 104: 286-292.
5. Bernal G.M.A., De Mendonça-Junior C.X., y Mancini-Filho J. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2003; Vol 39. N° 4: 425 – 432.
6. Botsoglou N., Florou-Paneri P., Botsoglou E., Dotas V., Giannenas I., Koidis A., and Mitrakos P. The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and α -tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. *South African Journal of Animal Science.* 2005; 35 (3): 143 – 151.
7. Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Christaki E., Spais A.B. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil

and α -tocopheryl acetate supplementation. *Food Research International*. 2003. 36: 207 – 213.

8. Botsoglou N.A., Christaki E., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., and Spais A.B. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*. 2002; 62: 259 – 265.

9. Cabuk M., Bozkurt M., Alcicek A., Cath A.U. and Baser K.H.C. Effect of a dietary essential oil mixture on performance of laying hens in the summer season. *South African Journal of Animal Science*. 2006; 36 (4): 215 – 221.

10. Carraro A., y Antunes A. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. *Scientia Agricola*. 2001; 58 (4): 681 – 685.

11. Castañeda. M.. Muñoz. A.. y Stashenko. E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*. Nº 2007. 33.

12. Castillo-Badillo C.. Vázquez-Valladolid J.L. González-Alcorta M.. Morales-Barrera E.. Castillo-Domínguez R.M.. y Carrillo-Domínguez S. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos ω – 3 en el huevo de gallina. *Grasas y Aceites*. 2005; Vol 56. Fasc. 2. p. 153 – 159.

13. Castro M.I. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia*. Marzo. 2002; 27 (3): 36 – 128.

14. Catagnia C., y Avagnina. Curso Superior de Degustación de Vinos. 29: El análisis sensorial. INTA. 2007; p: 1 – 21.

15. Ceres. Conozcamos el gallinero feliz. Archivo de la etiqueta: Huevo calidad orgánica. 2013. Disponible en: <https://cerescolombiacert.wordpress.com/tag/huevo-calidad-organica/>

16. Cherian G.. Wolfe F.W.. and Sim J.S. Feeding dietary oils with tocopherols: effects on internal qualities of eggs during storage. *J. Food. Sci.* 1996; 61:15 – 18.

17. Cozzi R., Ricordy R., Aglitti., Gatta V., Petricone P., and De Salvia R. Ascorbic acid and β -carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 223 – 228.
18. Dorman, H. J., and S. G. Deans. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000. 88: 308 – 316.
19. Economou K.D., Oreopoulou V., and Thomopoulos C. Antioxidant properties of some plant extracts of the Labiatae family. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1991. 68: 109 – 113.
20. El País. Colombia tiene más de 40 mil hectáreas de producción orgánica. El País.com.co. 2013. Disponible en: <http://www.elpais.com.co/elpais/colombia/noticias/colombia-tiene-40-mil-hectareas-produccion-organica>
21. FAO – Departamento de agricultura. Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. FAO Food and nutrition papers. 2002. Roma 19 – 29 de Octubre. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/V4700S/V4700S00.htm>.
22. FEDNA. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. 3ª edición. 2010; C. de Blas. G.G. Mateos y P. García-Rebollar. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. 502 pp. Disponible en: <http://www.fundacionfedna.org/ingredientes-para-piensos>.
23. FENAVI. Federación Nacional de Avicultores. 2014: Tendencia hacia la consolidación. Revista Avicultores. 2014; Marzo 213: 29 – 34. Disponible en: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/pdfs/revista-213.pdf>
24. FENAVI. Federación Nacional de Avicultores. Fenavi 30 años. Revista Avicultores. 2013a; Octubre 210. p 58. Disponible en: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/pdfs/revista-203.pdf>
25. FENAVI. Federación Nacional de Avicultores. La industria avícola 2012: calificación positiva. 2013: a ajustar la marcha. Revista Avicultores. 2013b; Febrero 203: 9 – 10. Disponible en: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/pdfs/revista-203.pdf>

26. FENAVI. Estadística Fenavi: Consumo Per Capita. Estadísticas de los últimos años para el sector avícola. 2013c. Disponible en: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160&Itemid=556#magictabs_fqeak_2.
27. Florou-Paneri P., Nikolakakis I., Giannenas I., Koidis A., Botsoglou E., Dotas V. and Mitsopoulos I. Hen Performance and Egg Quality as Affected by Dietary Oregano Essential Oil and α -tocopheryl Acetate Supplementation. *International Journal of Poultry Science*. 2005a; 4(7): 449 – 454.
28. Florou-Paneri P., Palatos G., Govaris A., Botsoglou D., Giannenas I., and Ambrosiadis I. Oregano herb versus oregano essential oil as feed supplements to increase the oxidative stability of turkey meat. *International Journal of Poultry Science*. 2005b; 4(11): 866 – 871.
29. Galobart J., Barroeta A.C., Baucells M.D., Codony R., and Ternest W. Effect of dietary supplementation with Rosemary extract and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in eggs enriched with ω 3-fatty acids. *Poultry Science*. 2001; 80: 460 – 467.
30. Hargis P.S., Van Elswyk M.E. y Hargis B.M. Abstract: Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poultry Science*. 1991; pp: 874 – 883.
31. Hirose M., Hagiwara A., Hasui T., Inoue K., and Ito N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. *Cancer Lett*. 1986; 30: 169 – 174.
32. Isabel B., y Santos Y. Efectos de los aceites esenciales en la alimentación de los pollos de carne. Nota breve. *Arch. Zootec*. 2002; 58 (Supl. 1): 597 – 600.
33. Krause E.L., Ternes W. Bioavailability of the antioxidative thyme compounds thymol and D-cymene-2, 3-diol in eggs. *Eur. Food Res. Technol*. 1999. 209: 140 – 144.
34. Leeson S., y Zubair A.k. Efectos sobre la salud del consumo de huevos enriquecidos en ácidos grasos omega-3 y vitaminas. En: XII Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el

Desarrollo de la Nutrición Animal. 1996; p: 45 – 245. Disponible en: http://fundacionfedna.org/sites/default/files/96CAP_XII_2.pdf.

35. Lozano S.A.M. Análisis de la norma colombiana sobre huevos frescos y ovoproductos para la armonización con la norma internacional. Proyecto final de graduación para optar al título de master en Gerencia de Programas Sanitarios y de Inocuidad de Alimentos. Universidad para la Cooperación Internacional, Costa Rica. 2012.

36. Maestro D.R., y Borja P.R. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Instituto de la grasa y sus derivados. 1993. 44 (2). Disponible en: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es>.

37. Maguna. F.P.. Romero. A.M.. Garro. O.A.. and Okulik. N.B. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 2006.

38. Mayes. P.A. Capítulo 15. Lípidos de importancia fisiológica. p. 138. En: Murray R.K. Granner. D.K. Mayes. P.A. Rodwell. V.W. Bioquímica de Harper. Undécima edición. Editorial el manual moderno. S.A. de C.V. México. 1988; p.713.

39. McKee T.. Mckee J.R. Bioquímica: La base molecular de la vida. Capítulo 12: Lípidos y membranas. Tercera ed: McGraw-Hill. 2003; p: 331.

40. Meluzzi, F.A. Sirri, G. Manfreda, N. Tallarico, and A. Franchini. Effects of Dietary Vitamin E on the Quality of Table Eggs Enriched with n-3 Long-Chain Fatty Acids. *Poultry Science*. 2000; 79: 539 – 545.

41. Milos M., Mastelic J., and Jerkovic I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano. *Food Chemistry*. 2000; 71: 79 – 83.

42. Nelson D.L. y Cox M.M. Capítulo 11: Lípidos. lipoproteínas y membranas. En: Parte 1: Componentes moleculares de las células. Lehninger Principios de Bioquímica. 4ª edición. Ed. Omega. 2005. 11: 285

43. Ordoñez P.J.A. y de la Hoz P.L. Capítulo 23: Carnes. pescado y huevos. Tratado de nutrición. Hernández Rodríguez y A. Sastre Gallego. Ediciones Diaz de Santos S.A. 1999; p. 372- 375. Disponible en: <http://books.google.com.co/>
44. Orhan F., and Eren M. Effect of the herbal mixture supplementation to fish oiled layer diets on lipid oxidation of egg yolk, hen performance and egg quality. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 2011; 58, 33-39.
45. Pokorny J. Antioxidants in food: Practical applications. Chapter 10: Sources of natural antioxidants: vegetables. fruits. herbs. spices and teas. *Trends in Food Science Technology* 1991; 223 – 227.
46. Proexport Colombia. Colombia necesita más producción de orgánicos para exportar. 2010. Noviembre. Disponible en: <http://www.proexport.com.co/noticias/colombia-necesita-mas-produccion-de-organicos-para-exportar>
47. Puertas-Mejia M., Hillebrand S., Stashenko E., and Winterhalter P. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plantas and fractions from oregano (*Origanum Vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 2002; 17: 380 – 384.
48. Radwan N.L., Hassan R.A., Qota E.M., and Fayek H.M. Effect of Natural Antioxidant on Oxidative Stability of Eggs and Productive and Reproductive Performance of Laying Hens. *International Journal of Poultry Science*. 2008; 7 (2): 134 – 150.
49. Rostagno H.S. Tablas Brasileñas para aves y cerdos. 2da edición. 2005. Brasil.
50. Ruiz. C., Tunarosa. F., Martínez. J., y Stashenko. E. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia organoides* H.B.K. obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica* 2007; Año XIII. No. 33: 325-328.
51. SAS. SAS/STAT User's guide: Statistics. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2008.
52. Saura-Calixto F., Goñi i. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*. 2006; 94: 442 – 447.

53. Soler M.D., Garcés C., y Barragán J.J. La alimentación de la ponedora y la calidad del huevo. PV Albeitar: Artículos aves. 2014; Junio: 1 – 6.
54. Simopoulos A.P. Symposium: Role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA. *Poultry Science*. 2000; 79: 961 – 970.
55. Stashenko. E.. Ruíz.C.A.. Arias.G.. Durán. D.C.. Salgar. W.. Cala. M.. y Martínez. M.R. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *Journal of Separation Scienc*. 2010; 33:93-103.
56. Surco A., y Alvarado K. Estudio estadístico de pruebas sensoriales de harinas compuestas para paificación. *Revista Boliviana de Química*. 2011; 28 (2): 79 – 82.
57. Van Elswyk. Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. *British Journal of Nutrition*. 1997; 78, Suppl.1: S61 – S69.
58. Yanishlieva Nedyalka. V.. Marinova Emma. M.. Gordon Michael. H.. and Raneva Violeta. G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 1999; 64: 59 – 66.
59. Yanishlieva N.V. and Marinova E.M. Inhibited oxidation of lipids I. Complex estimation and comparison of the antioxidative properties of some natural and synthetic antioxidants. *Fats Sci. Technol*. 1992. 94, 374 – 379.
60. Yannakopoulos A., Tserveni-Gousi A., and Christaki E. Enhanced Egg Production in Practice: The Case of Bio-Omega-3 Egg. *International Journal of Poultry Science*. 2005; 4 (8): 531 – 535.
61. Young, J. F., J. Stagsted, S. K. Jensen, A. H. Karlsson, and P. Henckel. Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and oregano supplements reduce stress-induced deterioration of chicken meat quality. *Poult Sci*. 2003. 82: 1343-1351.
62. Zekaria D. Los aceites esenciales: una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorios Calier. 2000. En <http://www.wpsa-aeca.es/>