

ESTUDI DE L'EFECTE DE L'ADMINISTRACIÓ DE TILOSINA I DOXICICLINA EN ELS PRINCIPALS PARÀMETRES NUTRICIONALS I DE COMPOSICIÓ DE L'OU DE GALLINA

Eva Roldós Noguer

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/362101>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL:

**ESTUDI DE L'EFECTE DE
L'ADMINISTRACIÓ DE TILOSINA I
DOXICICLINA EN ELS PRINCIPALS
PARÀMETRES NUTRICIONALS I DE
COMPOSICIÓ DE L'OU DE GALLINA**

Eva Roldós Noguera

2015

TESI DOCTORAL:

**ESTUDI DE L'EFECTE DE
L'ADMINISTRACIÓ DE TILOSINA I
DOXICICLINA EN ELS PRINCIPALS
PARÀMETRES NUTRICIONALS I DE
COMPOSICIÓ DE L'OU DE GALLINA**

Eva Roldós Noguera

2015

Programa de doctorat en Tecnologia

Tutora de la UdG

Dra. M. Del Carmen Carretero

Director de la tesi doctoral

Dr. J.A. García Regueiro

Codirector de la tesi doctoral

Dr. Massimo Castellari

Memòria presentada per optar al títol de Doctora per la Universitat de Girona

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat gràcies a una beca predoctoral per a la formació i contractació de personal investigador novell (FI) concedida per l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya i al finançament del projecte "*Biomarcadores de calidad y seguridad en huevo fresco relacionados con la administración de antibióticos.*" per part del Ministerio de Ciencia e Innovación de l'Estat Espanyol.

*Als meus pares,
als meus germans
i a vosaltres, Aura i Periq.*

Agraïments

Vull agrair al Dr. José Antonio García i al Dr. Massimo Castellari com a directors d'aquesta tesi, la confiança dipositada en mi, així com la seva dedicació i el seu suport rebut. Gràcies als seus coneixements i a la seva experiència he pogut aprofundir en l'àmbit alimentari i cromatogràfic. D'altra banda, també vull donar les gràcies, citats per ordre alfabètic, a l'Eugeni Anselmet, en Mariano Bellelli, en Tiago Cardoso, a la Dra. Isabel Díaz, a la Dra. Marta Gratacós, a la Dra. Anna Hereu, a la Dra. Maria Hortós, a l'Amanda Núñez, al Dr. Albert Ribas, a la Dolors Roca, en Narcís Sais, a la Dra. Carmen Sárraga, a l'Elena Viñas i a altres persones que malauradament em deixo, per la seva ajuda, per tots els coneixements transmesos i per les estones de menjador compartides que sense ells no haguessin estat tan divertides.

Moltes gràcies a l'IRTA de Monells per deixar-me realitzar aquesta tesi a les seves instal·lacions i a la granja experimental del IRTA del Prat de Llobregat per criar les gallines utilitzades en el projecte.

També vull agrair a la Dra. Carmen Carretero, l'aire fresc que va donar en aquesta tesi.

Deixant l'àmbit professional he d'agrair enormement el suport rebut per part de tots els meus amics i familiars, que tantes vegades m'han hagut de dir que no deixés escapar l'oportunitat de finalitzar la tesi. Periq, Aura, Roser, Pep, Jordi, Anna, Concep, Josep Maria, Mariona, Martí, Gemma, aquí teniu el final d'una història que va començar fa molts anys i qui ho havia de dir, ha arribat al seu final! Moltes gràcies a tots!

Abreviacions i símbols

λ : Longitud d'ona

ANOVA: Anàlisi de la variància

APCI⁺: Ionització química pressió atmosfèrica en mode positiu

BHT: Butil-hidroxitoluè

BSA: Albúmina de sèrum boví

CE: Comunitat Europea

CHAPS: (3[(3-colamidopropil)-dimetilamoni-1-propanosulfat])

CHES: Àcid N-ciclohexil-2-aminoetasulfònic

CV: Coeficient de variació

DAD: Detector de sèrie de díodes

DMSO: Dimetilsulfòxid

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DTT: Ditiotreitòl

2D-SDS-PAGE: Electroforesi bidimensional en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic

EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

ELSD: Detector de *evaporative light scattering*

ESI⁺: Ionització per electroesprai en mode positiu

FAOSTAT: Base estadística de la Organització de les Nacions Unides per a l'alimentació i l'agricultura (FAO)

FID: Detector d'ionització de flama

FLD: Detector de fluorescència

GC: Cromatografia de gasos

H₃PO₄: Àcid fosfòric

HEPES: Àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetasulfònic

HPLC: Cromatografia líquida d'alta resolució

IDESCAT: Institut d'Estadística Català

IEF: Isoelectroenfocament

IPG: Immobilized pH gradient gels

IRTA: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

LLO: 1,3-linoleic-2-oleic

LMR: Límit màxim residual

LOD: Límit de detecció

LOQ: Límit de quantificació

M1: Mostreig previ al període de retirada

M2: Mostreig posterior al període de retirada

MALDI-TOF-MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization source en un espectròmetre de masses amb temps de vol

MDA: Malondialdehid

MRM: Multiple reaction monitoring

MS: Espectròmetre de masses

MS/MS: Espectrometria de masses en tàndem

MSⁿ: Espectrometria de masses amb múltiples etapes

TOF-MS: Espectròmetre de masses de temps de vol

MSPD: dispersió de matriu en fase sòlida

5-MTHF: Àcid 5-metiltetrahidrofòlic

MUFA: Àcids grassos monoinsaturats

m/z: relació entre la massa molecular i la càrrega de l'ió

OOL: 1,2-oleic-3-linoleic

OOO: Trioleic

PCA: Anàlisi de components principals

PC: Component principal

PI: Patró intern

POL: 1-palmític-2-oleic-3-linoleic

POO: 1,2-oleic-3-palmític
POS: 1-palmític-2-oleic-3-esteàric
PTFE: Politetrafluoroetilè, tefló
PUFA: Àcids grassos poliinsaturats
QuEChERS: Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe
RI: Detector d'índex de refracció
SAX: Intercanvi aniònic fort
SDS: Dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE: Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
SFA: Àcids grassos saturats
SIM: Selected ion monitoring
SOO: 1,2-oleic-3-esteàric
SPE: Extracció en fase sòlida
spp: Espècie
TBA: Àcid tiobarbitúric
TBA₂-MDA: Complex entre l'àcid tiobarbitúric i el malondialdehid
TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances
TLC: Cromatografia en capa fina
UE: Unió Europea
UPLC[®]: Ultra performance liquid chromatography
USDA: United States Department of Agriculture
UV: Detector ultraviolat
UV-Vis: Radiació ultraviolada visible

Índex de figures

Figura 1 Estructura de les formes de la tilosina.	19
Figura 2 Estructura de la doxiciclina.....	21
Figura 3 Estructura de la doxiciclina on s’hi representen els grups funcionals dels seus pKa.	22
Figura 4 Estructura química del colesterol (Sigma-Aldrich, 2015).	39
Figura 5 Estructura química dels diferents derivats dels folats. (A) derivats amb la forma oxidada de l’anell de pteridina, (B) derivats amb la forma reduïda de l’anell de pteridina (Patring & Jastrebova, 2007).....	42
Figura 6 Estructures dels carotenoids analitzats en aquest treball, de l’ α -tocoferol i del retinol (Sigma-Aldrich, 2015).....	46
Figura 7 Reacció entre el MDA i el TBA per formar el complex TBA ₂ -MDA.....	50
Figura 8 Esquema dels grups d’estudi i dels mostreigs.	56
Figura 9 Bioanalyser [®] (Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide, 2008).....	62
Figura 10 Esquema de les determinacions analítiques realitzades a partir de l’extracte lipídic.....	64
Figura 11 Esquema de les determinacions analítiques realitzades a partir de l’alíquota destinada a l’extracte de triglicèrids.....	70
Figura 12 Perfil proteic d’una mostra de clara d’ou obtingut mitjançant l’estoig d’Agilent “ <i>High Sensitivity Protein 250 kit</i> ”.....	105
Figura 13 Cromatograma dels àcids grassos totals obtingut mitjançant la GC-FID d’una mostra de rovell d’ou.	108

Figura 14 Perfil dels àcids grassos de les mostres de rovell d'ou recollides abans del període de retirada (M1) i després del període de retirada (M2).	112
Figura 15 Cromatograma dels triglicèrids d'una mostra de rovell d'ou obtingut mitjançant la HPLC-APCI ⁺ -MS (<i>scan</i> : m/z 250 - 900).	114
Figura 16 Espectre del POL d'una mostra de rovell d'ou.	114
Figura 17 Cromatograma dels triglicèrids d'una mostra de rovell d'ou obtingut mitjançant la HPLC-RI.	116
Figura 18 Cromatograma dels àcids grassos procedents de la fracció dels triglicèrids d'una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.	119
Figura 19 Cromatograma dels àcids grassos procedents de la fracció dels àcids grassos lliures d'una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.....	121
Figura 20 Cromatograma dels àcids grassos procedents de la fracció dels fosfolípids d'una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.	123
Figura 21 Cromatograma del colesterol i del 5 α -colestán-3 β -ol (patró intern) obtingut mitjançant la HPLC-RI d'una mostra de rovell d'ou. ...	126
Figura 22 Cromatograma de l'àcid 5-MTHF d'una mostra de rovell d'ou mitjançant la HPLC-FLD.	130
Figura 23 Separació cromatogràfica del retinol, de la luteïna, de la cantaxantina i de l' α -tocoferol mitjançant la HPLC-DAD-FLD en una mostra de rovell d'ou.....	134

Figura 24 Optimització del temps d'incubació de les mostres en el test del TBA induït.....	138
Figura 25 Cromatogrames amb mode SIM de la doxiciclina (A) i de la tilosina A (B) en una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la UPLC-MS/MS®.	144
Figura 26 Cromatogrames amb mode SIM de la tilosina A en una mostra de clara d'ou, obtingut mitjançant la UPLC-MS/MS®. A: extracció de la tilosina A mitjançant el protocol d'extracció del rovell d'ou. B: extracció de la tilosina A mitjançant el protocol número 1 de la clara d'ou.	144
Figura 27 Representació de l'anàlisi de components principals.	154

Índex de taules

Taula 1 Grups de compostos que cal controlar en les mostres d'ou de gallina, segons l'annex I i II de la Directiva 96/23/CE del Consell Europeu.	14
Taula 2 Principals nutrients de l'ou de gallina. Valor per 100 g (Font: USDA, 2010).	31
Taula 3 Composició del pinso subministrat a les gallines ponedores de l'estudi (Super's, Nutrició animal N.º 6, Interdiana S.L).	55
Taula 4 Productes comercials dels antibiòtics utilitzats en l'estudi.	57
Taula 5 Mitjana dels valors del percentatge de proteïna soluble en la clara d'ou.	104
Taula 6 Mitjana dels valors de les relacions entre les proteïnes majoritàries del perfil proteic de la clara d'ou. Per a cada grup, n = 10.	106
Taula 7 Mitjana dels valors de la concentració dels àcids grassos del rovell de l'ou (g/kg rovell).	109
Taula 8 Massa molecular dels triglicèrids identificats en el rovell de l'ou.	113
Taula 9 Paràmetres d'avaluació del mètode per a cada triglicèrid (mitjana ± desviació estàndard).	117
Taula 10 Mitjana dels valors de la concentració dels triglicèrids en el rovell de l'ou (g/kg).	118
Taula 11 Mitjana dels valors del sumatori dels àcids grassos procedents de la fracció dels triglicèrids del rovell d'ou (g/kg rovell). Per a cada grup, n = 10.	120

Taula 12 Mitjana dels valors del sumatori dels àcids grassos lliures del rovell d'ou (g/kg rovell). Per a cada grup, n = 10.	122
Taula 13 Mitjana dels valors del sumatori dels àcids grassos de la fracció dels fosfolípids del rovell de l'ou (g/kg rovell). Per a cada grup, n = 10.	124
Taula 14 Paràmetres d'avaluació del mètode (mitjana \pm desviació estàndard).	126
Taula 15 Mitjana dels valors de la concentració de colesterol en el rovell de l'ou (g/kg rovell).....	127
Taula 16 Mitjana dels valors de la concentració de l'àcid 5-MTHF segons el protocol 1 o 2. Per a cada protocol, n = 5.....	128
Taula 17 Paràmetres d'avaluació del mètode (mitjana \pm desviació estàndard).	129
Taula 18 Mitjana dels valors de la concentració de l'àcid 5-MTHF en el rovell d'ou (mg/kg rovell).	130
Taula 19 Optimització de les condicions de reconstitució de l'extracte de rovell d'ou.	132
Taula 20 Recuperació dels anàlits segons les condicions de reconstitució de l'extracte de rovell d'ou (mitjana \pm desviació estàndard).	133
Taula 21 Paràmetres d'avaluació del mètode per a cada anàlit (mitjana \pm desviació estàndard).	133
Taula 22 Mitjana dels valors de la concentració de retinol, luteïna, cantaxantina i α -tocoferol en el rovell d'ou (mg/kg rovell). Per a cada grup, n = 10.....	136

Taula 23 Resultats de l'oxidació lipídica segons el mètode de TBA no induït i induït (mitjana \pm desviació estàndard).	138
Taula 24 Paràmetres d'avaluació del mètode (mitjana \pm desviació estàndard).	139
Taula 25 Mitjana del valor de l'oxidació lipídica en el rovell d'ou (el valor de TBARS s'expressa en mmols d'equivalents de MDA/kg rovell d'ou). Per a cada grup, n = 10.	139
Taula 26 Comparació de la recuperació (%) i del coeficient de variació (%) entre les dues solucions d'extracció (mitjana \pm desviació estàndard).	142
Taula 27 Recuperació dels tres mètodes utilitzats per a l'extracció de la tilosina A en la clara d'ou (mitjana \pm desviació estàndard).	143
Taula 28 Paràmetres d'avaluació del mètode de les mostres de rovell d'ou (mitjana \pm desviació estàndard).	145
Taula 29 Paràmetres d'avaluació del mètode de les mostres de la clara d'ou (mitjana \pm desviació estàndard).	146
Taula 30 Concentració de doxiciclina en els rovells i en les clares dels ous de gallina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de mostra). Per a cada grup, n = 10.	146
Taula 31 Concentració de tilosina A en els rovells i en les clares dels ous de gallina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de mostra). Per a cada grup, n=10.	147
Taula 32 Efectes causats per l'administració de doxiciclina sobre els paràmetres de composició que s'han analitzat en els ous de gallina.	149
Taula 33 Efectes causats per l'administració de tilosina A sobre els paràmetres de composició que s'han analitzat en els ous de gallina.	150

Índex

1. Introducció	1
1.1 L'ou	2
1.1.1 Formació de l'ou de gallina	2
1.1.2 Valor nutritiu de l'ou de gallina.....	3
1.1.3 Producció i consum d'ous de gallina	6
1.1.4 Comercialització dels ous de gallina	6
1.2 Antibiòtics	8
1.2.1 Conseqüències de la utilització d'antibiòtics en sanitat animal..	9
1.2.1.1 Residus a la cadena alimentària	9
1.2.1.2 Resistència bacteriana.....	10
1.2.1.3 Afectació dels processos tecnològics.....	11
1.2.1.4 Introducció al medi ambient	12
1.2.2 Control dels antibiòtics	13
1.2.3 Contaminació creuada entre pinsos	16
1.2.4 Antibiòtics utilitzats en aquest estudi	17
1.2.4.1 Tilosina	18
1.2.4.2 Doxiciclina.....	20
1.2.5 Distribució dels antibiòtics en els ous de gallina	23
1.2.6 Mètodes analítics per a la determinació d'antibiòtics en ous de gallina.....	24
1.3 Efectes fisiològics dels antibiòtics usats.....	28
1.4 Principals constituents de l'ou de gallina	31
1.4.1 Proteïnes.....	32
1.4.1.1 Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi	32
1.4.2 Àcids grassos totals.....	34
1.4.2.1 Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi	35

1.4.3	Triglicèrids, àcids grassos lliures i fosfolípids.....	36
1.4.3.1	Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi.....	36
1.4.4	Colesterol.....	38
1.4.4.1	Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi.....	39
1.4.5	Àcid 5-metiltetrahidrofòlic	40
1.4.5.1	Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi.....	43
1.4.6	Carotenoides, α -tocoferol i retinol.....	44
1.4.6.1	Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi.....	47
1.4.7	Oxidació lipídica del rovell d'ou	48
1.4.7.1	Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi.....	48
2.	Objectius.....	51
3.	Material i mètodes	54
3.1	Obtenció de les mostres	55
3.2	Anàlisi de les proteïnes de la clara d'ou	58
3.2.1	Determinació de la proteïna en la clara d'ou (Bio-Rad)	58
3.2.1.1	Fonament.....	58
3.2.1.2	Reactius.....	59
3.2.1.3	Preparació de solucions.....	59
3.2.1.4	Solubilització de les proteïnes de la clara d'ou	59
3.2.1.5	Procediment experimental de l'assaig de Bio-Rad	59
3.2.1.6	Quantificació.....	60
3.2.2	Estudi del perfil proteic de la clara d'ou (Bioanalyser®)	60
3.2.2.1	Reactius.....	61
3.2.2.2	Preparació de solucions.....	61
3.2.2.3	Procediment experimental.....	61
3.3	Extracció dels lípids en el rovell d'ou	63
3.3.1	Reactius.....	63

3.3.2	Extracció	63
3.4	Determinació dels àcids grassos totals en el rovell d'ou	65
3.4.1	Reactius.....	65
3.4.2	Preparació de patrons.....	65
3.4.3	Procediment experimental	65
3.4.4	Condicions cromatogràfiques	66
3.4.5	Identificació i quantificació	66
3.5	Fraccionament lipídic	67
3.5.1	Reactius.....	67
3.5.2	Preparació de patrons.....	67
3.5.3	Procediment experimental	67
3.6	Caracterització dels triglicèrids en el rovell d'ou	69
3.6.1	Reactius.....	69
3.6.2	Preparació de patrons.....	69
3.6.3	Procediment experimental	69
3.6.4	Identificació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-MS	71
3.6.4.1	Preparació de patrons.....	71
3.6.4.2	Preparació de l'extracte.....	71
3.6.4.3	Condicions cromatogràfiques	71
3.6.4.4	Identificació	72
3.6.5	Determinació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-RI.....	73
3.6.5.1	Preparació de patrons.....	73
3.6.5.2	Preparació de l'extracte.....	73
3.6.5.3	Condicions cromatogràfiques	73
3.6.5.4	Identificació i quantificació	73
3.6.5.5	Límit de detecció i de quantificació.....	74
3.6.6	Determinació dels àcids grassos dels triglicèrids mitjançant la GC-FID	75

3.6.6.1	Preparació de l'extracte.....	75
3.6.6.2	Condicions cromatogràfiques.....	75
3.6.6.3	Identificació i quantificació.....	76
3.7	Determinació dels àcids grassos lliures en el rovell d'ou	77
3.7.1	Reactius.....	77
3.7.2	Procediment experimental.....	77
3.7.3	Condicions cromatogràfiques	77
3.7.4	Identificació i quantificació	78
3.8	Determinació dels àcids grassos de la fracció dels fosfolípids en el rovell d'ou.....	79
3.8.1	Reactius.....	79
3.8.2	Preparació de patrons	79
3.8.3	Procediment experimental.....	79
3.8.4	Condicions cromatogràfiques	80
3.8.5	Identificació i quantificació	80
3.9	Determinació del colesterol en el rovell d'ou	81
3.9.1	Reactius.....	81
3.9.2	Preparació de patrons.....	81
3.9.3	Extracció	81
3.9.4	Condicions cromatogràfiques	82
3.9.5	Identificació i quantificació	82
3.9.6	Recuperació del mètode.....	82
3.9.7	Repetibilitat del mètode	83
3.9.8	Exactitud del mètode.....	83
3.9.9	Límit de detecció i de quantificació.....	84
3.10	Determinació de l'àcid 5-mTHF en el rovell d'ou	85
3.10.1	Reactius.....	85
3.10.2	Preparació de patrons.....	85

3.10.3 Extracció	85
3.10.3.1 Protocol 1 (amb tractament enzimàtic)	86
3.10.3.2 Protocol 2 (sense tractament enzimàtic)	86
3.10.4 Purificació	86
3.10.5 Condicions cromatogràfiques	87
3.10.6 Identificació i quantificació	87
3.10.7 Recuperació del mètode	87
3.10.8 Repetibilitat del mètode	87
3.10.9 Exactitud del mètode	88
3.10.10 Límit de detecció i de quantificació	88
3.11 Determinació de carotenoides, α -tocoferol i retinol en el rovell d'ou	89
3.11.1 Reactius	89
3.11.2 Preparació de patrons	89
3.11.3 Extracció	89
3.11.4 Proves de reconstitució	90
3.11.5 Condicions cromatogràfiques	90
3.11.6 Identificació i quantificació	91
3.11.7 Recuperació del mètode	91
3.11.8 Repetibilitat del mètode	92
3.11.9 Exactitud del mètode	92
3.11.10 Límit de detecció i de quantificació	92
3.12 Determinació de l'oxidació lipídica en el rovell d'ou	93
3.12.1 Reactius	93
3.12.2 Determinació de l'oxidació lipídica del rovell d'ou mitjançant el test del TBA no induït	93
3.12.3 Determinació de l'oxidació lipídica del rovell d'ou mitjançant el test del TBA induït	93

3.12.4	Quantificació.....	94
3.12.5	Repetibilitat del mètode	94
3.13	Determinació dels residus de tilosina A i de doxiciclina en el rovell i la clara d'ou	95
3.13.1	Reactius.....	95
3.13.2	Preparació de patrons.....	95
3.13.3	Extracció de la doxiciclina en el rovell i en la clara d'ou i extracció de la tilosina A en el rovell d'ou	95
3.13.4	Extracció de la tilosina A en la clara de l'ou	96
3.13.4.1	Protocol 1	97
3.13.4.2	Protocol 2	97
3.13.4.3	Protocol 3	98
3.13.5	Condicions cromatogràfiques	98
3.13.6	Identificació i quantificació	99
3.13.7	Recuperació del mètode.....	99
3.13.8	Límit de detecció i de quantificació.....	100
3.14	Anàlisi Estadística.....	101
4.	Resultats i discussió	102
4.1	Anàlisi de les proteïnes de la clara d'ou	103
4.1.1	Determinació de la proteïna soluble de la clara d'ou (Bio-Rad)	103
4.1.1.1	Optimització del mètode d'anàlisi	103
4.1.1.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics.....	103
4.1.2	Estudi del perfil proteic de la clara d'ou (Bioanalyser®)	104
4.1.2.1	Optimització del mètode d'anàlisi	104
4.1.2.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics.....	105
4.1.3	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics.....	106
4.2	Determinació dels àcids grassos totals en el rovell d'ou	108

4.2.1	Optimització del mètode d'anàlisi	108
4.2.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics	108
4.3	Determinació dels triglicèrids en el rovell d'ou	113
4.3.1	Identificació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-MS	113
4.3.2	Determinació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-RI.....	116
4.3.2.1	Optimització del mètode d'anàlisi	116
4.3.2.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics.....	117
4.3.3	Determinació dels àcids grassos dels triglicèrids mitjançant la GC-FID	119
4.3.3.1	Optimització del mètode d'anàlisi	119
4.3.3.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics.....	120
4.4	Determinació dels àcids grassos lliures en el rovell d'ou.....	121
4.4.1	Optimització del mètode d'anàlisi	121
4.4.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics	122
4.5	Determinació dels àcids grassos de la fracció dels fosfolípids en el rovell d'ou.....	123
4.5.1	Optimització del mètode d'anàlisi	123
4.5.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics	124
4.6	Determinació del colesterol en el rovell d'ou.....	125
4.6.1	Optimització del mètode d'anàlisi	125
4.6.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics	126
4.7	Determinació de l'àcid 5-MTHF en el rovell d'ou.....	128
4.7.1	Optimització del mètode d'anàlisi	128
4.7.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics	130
4.8	Determinació de carotenoides, α -tocoferol i retinol en el rovell d'ou	132
4.8.1	Optimització del mètode d'anàlisi	132
4.8.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics	135

4.9	Determinació de l'oxidació lipídica en el rovell d'ou	137
4.9.1	Optimització del mètode d'anàlisi	137
4.9.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics.....	139
4.10	Determinació dels residus de tilosina A i de doxiciclina en el rovell i la clara de l'ou	141
4.10.1	Optimització del mètode d'anàlisi	141
4.10.2	Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics.....	146
4.11	Efectes globals sobre paràmetres de composició de l'ou	149
4.12	Identificació de possibles biomarcadors	153
5.	Conclusions	156
6.	Bibliografia.....	160

Resum

Els antibiòtics són substàncies àmpliament utilitzades en les explotacions ramaderes per tractar, de forma terapèutica, els animals amb malalties infeccioses. Per garantir que els productes alimentaris d'origen animal (ous, llet i carn) no contenen concentracions d'antibiòtics nocives per a la salut humana, existeix una legislació europea que estableix límits màxims residuals per a les substàncies farmacològicament actives en cadascun dels aliments d'origen animal (Reglament (UE) núm. 37/2010). D'altra banda, per evitar l'ús fraudulent dels antibiòtics al sector ramader s'ha creat un pla de vigilància europeu on es descriuen els controls analítics a realitzar (Directiva 96/23/CE). Tot i aquests controls, l'ús fraudulent i l'administració involuntària a través de la contaminació creuada dels pinsos representen, sens dubte, un tema d'interès pels possibles efectes negatius que aquesta administració pot suposar a la fisiologia dels animals i a la seguretat dels consumidors.

Els objectius principals d'aquest treball van ser estudiar l'efecte de l'administració de tilosina A i de doxiciclina en gallines ponedores sobre paràmetres nutricionals i de composició de l'ou durant el tractament antibiòtic i després d'un temps de retirada.

Per aquest estudi es van seleccionar dos antibiòtics bacteriostàtics, la tilosina i la doxiciclina. Tot i que l'administració de tilosina A està permesa en gallines ponedores, la doxiciclina no (Reglament (UE) núm. 37/2010). No obstant això, la doxiciclina es va escollir perquè està permesa en pollastres d'engreix i es pot produir una contaminació creuada entre un pinso medicat i un no medicat.

L'administració de la tilosina A es va dur a terme seguint les indicacions terapèutiques del medicament en gallines ponedores, mentre que l'administració de doxiciclina es va dur a terme reproduint el subministrament involuntari a causa de la contaminació creuada entre un pinso medicat i un de no medicat.

Cal destacar la falta d'informació prèvia, a nivell bibliogràfic, referent als efectes de l'administració de tilosina A i de doxiciclina sobre paràmetres nutricionals i de composició de l'ou de gallina. Per aquesta raó, es va incloure a l'estudi un elevat nombre de paràmetres de composició de l'ou.

Els resultats obtinguts en aquest estudi mostren que certs components de l'ou com les proteïnes, els àcids grassos lliures, els fosfolípids, l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic, el retinol, la luteïna, etc. no van patir canvis significatius, respecte les mostres control, com a conseqüència del tractament antibiòtic administrat a les gallines ponedores.

En els rovells dels ous procedents de les gallines tractades amb tilosina A i recollits en el mostreig previ al període de retirada es va produir un increment significatiu dels àcids grassos totals i dels àcids grassos saturats, comparat amb les mostres control. Altrament, en els rovells dels ous recollits després del període de retirada hi va haver una disminució de la concentració de l' α -tocoferol i un augment en la predisposició a l'oxidació lipídica (valors de TBARS), si es compara amb les mostres control.

L'administració de doxiciclina va provocar un increment significatiu, comparat amb les mostres control, de la concentració dels àcids grassos saturats, dels monoinsaturats, dels poliinsaturats, dels àcids grassos n-6, del triglicèrid POL, del colesterol i de la cantaxantina, en els rovells procedents dels ous recollits després del període de retirada. A més, tant en els rovells

dels ous recollits abans com després del període de retirada, es va observar una disminució significativa, respecte les mostres control, en la concentració de l' α -tocoferol i un increment significatiu dels àcids grassos totals, de la relació entre els àcids grassos n-6 i n-3 i dels valors de TBARS, comparat amb les mostres control.

L'avaluació de les dades mitjançant l'anàlisi de components principals (PCA) va indicar que alguns constituents relacionats amb la fracció lipídica del rovell de l'ou podrien ser utilitzats com a potencials biomarcadors del tractament amb doxiciclina. Tot i aquests resultats preliminars, que s'haurien de confirmar amb estudis més exhaustius, sembla que aquests biomarcadors podrien proporcionar una informació complementària per a detectar pràctiques fraudulentes en l'ús de tilosina A i de doxiciclina en gallines ponedores.

Resumen

Los antibióticos son sustancias ampliamente utilizadas en las explotaciones ganaderas para tratar, de forma terapéutica, los animales con enfermedades infecciosas. Para garantizar que los productos alimentarios de origen animal (huevos, leche y carne) no contengan concentraciones de antibióticos nocivas para la salud humana, existe una legislación europea que establece límites máximos residuales para las sustancias farmacológicamente activas en cada uno de los alimentos de origen animal (Reglamento (UE) núm. 37/2010). Por otra parte, para evitar el uso fraudulento de los antibióticos en el sector ganadero se ha creado un plan de vigilancia europeo en el cual se describen los controles analíticos a realizar (Directiva 96/23/CE). A pesar de estos controles, el uso fraudulento y la administración involuntaria mediante la contaminación cruzada de los piensos representan, sin duda, un tema de interés para los posibles efectos negativos que esta administración puede suponer a la fisiología de los animales y a la seguridad de los consumidores.

Los objetivos principales de este trabajo fueron estudiar el efecto de la administración de tilosina A y de doxiciclina en gallinas ponedoras sobre parámetros nutricionales y de composición del huevo durante el tratamiento antibiótico y después de un tiempo de retirada.

Para este estudio se seleccionaron dos antibióticos bacteriostáticos, la tilosina y la doxiciclina. Aunque la administración de tilosina A está permitida en gallinas ponedoras, la doxiciclina no (Reglamento (UE) núm. 37/2010). No obstante, la doxiciclina se escogió porque está permitida en pollos de engorde y se puede producir una contaminación cruzada ente un pienso medicado y uno de no medicado.

La administración de la tilosina A se realizó mediante las indicaciones terapéuticas del medicamento en gallinas ponedoras, mientras que la administración de doxiciclina se produjo reproduciendo el suministro involuntario a causa de la contaminación cruzada entre un pienso medicado y uno de no medicado.

Cabe señalar la falta de información previa, a nivel bibliográfico, referente a los efectos de la administración de tilosina A y de doxiciclina sobre parámetros nutricionales y de composición del huevo de gallina. Por esta razón, en el estudio se incluyeron un elevado número de parámetros de composición del huevo.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que ciertos componentes del huevo como las proteínas, los ácidos grasos libres, los fosfolípidos, el ácido 5-metiltetrahidrofólico, el retinol, la luteína, etc. no sufrieron cambios significativos, respecto a las muestras control, como consecuencia del tratamiento antibiótico administrado a las gallinas ponedoras.

En las yemas de los huevos procedentes de las gallinas tratadas con tilosina A y recogidas en el muestreo previo al período de retirada se produjo un incremento significativo de los ácidos grasos totales y de los ácidos grasos saturados, comparado con las muestras control. Al mismo tiempo, en las yemas de los huevos recogidos después del período de retirada hubo una disminución de la concentración del α -tocoferol y un aumento en la predisposición a la oxidación lipídica (valores de TBARS), si se compara con las muestras control.

La administración de doxiciclina provocó un incremento significativo, comparado con las muestras control, de la concentración de los ácidos

grasos saturados, de los monoinsaturados, de los poliinsaturados, de los ácidos grasos n-6, del triglicérido POL, del colesterol y de la cantaxantina, en las yemas procedentes de los huevos recogidos después del período de retirada. Además, tanto en las yemas de los huevos recogidos antes como después del período de retirada, se observó una disminución significativa, respecto las muestras control, de la concentración del α -tocoferol y un incremento significativo de los ácidos grasos totales, de la relación entre los ácidos grasos n-6 y n-3 y de los valores de TBARS, comparado con las muestras control.

La evaluación de los datos mediante el análisis de componentes principales (PCA) indicó que algunos constituyentes relacionados con la fracción lipídica de la yema de huevo podrían ser utilizados como potenciales biomarcadores del tratamiento con doxiciclina. Según estos resultados preliminares, aunque se tendrían que confirmar con estudios más exhaustivos, parece que estos biomarcadores podrían proporcionar una información complementaria para detectar prácticas fraudulentas con el uso de tilosina A y de doxiciclina en gallinas ponedoras.

Abstract

Antibiotics are widely used in farms to therapeutically treat animals with infectious diseases. A European legislation which establishes Maximum Residue Limits for pharmacologically active substances in food from animal origin (Regulation (EU) No 37/2010) was promulgated to guarantee that foodstuffs of animal origin (eggs, milk and meat) don't contain harmful concentrations of antibiotics for the human health.

Furthermore, a European residue monitoring plan which establishes the control measures to be applied has been designed to avoid fraudulent antibiotics use in animal farms (Directive 96/23/EC). However, fraudulent use and involuntary administration as a consequence of cross contamination from feed are important topics due to possible negative effects that this administration can cause to the animals' physiology and consumers' safety.

The aim of the present work was to study the effects of tylosin A and doxycycline administration to laying hens on egg nutritional and compositional parameters during antibiotic treatment and after a withdrawal period.

For this work, two bacteriostatic antibiotics were used, tylosin A and doxycycline. Although tylosin A administration is allowed in laying hens, doxycycline is banned (Regulation (EU) No 37/2010). However, doxycycline was selected because it is authorized for use in poultry and there could be cross contamination from medicated to unmedicated feed.

Tylosin A administration was performed to laying hens following therapeutic recommendations, whereas the administration of doxycycline was performed as an involuntary administration as a consequence of cross contamination from medicated feed to unmedicated feed.

It's worth mentioning the lack of scientific literature, regarding the effects of tylosin A and doxycycline administration to laying hens on egg nutritional and compositional parameters. For this reason, a high number of egg compositional parameters were included in the study.

The results obtained in this work showed that some components of egg such as proteins, free fatty acids, phospholipids, 5-methyltetrahydrofolate acid, retinol, lutein, among others, weren't affected by antibiotic treatment in comparison to control samples.

Yolks from laying hens treated with tylosin A and collected before the withdrawal period suffered a significant increment of total fatty acids and saturated fatty acids, if compared with control samples. Moreover, in egg yolks collected after the withdrawal period, α -tocopherol content decreased and TBARS values increased, which raised the sensitivity of lipid oxidation, if compared to the control samples.

Doxycycline administration caused a significant increment, if compared to the control samples, of the levels of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, n-6 fatty acids, triacylglycerol POL, cholesterol and canthaxanthin, in the egg yolks collected after the withdrawal period. Moreover, in egg yolks collected before and after the withdrawal period, α -tocopherol content was reduced, in comparison to control samples, and total fatty acids, the ratio n-6 / n-3 fatty acids and TBARS values increased, if compared to the control samples.

The evaluation of the principal component analysis (PCA) showed that some egg yolk components related to the lipid fraction could be used as potential biomarkers of doxycycline treatment. In spite of these preliminary results which should be confirmed with exhaustive studies, these

biomarkers could provide complementary information to detect fraudulent practice on tylosin A and doxycycline administration to laying hens.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 L'OU

L'ou és un ingredient bàsic i habitual en l'alimentació humana que posseeix un alt contingut en nutrients. Al ser un aliment fàcilment digerible, molt versàtil gastronòmicament i poc calòric, és molt recomanable incloure'l a qualsevol dieta, inclús en ancians, infants, vegetarians, gestants o malalts. A més, l'ou té una gran capacitat saciable sent un aliment d'interès en les dietes preparades per perdre pes.

1.1.1 Formació de l'ou de gallina

La formació de l'ou és un procés complex que requereix una bona alimentació, un bon confort ambiental i un bon estat sanitari de la gallina. Qualsevol situació que alteri aquestes condicions provocarà un descens de la producció i de la qualitat de l'ou.

El procés de formació de l'ou està regulat per diverses hormones (estrògens, andrògens i progesterona) que se sintetitzen a l'ovari, però que estan controlades per la hipòfisis.

Des que la gallina neix, els rovells van patint diferents fases de creixement fins que arriben a fer uns 35 mm de diàmetre (20 grams). Durant aquest creixement es van dipositant capes de rovell, una sobre les altres, que s'uneixen mitjançant una membrana trilaminar. També té lloc l'acumulació de nutrients com ara lípids, lipoproteïnes, pigments i minerals. L'origen d'aquests nutrients pot ser la ingesta a través de l'alimentació o la síntesis endògena. La majoria dels compostos d'origen endogen es formen al fetge, on l'activitat lipogènica es multiplica per 10 quan la gallina arriba a la maduresa sexual, i són transportats fins al rovell mitjançant el reg sanguini

(Barroeta, 2002; Perry & Gibert, 1985). Dins l'ovari hi solen haver vuit rovells en l'última fase de creixement que es troben desfasats un dia, per permetre que la gallina pugui pondre un ou diari (Sauveur, 1993 a).

Després que el rovell hagi arribat a les condicions òptimes per a l'ovulació, la membrana fol·licular es trenca i el rovell s'allibera de l'ovari per iniciar el seu recorregut per l'oviducte. Aquest conducte està dividit en cinc zones (Instituto de Estudios del Huevo, 2009):

- El infundíbul: el rovell es recobreix per la membrana vitel·lina i és aquí on es pot produir la fecundació de l'ou.
- El magne: es diposita una capa de clara densa i molt concentrada.
- L'istme: formació de les membranes testàcies.
- L'úter: hidratació de la clara i formació de la closca.
- La vagina: posta de l'ou.

Les proteïnes que es localitzen a la clara, es formen i es segreguen en el magne, a diferència de les que constitueixen el rovell que es sintetitzen al fetge (Barroeta, 2002).

1.1.2 Valor nutritiu de l'ou de gallina

La composició proteica de l'ou és considerada d'elevat valor biològic ja que conté una gran quantitat d'aminoàcids essencials molt importants per la salut humana. Les proteïnes de l'ou es troben repartides entre la clara (11 %) i el rovell (16 %).

A l'ou també s'hi troben quantitats abundants de vitamines, ja siguin liposolubles o hidrosolubles. Les liposolubles (A, E, D, K) es troben exclusivament en el rovell, en canvi les hidrosolubles (grup de les vitamines B) es troben repartides entre el rovell i la clara de l'ou. L'aportació de vitamina D és molt valuosa ja que és una vitamina poc present a la majoria dels aliments (Barroeta, 2008; Instituto de Estudios del Huevo, 2009; Li-Chan et al., 1995; Li-Chan & Kim, 2008; Ortega, 2002; Sauveur, 1993 b).

El color del rovell de l'ou ve determinat per la composició i la concentració de carotenoides, bàsicament per la luteïna i la zeaxantina. Com a conseqüència de que la gallina no pot sintetitzar aquests compostos, el seu contingut i la seva composició en l'ou dependrà de la seva dieta.

L'ou és una font important de seleni assimilable. Aquest oligoelement és un antioxidant que té efectes beneficiosos sobre la salut humana, ja que se l'ha vinculat amb la prevenció d'alguns càncers i de l'estrès oxidatiu (Tortuero, 2002). A més d'aquest mineral, l'ou també conté fòsfor, potassi, ferro, calci i zinc.

La fracció lipídica de l'ou es concentra principalment en el rovell (26 %) i està formada, majoritàriament, per triglicèrids (66 %), fosfolípids (28 %) i colesterol (4-5 %). Els àcids grassos que predominen són els insaturats, ja siguin monoinsaturats (38-49 %) o poliinsaturats (18-20 %), respecte dels saturats (32-35 %) (Cherian et al., 2002; Simcic et al., 2011; Szymczyk & Pisulewski, 2003). L'ou també conté una gran quantitat de fosfatidilcolina que aporta colina a l'organisme (Zeisel & Da Costa, 2009; Zeisel et al., 1995).

La composició nutricional de l'ou depèn de l'espècie, de l'edat i de la dieta de la gallina. El pinso de les gallines ponedores està compost per una barreja de cereals (blat de moro, blat, ordi, etc.) i additius. Sovint, les dietes són adaptades a l'edat i a les necessitats de la gallina (Instituto de Estudios del Huevo, 2009; Sauveur, 1993 c; Watkins, 1995).

Des de fa uns anys, la població té molt en compte els aspectes nutricionals dels aliments juntament amb els seus efectes sobre la salut humana. Per aquest motiu, s'han realitzat estudis on a través de la nutrició animal s'ha millorat la qualitat nutricional de l'ou, sense perjudicar el benestar de les gallines ponedores ni la producció d'ous. Per exemple, alguns treballs van observar un augment de la concentració de folats en el rovell de l'ou quan el pinso era enriquit amb àcid fòlic, encara que al·l'addicionar més de 4 mg d'àcid fòlic/kg de pinso la concentració de folats en l'ou gairebé no augmentava (Hebert et al., 2005; House et al., 2002). D'altres autors han augmentat la concentració dels àcids grassos omega 3 i omega 6 mitjançant l'addició d'olis vegetal o de peix en el pinso. El fet d'enriquir els ous amb àcids grassos poliinsaturats provoca que siguin més fàcilment oxidables i és per aquest motiu que l'enriquiment ha d'anar acompanyat d'un suplement alimentari antioxidant com l' α -tocoferol, l'àcid gàl·lic, el seleni, entre d'altres (Cherian et al., 2007; Galobart et al., 2001 a; Grune et al., 2001; Jung et al., 2011; Ren et al., 2013). D'altra banda, per incrementar el contingut de carotenoides, de retinol i d' α -tocoferol en el rovell de l'ou, es poden enriquir els pinsos amb luteïna, acetat de retinol, acetat d' α -tocoferol, entre d'altres o bé amb productes naturals com les pastanagues, les tomates i la userda (Hammershoj et al., 2010; Karadas et al., 2006; Leeson & Caston, 2004; Mohiti-Asli et al., 2008; Mori et al., 2003; Surai et al., 1998).

1.1.3 Producció i consum d'ous de gallina

L'any 2012 la producció mundial d'ous va ser de 66.372.549 tones, de les quals el principal país productor va ser la Xina (37 %) seguit dels Estats Units (8 %). Dins la Unió Europea, els principals països productors van ser França i Alemanya amb un 13,4 % i un 12,3 %, respectivament. A Espanya, les comunitats autònomes amb una major producció, durant l'any 2013, van ser Castella La Manxa (26,2 %) seguida per Castella i Lleó (17,2 %), mentre que a Catalunya la província on es van produir més ous de gallina pel consum humà va ser Lleida (44 %). L'any 2013 Espanya va produir 805.000 tones d'ous, de les quals se'n van exportar 141.741 tones a la Unió Europea, majoritàriament a França, Itàlia, Portugal i el Regne Unit, i 12.527 tones a altres països extracomunitaris com Angola, Mauritània i Líbia. D'altra banda, l'any 2013 es van importar a Espanya 39.922 tones provinents de la Unió Europea i 775 d'altres països extracomunitaris (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014 a; IDESCAT, 2014; FAOSTAT database, 2014).

Referent a l'ús final dels ous produïts a Espanya, les dades mostren que principalment la producció interna va destinada al consum humà (95,6 %), però també n'hi ha una part que es destina a la incubació (3,6 %) i una altra a usos industrials (0,8 %) (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014 a).

1.1.4 Comercialització dels ous de gallina

La comercialització dels ous està regulada per una legislació comuna a tota la Unió Europea que defineix les característiques de la cria de les gallines ponedores, les condicions que han de complir els ous per ser aptes

pel consum humà, les condicions d'emmagatzematge, transport i etiquetatge, les condicions d'exportacions, les retribucions, entre d'altres (Reglament (CE) núm. 1234/2007 del Consell; Reglament (CE) núm. 589/2008 de la Comissió; Directiva 2002/4/CE de la Comissió).

1.2 ANTIBIÒTICS

A les explotacions ramaderes els antibiòtics veterinaris són àmpliament utilitzats de forma terapèutica per tractar els animals de malalties infeccioses.

Per evitar l'ús fraudulent dels antibiòtics existeix una legislació harmonitzada dins la Unió Europea on s'estableixen procediments comunitaris sobre l'autorització i el control dels medicaments veterinaris.

A la Directiva 2001/82/CE del Parlament Europeu i del Consell i en el Reglament (CE) núm. 726/2004 del Parlament Europeu i del Consell s'han fixat els protocols a seguir i la documentació a presentar per obtenir l'autorització per fabricar, comercialitzar i emmagatzemar medicaments veterinaris.

Per garantir que els productes alimentaris d'origen animal (ous, llet i carn) no contenen concentracions d'antibiòtics nocives per a la salut humana, el Reglament (UE) núm. 37/2010 de la Comissió estableix uns límits màxims residuals, LMR, per a les substàncies farmacològicament actives o pels seus metabòlits. Els LMR es fixen per a cada residu marcador, tenint en compte l'espècie animal i el teixit diana. Per exemple, la tilosina té com a residu marcador la tilosina A, amb un LMR de 200 µg/kg en ou de gallina i un de 50 µg/kg en llet de vaca.

Després d'un tractament farmacològic els animals s'han de sotmetre a un període de retirada. Aquest període és definit a la Directiva 2001/82/CE com el temps que ha de transcorre des de l'última dosi de fàrmac administrada al animal fins que la concentració d'antibiòtic és inferior al LMR. A partir d'aquest moment, tant l'animal com els productes alimentaris que se'n deriven es podran utilitzar pel consum humà. Aquest

temps d'espera es determina en funció de la farmacocinètica del fàrmac a l'espècie animal o al teixit diana d'estudi. Com més ràpid s'elimini el medicament de l'animal, més curt serà el temps de retirada.

Qualsevol medicament veterinari que contingui una substància farmacològicament activa que no es trobi mencionada en el quadre de substàncies autoritzades de l'annex del Reglament (UE) núm. 37/2010 no estarà permès dins la Comunitat Europea.

1.2.1 Conseqüències de la utilització d'antibiòtics en sanitat animal

Els ramaders subministren antibiòtics als animals malalts per evitar pèrdues econòmiques causades per la mort d'aquests. Administrar un antibiòtic a un animal no és un fet aïllat, sinó que se'n desencadenen una sèrie de conseqüències ja que una part del fàrmac s'acumula als teixits de l'animal, mentre que una altra part és excretada per la orina i/o les femtes.

1.2.1.1 Residus a la cadena alimentària

Quan s'administra un antibiòtic a un animal d'abast, la substància farmacològica activa o algun dels seus metabòlits es pot acumular en els teixits, la llet i els ous. És per això que la Comissió Europea, mitjançant els LMR i els temps de retirada, vetlla per evitar que productes d'origen animal continguin residus d'antibiòtics no permesos o amb concentracions superiors al LMR. Aliments amb nivells d'antibiòtic superiors al LMR poden provocar reaccions al·lèrgiques a persones hipersensibles, efectes crònics a causa de l'exposició continuada a dosis baixes d'antibiòtic, així

com el desenvolupament de bacteris resistents als antibiòtics (Passantino & Russo, 2008).

1.2.1.2 Resistència bacteriana

La resistència bacteriana és un mecanisme en el qual una soca bacteriana perd la sensibilitat a un determinat antibiòtic que abans era eficaç contra aquesta. La problemàtica vers la resistència bacteriana es va iniciar el 1960 quan el Comitè Swann va observar que els microorganismes d'origen animal resistents als antimicrobians es podien transmetre a l'organisme humà, la qual cosa podia crear un risc per a la societat (Barton, 2000; Swann, 1969). Alguns dels microorganismes que han desenvolupat resistència són *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Enterococcus* i *Staphylococcus* (McDermott et al., 2002).

La transferència de la resistència bacteriana es pot realitzar a través de la ingesta d'aliments d'origen animal, de l'aigua de beguda, per contacte directe o a través del medi ambient. Quan es consumeix un aliment contaminat amb bacteris resistents, aquests es poden allotjar a l'intestí de les persones i transferir els gens vinculats a la resistència contra els antibiòtics a altres bacteris o patògens de l'organisme humà (Aarestrup et al., 2008; European Food Safety Authority, 2010; Nunnery et al., 2006).

Fins fa uns anys, les explotacions ramaderes administraven els antibiòtics a dosis sub-terapèutiques per prevenir malalties infeccioses i per reduir el temps de creixement dels animals. No obstant això, per disminuir el desenvolupament de la resistència bacteriana la Unió Europea va prohibir la utilització dels antimicrobians com a additius en alimentació animal i com a promotors del creixement (Reglament (CE) núm. 1831/2003 del

Parlament Europeu i del Consell). Actualment només es poden utilitzar per a fins terapèutics. A més, la Unió Europea va aprovar la Directiva 2003/99/CE del Parlament Europeu i del Consell sobre la vigilància de la zoonosi i dels agents zoonòtics per assegurar el control de la resistència associada als antimicrobians, així com els brots de malalties transmises a través dels aliments. D'aquesta manera, poden avaluar les tendències i les fonts pertinents.

D'altra banda, en un estudi anomenat DANMAP 2001, que es va realitzar a Dinamarca un any més tard de la prohibició dels antimicrobians com a promotors del creixement, es va observar que *Salmonella* spp. havia augmentat la seva resistència vers les tetraciclins i les sulfonamides. Una possible explicació pot ser que abans del Reglament (CE) núm. 1831/2003 els ramaders administraven antibiòtics a dosis sub-terapèutiques per evitar malalties infeccioses als animals de l'explotació en canvi, actualment s'inicia el tractament farmacològic quan s'ha diagnosticat la malaltia infecciosa i s'administren dosis terapèutiques. Si en una explotació el nombre de malalties infeccioses és abundant hi haurà un increment en les dosis d'antibiòtic administrades, la qual cosa pot provocar un augment de la resistència bacteriana.

1.2.1.3 *Afectació dels processos tecnològics*

La presència d'antibiòtics en matèries primeres, d'origen animal, utilitzades en processos tecnològics poden provocar dificultats en el desenvolupament dels microorganismes en els aliments fermentats. Un dels casos més estudiats és la inhibició o l'alteració dels cultius iniciadors de les

fermentacions en l'elaboració del iogurt i/o del formatge (Cogan, 1972; Grunwald & Petz, 2003; Kjeldgaard et al., 2012).

1.2.1.4 Introducció al medi ambient

Quan un animal es sotmet a un tractament antibiòtic, una part del medicament és adsorbit pel seu intestí, però un percentatge de la dosis administrada és excretat per la orina i les femtes, ja sigui en forma del compost inicial o d'un metabòlit (Kim et al., 2011; Sarmah et al., 2006; Thiele-Bruhn, 2003).

Existeixen diverses vies per on els residus farmacològics poden arribar al medi ambient. D'una banda, la orina juntament amb els excrements dels animals poden ser utilitzats com a adob en les plantacions agrícoles. Si aquests fems estan contaminats amb residus farmacològics poden contaminar el sòl on s'han abocat i a la vegada les plantes cultivades (Aust et al., 2008; Boxall et al., 2006; Kumar et al., 2005 a; Szatmari et al., 2011). Per reduir la concentració d'antibiòtics en fems es poden utilitzar tècniques com el compostatge, la fermentació, sistemes anaeròbics o aeròbics que treballen en medi biòtic o abiòtic, etc., segons el tipus d'antibiòtic que s'hagi d'eliminar (Dolliver et al., 2008; Kolz et al., 2005; Motoyama et al., 2011).

Quan plou o es reguen els conreus que han estat fertilitzats amb fems contaminats, les restes d'antibiòtics es poden filtrar i ser transportades fins a aigües subterrànies o superficials que poden anar a desembocar en rius, llacs o mars, però també poden contaminar sediments i aqüífers (Blackwell et al., 2009; Kay et al., 2005; Kumar et al., 2005 b).

Una de les problemàtiques de que els residus antibiòtics arribin al medi ambient és que poden provocar que els microorganismes desenvolupin resistència vers aquests medicaments i afectar la salut humana i la dels animals (Hoa et al., 2011; Kemper, 2008).

1.2.2 Control dels antibiòtics

Per evitar l'ús fraudulent d'antibiòtics al sector ramader és necessari realitzar controls analítics sobre un determinat nombre de mostres i així poder garantir que els productes alimentaris d'origen animal que arriben als consumidors no presenten contaminacions de residus de medicaments veterinaris. El Consell Europeu va aprovar la Directiva 96/23/CE del Consell on obliga a cada Estat membre a elaborar i a executar un pla de vigilància per a la detecció de les substàncies i dels residus de medicaments veterinaris anomenats a l'annex I de la Directiva. Aquest pla de vigilància s'aplica en animals vius, en els seus excrements i líquids biològics, en pinsos i en aigua de beguda, així com en els teixits i en els productes derivats dels animals destinats al consum humà. A l'annex II d'aquesta Directiva es descriuen les famílies de compostos que cal fer un seguiment en les mostres d'ous de gallina (**taula 1**).

Per a dur a terme l'execució del pla de vigilància, dins de cada Estat membre s'ha creat un òrgan de coordinació per reunir i transmetre les dades i els resultats obtinguts en el pla de vigilància a la Comissió Europea, així com vetllar pel compliment i la millora de l'eficàcia del pla. A l'Estat Espanyol aquest pla de vigilància s'anomena *Plan Nacional de Investigación de Residuos*.

Taula 1 Grups de compostos que cal controlar en les mostres d'ou de gallina, segons l'annex I i II de la Directiva 96/23/CE del Consell Europeu.

<p>Grup A: Substàncies amb efecte anabolitzant i substàncies no autoritzades.</p> <p><i>Grup A6:</i> Substàncies incloses a l'annex IV del Reglament (CEE) núm. 2377/90 del Consell.</p>
<p>Grup B: Medicaments veterinaris¹ i contaminants.</p> <p><i>Grup B1:</i> Substàncies antibacterianes, incloses les sulfamides i les quinolones.</p> <p><i>Grup B2:</i> Altres medicaments veterinaris.</p> <p><i>Grup B2b:</i> Anticoccidians, inclosos els nitroimidazols.</p> <p><i>Grup B3:</i> Altres substàncies i contaminants mediambientals.</p> <p><i>Grup B3a:</i> Compostos organoclorats, inclosos els PCB (Bifenils Policlorats).</p>

Els animals i els productes destinats al consum humà que provenen de països tercers també seran objecte de controls rutinaris per assegurar que no s'hagin utilitzat substàncies no autoritzades o que se superin els límits màxims residuals permesos.

Anualment la Comissió Europea crea un document on es recullen totes les dades i resultats dels plans de vigilància enviats per cada Estat membre. En aquest document es contemplen les mostres i els resultats no conformes obtinguts en productes d'origen animal. Segons aquest document, l'any 2012 es van produir 6.070.174 tones d'ous de gallina dins la Unió Europea, dels quals se'n van analitzar 12.596, és a dir, 2,1 mostres per cada 1.000 tones. Després de realitzar les anàlisis es van detectar un 0,18 % de mostres no conformes, de les quals el 57 %, el 26 % i el 17 % contenien substàncies del grup B2b, B3a i B1, respectivament (European Commission 2012).

¹ Incloses les substàncies no registrades que podrien utilitzar-se a efectes veterinaris.

Els resultats observats en les memòries anuals que va realitzar la Unió Europea durant els anys 2007, 2008, 2009, 2011 i 2012 mostren que la majoria de mostres no conformes en ous de gallina pertanyen al grup B2 i en menys quantitat al grup B3a (European Commission 2008, 2010 a, 2010 b, 2011, 2012, 2013). Aquest fet pot ser a causa que els coccidiostàtics estan permesos com a additius en pinsos de pollastres d'engreix, mentre que estan prohibits en els destinats a gallines ponedores (Comunicació de la Comissió 2004/C 50/01). Per tant, pot aparèixer una contaminació creuada entre els pinsos utilitzats pels pollastres i les gallines ponedores.

El Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient de l'Estat Espanyol i l'Agència de Salut Pública de Catalunya també realitzen un informe anual amb els resultats obtinguts en els plans de vigilància de residus. A l'Estat Espanyol l'any 2014 es van analitzar 770 mostres d'ous de gallina, de les quals no es va trobar cap mostra no conforme (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014 b). Respecte a Catalunya, l'any 2013 es van analitzar 103 mostres d'ous de gallina de les quals es va detectar un 1,0 % de mostres no conformes, corresponents al grup B1 (Generalitat de Catalunya, 2014).

Els mètodes utilitzats per a l'anàlisi de mostres oficials han de ser mètodes de referència o mètodes validats segons la Decisió de la Comissió 2002/657/CE. Els laboratoris nacionals de rutina treballen amb una gran quantitat de mostres i una gran varietat d'anàlits que sovint han de ser analitzats en un breu període de temps. A causa d'aquests requeriments, les mostres s'analitzen mitjançant un mètode de cribratge, que permet discriminar les mostres negatives de les que presenten un possible resultat positiu, i només les possibles mostres no conformes són analitzades amb un

mètode confirmatori. Les mostres són no conformes quan l'anàlisi confirmatori ho corrobora.

1.2.3 Contaminació creuada entre pinsos

Les indústries dedicades a la fabricació de pinsos solen utilitzar la mateixa línia de producció per elaborar-ne de diferents tipus. Treballar d'aquesta manera pot provocar que restes de substàncies usades en un pinso quedin dins el sistema de producció i es transfereixin en els primers lots del següent producte fabricat. Aquest fenomen s'anomena contaminació creuada i és complicat evitar-lo. Un dels principals problemes d'aquesta transferència apareix quan els pinsos no medicats contenen traces de substàncies farmacològicament actives, ja que la seva fabricació s'ha realitzat després de l'elaboració d'un pinso medicat (pinso prescrit per un veterinari que conté una substància farmacològicament activa, utilitzat amb finalitats terapèutiques) o d'un pinso que conté additius del tipus coccidiostàtics i histomonòstats (avui en dia són les úniques substàncies farmacològicament actives permeses com a additius en alimentació animal) (Reglament (CE) núm. 1831/2003). A la Directiva 2002/32/CE del Parlament Europeu i del Consell, s'estableixen els límits màxims inevitables de coccidiostàtics i histomonòstats en pinsos com a conseqüència de la contaminació creuada. Aquesta contaminació, a part de produir-se en la línia de producció també es pot dur a terme en el processat, l'emmagatzematge i el transport dels pinsos (Reglament (CE) núm. 124/2009 de la Comissió).

A causa de la contaminació creuada, animals destinats a l'elaboració de productes alimentaris pel consum humà poden estar contaminats sense que

el ramader en tingui constància i provocar que es comercialitzin aliments com carn, llet i ous amb traces de residus de medicaments o amb substàncies no permeses en aquestes matrius (Kennedy et al., 1996).

Vandenberg, Delezie, Delahaut et al. (2012 a) i Vandenberg, Delezie, Huyghebaert et al. (2012 b) van comprovar que si s'administrava una dosis de tilosina A i de doxiciclina a les gallines ponedores, corresponent a la concentració de contaminació creuada del 2,5 %, 5 % i 10 %, la tilosina A no es detectava en els ous mentre que la doxiciclina es va detectar tant a la clara com al rovell de l'ou al cap de 13 dies de tractament. Així doncs, segons les propietats i la farmacocinètica de cada substància, aquestes molècules es retindran més o menys en les línies de producció i s'eliminaran més o menys fàcilment dels teixits dels animals. Tot i això, segons la Unió Europea els efectes que els aliments contaminats poden provocar a la població a causa de la contaminació creuada entre pinsos, són pràcticament nuls (Reglament (CE) núm. 124/2009).

Per minimitzar la contaminació creuada entre pinsos es podrien realitzar algunes accions com netejar el sistema, elaborar primer els pinsos amb concentració més elevada de medicament i acabar amb la producció dels pinsos de més baixa concentració de medicament o utilitzar una substància que no contingui additius per adsorbir les restes de residus que queden al sistema de producció abans de la nova elaboració (Borras et al., 2011).

1.2.4 Antibiòtics utilitzats en aquest estudi

Els antibiòtics utilitzats en aquest estudi han estat la tilosina i la doxiciclina.

1.2.4.1 Tilosina

La tilosina és un antibiòtic que pertany a la família dels macròlids, produïda pel bacteri *Streptomyces fradiae*. Va ser descoberta l'any 1960 en un sòl de Tailàndia per McGuire i els seus companys (McGuire et al., 1961).

La seva estructura química consta d'un anell de lactona format per 16 àtoms de carboni, on a la posició 5 hi ha un disacàrid compost per una unitat de micaminosa i una altra de micarosa, mentre que a la posició 14 hi ha un monosacàrid, la micinosa (**figura 1**). La seva fórmula molecular és $C_{46}H_{77}NO_{17}$ amb una massa molecular de 916,1 g/mol. D'altra banda, la tilosina és una base dèbil, $pK_a = 7,7$, amb caràcter liposoluble. La seva estabilitat es troba entre pH 4-9 (Burrows, 1980; Lewicki, 2006; McFarland et al, 1997).

Aquest antibiòtic està format per quatre formes diferents de les quals el component principal i el de major activitat és la tilosina A (tilosina). La resta de formes són la tilosina B (desmicosina), la tilosina C (macrocina) i la tilosina D (relomicina), amb una activitat microbiològica respecte la tilosina A del 83 %, 75 % i 35 %, respectivament (Teeter & Meyerhoff, 2003). A causa que la tilosina A té una activitat microbiològica major que les altres formes, el Comitè de Medicaments Veterinaris va determinar la tilosina A com a marcador de la tilosina (EMEA/MRL/205/97-FINAL, 1997).

A part dels quatre compostos que formen la tilosina, s'han trobat impureses relacionades amb la seva síntesi, mitjançant la fermentació, com la 5-O-micaminosiltilonolide, la demicinosiltilosina, la lactenocina, la 20-dihidrotilosina B. A més, segons les condicions en què es troba la tilosina A poden afavorir-se processos de degradació. Per exemple, en

la seva unió amb la subunitat 50S del ribosoma del bacteri. La inhibició de la peptidil transferasa és a causa de l'estructura química de la tilosina ja que a la posició 5 de l'anell de 16 carbonis hi ha un disacàrid que conté micarosa (Lewicki, 2006; Poehlsgaard & Douthwaite, 2005; Poulsen et al., 2000; TOXNET data base, 2014, CASRN: 1401-69-0).

Avui en dia, aquest antibiòtic s'utilitza per a usos veterinaris amb finalitats terapèutiques. La seva administració està permesa en gallines ponedores i s'usa contra la sinovitis infecciosa, l'enteritis necròtica i algunes malalties respiratòries. En el cas dels ous de gallina es va establir un LMR = 200 µg/kg (EMEA/MRL/732/00-FINAL, 2000; Reglament (CE) núm. 37/2010).

1.2.4.2 Doxiciclina

La doxiciclina és un antibiòtic que pertany a la família de les tetraciclines. A diferència de la clortetraciclina, de l'oxitetraciclina i de la tetraciclina que es sintetitzen en els bacteris *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus* i *Streptomyces aureofaciens*, respectivament, la doxiciclina és semisintètica. A la bibliografia existeixen diversos estudis sobre la seva síntesi (Charest et al., 2005; Myers et al., 2010; Sun et al., 2008).

L'estructura de la doxiciclina (**figura 2**) és molt semblant a l'estructura de la tetraciclina, la qual està formada per quatre anells de 6 carbonis en línia. La principal diferència entre els dos antibiòtics és que la doxiciclina no té el grup hidroxil al carboni 6 de l'anell C, sinó que el té en el carboni 5 de l'anell B. Les tetraciclines que no tenen el grup hidroxil al carboni 6 de l'anell C s'anomenen 6-deoxytetraciclines i són més resistents a la

degradació. A més, la doxiciclina presenta un major caràcter lipofílic respecte la tetraciclina (Botsoglou & Fletouris, 2001; Charest et al., 2005). Una altra diferència entre la doxiciclina i la tetraciclina, la clortetraciclina i l'oxitetraciclina és que la doxiciclina no presenta reaccions d'epimerització (EMEA/MRL/270/97-Final, 1997).

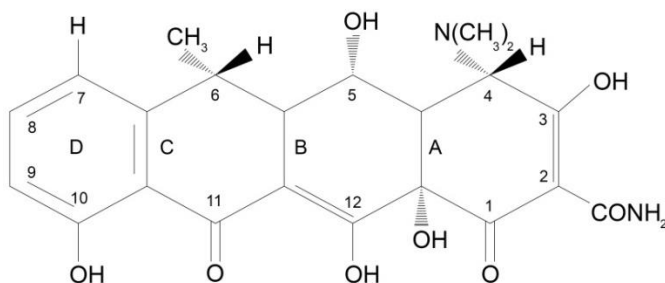


Figura 2 Estructura de la doxiciclina.

Les tetraciclines són compostos amfòters que poden reaccionar amb àcids o bases. Els seus valors de pK_a són: $pK_{a(1)} = 3,0$ associat a la desprotonació del grup hidroxil del carboni 3 (**figura 3**, requadre blau); $pK_{a(2)} = 8,0$ vinculat al grup hidroxil del carboni 12 (**figura 3**, requadre verd); $pK_{a(3)} = 9,2$ associat amb el grup dimetilamoni del carboni 4 (**figura 3**, requadre vermell). Aquests antibiòtics són zwitterions, ja que només es troben en estat neutre quan la suma de les càrregues elèctriques és zero (Anderson et al., 2005; Sanli et al., 2009).

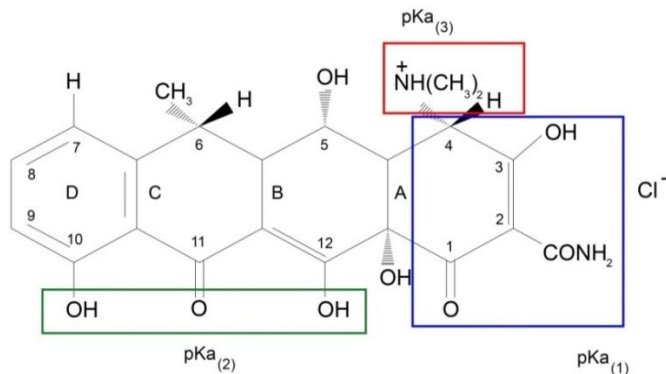


Figura 3 Estructura de la doxiciclina on s'hi representen els grups funcionals dels seus pKa.

La doxiciclina, com la resta de tetraciclines, és un antibiòtic bacteriostàtic que presenta activitat contra bacteris gram-positius i gram-negatius, contra micoplasmes, contra clamídies, contra rickettsies i contra espiroquetes. Aquest antibiòtic inhibeix la síntesi de proteïnes mitjançant la seva unió amb la subunitat 30S del ribosoma del bacteri, ja que evita l'acoblament de l'aminoacil-tRNA amb el lloc adequat del ribosoma (Chopra, 1994; Chopra & Roberts, 2001).

Avui en dia, aquest antibiòtic s'utilitza per a usos veterinaris amb finalitats terapèutiques, bàsicament contra malalties infeccioses respiratòries. La seva administració no està permesa en gallines ponedores però al estar permesa en pollastres es podrien detectar casos de contaminació creuada entre els pinsos medicats i no medicats (Reglament (UE) núm. 37/2010).

1.2.5 Distribució dels antibiòtics en els ous de gallina

El rovell i la clara d'ou tenen processos de formació diferents (apartat 1.1.1) i és per aquest motiu que es tractarà per separat la distribució i l'acumulació dels residus antibiòtics en cadascuna de les matrius.

Quan s'administra un antibiòtic a una gallina ponedora, el residu antibiòtic no s'acumula al mateix lloc en un rovell que està a la última fase de creixement, a punt d'iniciar el procés de formació de l'ou, que en un rovell que tot just està a les primeres fases de creixement. En el primer cas, els residus antibiòtics es localitzen a la part més externa del rovell, en canvi en el segon cas es troben en els anells més interns (Donoghue & Myers, 2000).

En el treball realitzat per Donoghue, Hairston, Gaines, Bartholomew, & Donoghue (1996) es va administrar una dosi d'ampicil·lina o d'oxitetraciclina en un conjunt de gallines ponedores, una hora després d'haver post un ou (8 gallines per a cada antibiòtic). Al cap de 24 hores d'haver administrat aquests antibiòtics, les gallines es van sacrificar per analitzar la concentració de cadascun dels antibiòtics en els rovells dels seus ovaris. Els resultats obtinguts van confirmar que en els rovells que tot just s'estaven desenvolupant, i que tardarien uns dies en pondre's, hi havia més concentració d'antibiòtic comparat amb els rovells que estaven en una fase de creixement més avançada. Això demostra que es poden trobar rovells contaminats amb antibiòtic uns dies després d'haver deixat d'administrar el tractament a les gallines ponedores. És per aquest motiu que es requereix d'un període de retirada per aconseguir que els ous no continguin concentracions d'antibiòtic superiors al LMR. Diversos estudis també van evidenciar aquest comportament, però administrant altres antibiòtics com la

sarafloxacin, la danofloxacin, la doxiciclina i l'oxitetraciclina (Chu et al., 2000; Yang et al., 2006; Yoshimura, et al., 1991).

La clara d'ou es forma mitjançant unes proteïnes solubles en aigua que s'excreten en el màgnum de l'oviducte durant la formació de l'ou. Aquestes proteïnes necessiten 1 o 2 dies per sintetitzar-se i 2 o 3 hores per formar la clara. Així doncs, tal com es demostra en alguns treballs, la concentració d'antibiòtic a la clara disminueix més ràpidament que en el rovell de l'ou (Chu et al., 2000; Yang et al., 2006; Yoshimura et al., 1991).

La farmacocinètica dels antibiòtics en l'ou no només depèn del procés de formació del rovell i de la clara, sinó que també influeixen les seves propietats fisicoquímiques (liposolubilitat, pka, etc.), el seu grau d'adsorció a l'intestí i el seu transport en el reg sanguini, la fisiologia de les gallines (edat, etc.), entre d'altres factors (Donoghue et al., 1997; Goetting et al., 2011; Kan & Petz, 2000).

Així doncs, sembla evident que el nombre d'antibiòtics autoritzats per les gallines ponedores sigui inferior al dels pollastres ja que molts medicaments veterinaris s'acumulen en els rovells i en les clares dels ous i caldria un temps de retirada massa llarg per poder tornar a consumir-los. Un exemple és el cas de la doxiciclina que està permès administrar-la als pollastres, en canvi està prohibida en gallines ponedores (Reglament (UE) núm. 37/2010).

1.2.6 Mètodes analítics per a la determinació d'antibiòtics en ous de gallina

Tenir una legislació que reguli els LMR dels antibiòtics en els ous de gallina exigeix disposar de mètodes analítics que siguin sensibles als

requeriments de la normativa i que permetin analitzar el volum de mostres exigít. Per poder fer front a la gran quantitat d'anàlisis, els laboratoris utilitzen mètodes de cribratge per discriminar les mostres conformes de les possibles mostres no conformes. A les mostres sospitoses se'ls realitza una anàlisi confirmatòria quantitativa per verificar si són mostres no conformes, i, en el cas que siguin mostres no conformes, conèixer exactament la concentració de l'antibiòtic o dels antibiòtics detectats. Així doncs, els mètodes d'anàlisi d'antibiòtics es poden separar en dos grans grups, els mètodes de cribratge i els mètodes confirmatoris quantitativus.

Els mètodes de cribratge han de permetre analitzar un gran volum de mostres en un temps curt, han de ser econòmics, han de ser fàcils d'utilitzar, han de ser sensibles i han de presentar un percentatge de falsos negatius baix, $CC\beta < 5 \%$ (Decisió de la Comissió 2002/657/EC). Actualment molts d'aquests mètodes solen ser multiresidu, fet que permet analitzar antibiòtics de diferents famílies simultàniament. Els mètodes de cribratge més freqüents són els microbiològics (test de les 4 plaques, Premi[®]Test, etc.), els bioquímics (ELISA, assaig immunocromatogràfic, tetrasensor, radioimmunoassaig, biosensors, etc.) i els instrumentals (HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-MS/MS, HPLC-TOF-MS, etc.) (Alfredsson et al., 2005; Berendsen et al., 2011; Capriotti et al., 2012; Chafer-Pericas et al., 2010; Gaudin et al., 2009; Huet et al., 2009; Huet et al., 2010; Le et al., 2012; Le et al., 2013; McGrath et al., 2012; Peng et al., 2012; Peters et al., 2009; Pikkemaat, 2009; Pikkemaat et al., 2007; Pulgarin et al., 2013; Robert et al., 2013; Toldra & Reig, 2006).

Estudis com el de Berendsen, Pikkemaat, & Stolker (2011) dubten de la competència dels mètodes de cribratge ja que han comprovat que segons la tècnica utilitzada i dels antibiòtics presents a la mostra, els resultats varien

considerablement. Per minimitzar els punts febles dels mètodes de cribratge cal seguir realitzant estudis, a més de vetllar perquè tots ells compleixin la Decisió 2002/657/EC.

Tal com s'ha descrit anteriorment, quan una mostra surt positiva en un mètode de cribratge és necessari analitzar-la mitjançant un mètode confirmatori quantitatiu que estigui validat segons la Decisió 2002/657/EC. Avui en dia la majoria de mètodes d'anàlisi d'antibiòtics són multiresidu.

L'extracció d'antibiòtics en el rovell de l'ou sol realitzar-se mitjançant un tampó (l'EDTA-McIlvaine, l'EDTA-succinat, l'EDTA-citrat) o un solvent orgànic (acetonitril o metanol) amb o sense un agent quelant (EDTA, àcid oxàlic o àcid fòrmic). Per a la precipitació de les proteïnes es pot utilitzar l'acetonitril o el metanol i per a l'eliminació de la fracció lipídica l'hexà. La purificació i/o la preconcentració de l'extracte es pot realitzar mitjançant l'extracció en fase sòlida (SPE), l'extracció líquida pressuritzada, la dispersió de matriu en fase sòlida (MSPD), els QuEChERS, entre d'altres (Bladek et al., 2012; Ja et al., 2008; Jimenez et al., 2011; Kinsella et al., 2009; Piatkowska et al., 2014). Frenich, Aguilera-Luiz, Vidal, & Romero-Gonzalez (2010) van realitzar un estudi comparant quatre mètodes d'extracció d'antibiòtics en ous (SPE, QuEChERS, MSPD i solvent orgànic + SPE), on van observar que el mètode amb millors resultats era el solvent orgànic + SPE.

D'altra banda, a la bibliografia hi ha autors que només han realitzat una extracció amb acetonitril abans de la determinació cromatogràfica (Spisso et al., 2010).

Per a la determinació dels antibiòtics s'utilitza la cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses en tàndem (HPLC-MS/MS),

treballant en mode MRM. Les columnes cromatogràfiques més utilitzades són la C18, la HSS T3, la fenil YMC i la BEH C18 UPLC (Frenich et al., 2010; Geis-Asteggiante et al., 2012; Gentili et al., 2005; Heller & Nochetto, 2004). Tot i això, també s'han fet estudis en matrius alimentàries (carn, mel i llet) on s'utilitza la cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses de temps de vol, HPLC-TOF-MS, per a l'anàlisi de residus farmacològics (Kaufmann et al., 2008; Ortelli et al., 2009; Wang & Leung, 2012).

L'addició d'un agent quelant al tampó d'extracció serveix per evitar que les tetraciclines formin complexos amb els ions metàl·lics de les matrius, ja que aquests prefereixen formar complexos amb els agents quelants en lloc de fer-ho amb les tetraciclines. Alguns estudis en lloc d'afegir un agent quelant a la solució d'extracció utilitzen columnes C8, treballen amb fases mòbils que continguin agents quelants o renten les columnes cromatogràfiques amb una solució d'EDTA abans d'utilitzar-les (Bruno et al., 2002; Furusawa, 2001; Lu et al., 2004; Oka et al., 2000). D'aquesta manera eviten que els complexos entre les tetraciclines i els ions metàl·lics puguin interaccionar amb els silanols lliures de les columnes cromatogràfiques i provocar pics amb cua i poc simètrics.

1.3 EFECTES FISIOLÒGICS DELS ANTIBIÒTICS USATS

L'administració d'antibiòtics pot provocar efectes adversos en els animals. En el cas del tractament amb tilosina provoca la inhibició de la funcionalitat del citocrom P450 (CYP3A4), ja que forma complexos intermediaris estables amb aquest citocrom (Carletti et al., 2003; Zweers-Zeilmaker et al., 1999). D'altra banda, un tractament continuat i crònic amb doxiciclina provoca un augment en el risc d'hepatotoxicitat i inhibeix la beta oxidació mitocondrial dels àcids grassos (Fromenty & Pessayre, 1995; Letteron et al., 2003). No obstant això, la doxiciclina presenta menys risc d'hepatotoxicitat que la tetraciclina (Heaton et al., 2007).

Detectar l'administració fraudulenta de substàncies tòxiques a animals destinats pel consum humà és molt complicat perquè es poden utilitzar mesclades de compostos a dosis sub-terapèutiques. Per aquest motiu, s'ha estudiat el possible ús de biomarcadors per identificar l'administració de substàncies tòxiques, ja sigui a dosis terapèutiques com a dosis sub-terapèutiques. Els biomarcadors poden ser qualsevol compost de l'organisme (proteïnes, constituents de la sang, enzims, etc.) que quedi afectat com a conseqüència de l'administració d'un xenobiòtic. Perquè un biomarcador sigui efectiu és necessari que aquests canvis perdurin més temps a l'organisme que les restes de la substància administrada (Castagnaro & Poppi, 2006; Dacasto et al., 2006; Gratacos-Cubarsi et al., 2008; Mooney et al., 2009). A la bibliografia científica no hi ha gaires estudis d'aquest tipus, tot i que en alguns casos es descriuen possibles biomarcadors de l'administració d'hormones, com la testosterona i la dexametasona, o d'algun antibiòtic, com la tetraciclina, a animals destinats al consum humà (vedells i porcs) (Cacciatore et al., 2009; Castagnaro &

Poppi, 2006; Gratacos-Cubarsi et al., 2008). Cal destacar que hi ha poca informació al respecte i que encara falta molt per investigar en aquest àmbit, tot i ser de gran interès ja que permet detectar, de forma indirecte, si els animals han estat tractats de manera fraudulenta amb medicaments, hormones, promotors de creixement, etc (Cacciatore et al., 2009).

A part dels efectes adversos que puguin causar l'administració d'antibiòtics, hi ha raons per sospitar que la utilització d'antibiòtics pot afectar el metabolisme de l'animal així com les propietats i la qualitat dels aliments que se'n deriven. Per exemple, el treball de Carreras et al. (2004) descriu els efectes de l'administració d'enrofloxacina sobre l'estabilitat oxidativa en el múscul del pit i de la cuixa de pollastre. En aquest cas, els autors no van observar canvis significatius en la concentració d' α -tocoferol ni en els valors de TBARS com a conseqüència de l'administració d'enrofloxacina. A l'estudi fet per Gratacos-Cubarsi, Castellari, Hortos, Garcia-Regueiro, Lametsch, & Jessen (2008) es va detectar diferències significatives en els perfils proteics de mostres de múscul de porc a causa de l'administració de tetraciclina. Tot i això, cal destacar l'escassa bibliografia que existeix referent als efectes que poden provocar l'administració de medicaments veterinaris sobre paràmetres nutricionals i de composició dels aliments d'origen animal.

Altres treballs destaquen que la concentració del colesterol hepàtic va patir canvis significatius quan als ratolins se'ls hi va aplicar un tractament amb doxiciclina o tetraciclina (Bocker et al., 1981; Hopf, et al., 1985; Mukherje et al., 1971; Yamamoto et al., 2006). A més, Yin et al. (2006) van manifestar la sobre-expressió d'enzims involucrats en la biosíntesis del colesterol hepàtic en fetges procedents de ratolins que se'ls havia administrat tetraciclina. A l'estudi de Brown et al. (2005) es va observar

que un tractament amb doxiciclina a dosis sub-antibacterianes produïa canvis significatius en la concentració de LDL-colesterol en el plasma de pacients amb síndromes coronaris.

També es coneix que l'activitat antibacterial de les sulfonamides consisteix en competir amb l'àcid p-amino-benzoic en la síntesi enzimàtica de l'àcid dihidrofòlic, fet que provoca una disminució de la disponibilitat de les formes reduïdes dels folats que són essencials per a la formació d'àcids nucleics (Richter et al., 2013; Roland et al., 1979).

1.4 PRINCIPALS CONSTITUENTS DE L'OU DE GALLINA

Taula 2 Principals nutrients de l'ou de gallina. Valor per 100 g (USDA, 2010).

Nutrient	Ou	Clara	Rovell
Aigua (g)	76,15	87,57	52,31
Energia (kcal)	143	52	322
Proteïnes (g)	12,56	10,90	15,86
Carbohidrats (per diferència) (g)	0,72	0,73	3,59
Sucres (g)	0,37	0,71	0,56
Lípids (g)	9,51	0,17	26,54
Àcids grassos saturats (g)	3,13	0,00	9,55
Àcids grassos monoinsaturats (g)	3,66	0,00	11,74
Àcids grassos poliinsaturats (g)	1,91	0,00	4,20
Colesterol (mg)	372	0	1085
Vitamines			
Tiamina (µg)	40	4	176
Riboflavina (mg)	0,46	0,44	0,53
Niacina (µg)	75	105	24
Àcid pantotènic (mg)	1,53	0,19	2,99
Vitamina B6	170	5	350
Folats (µg)	47	4	146
Vitamina B12	0,89	0,09	1,95
Vitamina C (mg)	0,0	0,0	0,0
Retinol (µg)	160	0,0	371
α-tocoferol (Vitamina E) (mg)	1,05	0,00	2,58
Vitamina D (D2 + D3) (µg)	2,0	0,0	5,4
Vitamina K (filoquinona) (µg)	0,3	0,0	0,7
Xantofil·les			
Luteïna + zeaxantina (µg)	503	0,0	1094
Minerals			
Calci (mg)	56	7	129
Fòsfor (mg)	198	15	390
Ferro (mg)	1,75	0,08	2,73
Zinc (mg)	1,29	0,03	2,30
Magnesi (mg)	12	11	5
Sodi (mg)	142	166	48
Potassi (mg)	138	163	109
Seleni (µg)	30,7	20,0	56,0
Manganès (µg)	28	11	55
Coure	72	23	77

1.4.1 Proteïnes

L'ou és una font important de proteïnes i es troben repartides entre el rovell (16 %) i la clara (11 %).

Les principals proteïnes del rovell de l'ou són les isoformes de la livetina (α -, β - i γ -) (9 %), les lipovitel·lines (40 %), la fosvitina (13 %) i les lipoproteïnes de baixa densitat (37 %). En canvi, les proteïnes majoritàries de la clara són l'ovoalbúmina (54 %), l'ovotransferrina (12 %), l'ovomucoïda (11 %), les globulines (8 %) i la lisozima (3,4 %). Tot i això, Mann & Mann (2008) van observar la transferència d'algunes de les proteïnes principals de la clara al rovell de l'ou.

Com a conseqüència de les propietats emulsionants i espumoses de les proteïnes de la clara d'ou, aquesta és molt utilitzada com a ingredient a la indústria alimentària (Awade & Efstathiou, 1999; Li-Chan & Kim, 2008).

A partir d'ara només es farà referència a les proteïnes de la clara d'ou, ja que en aquest treball no es va estudiar el perfil proteic del rovell de l'ou.

1.4.1.1 Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi

Per a la determinació de la proteïna total de la clara d'ou es poden utilitzar diversos tests colorimètrics que es troben al mercat comercial com el Pierce, el Bio-rad, el QuantiPro, etc. D'altra banda, l'anàlisi del perfil proteic de la clara presenta certes dificultats a causa de la divergència entre les masses moleculars ($14\text{-}8 \times 10^3$ kDa), entre els punts isoelèctrics (4-11) i entre les concentracions (50 % d'ovoalbúmina vers el 3 % de lisozima) de les diferents proteïnes que la constitueixen.

Abans de la separació proteica cal precipitar i solubilitzar les proteïnes. Sovint s'utilitza l'acetona o l'àcid tricloroacètic per a la seva precipitació i un tampó a pH = 8 que contingui urea, tiourea, DTT, CHAPS, IPG, o Tris, SDS, EDTA, 2-mercaptoetanol, per a la seva solubilització.

Per obtenir el perfil proteic es poden utilitzar diverses tècniques com l'isoelectroenfocament (IEF), l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE), l'electroforesi bidimensional en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (2D-SDS-PAGE), la cromatografia de líquids acoblada a un detector ultraviolat (HPLC-UV) o a un espectròmetre de masses (HPLC-MS, HPLC-MSⁿ, HPLC-MALDI-TOF-MS), entre d'altres (Awade & Efstathiou, 1999; Guerin-Dubiard et al., 2006; Mann, 2007; Mann et al, 2008; Miguel et al., 2005; Raikos et al., 2006; Wang et al., 2012).

Amb les tècniques electroforètiques es poden usar diferents mètodes de tinció per aconseguir una bona visualització de les proteïnes (amb plata, amb blau de Comassie, Sypro[®] ruby protein, Pro-Q[®] Emerald 300 glicoprotein, etc.) (Desert et al., 2001; Raikos et al., 2006).

La utilització de l'espectrometria de masses, amb una prèvia digestió enzimàtica de les proteïnes a pèptids mitjançant la tripsina, ha permès conèixer el proteoma del rovell i de la clara d'ou i així obtenir perfils proteics detallats. Amb aquesta tècnica s'ha fet un gran avenç sobretot a l'hora de conèixer les proteïnes minoritàries d'aquestes matrius. A més, en els darrers anys s'han fet estudis on s'utilitzaven tècniques instrumentals noves, així com sistemes informàtics per a la identificació dels pèptids (D'Ambrosio et al., 2008; Gautron et al., 2010; Mann & Mann, 2011).

1.4.2 Àcids grassos totals

Els àcids grassos són molècules formades per una cadena hidrocarbonada on en un dels extrems hi ha un grup carboxílic (-COOH). La fórmula general és $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$. Tot i que aquests compostos presenten una zona hidròfila (grup carboxil), són insolubles en aigua ja que la cadena hidrocarbonada és hidròfoba i té un pes més important dins la molècula. Els àcids grassos són les estructures bàsiques dels lípids saponificables.

D'àcids grassos n' existeixen de:

- Saturats (SFA): tots els enllaços entre els àtoms de carboni són senzills. A temperatura ambient solen trobar-se en estat sòlid, ja que es poden unir entre ells mitjançant ponts d'hidrogen.
- Insaturats: contenen un o més dobles enllaços dins la seva estructura. Segons el nombre de dobles enllaços que contenen es poden classificar en àcids grassos monoinsaturats (MUFA) o poliinsaturats (PUFA). A temperatura ambient solen trobar-se en estat líquid, a causa de la complicació en la formació de ponts d'hidrogen. Encara que els àcids grassos insaturats presenten dos conformacions la *cis* i la *trans*, a la natura principalment es troba la conformació *cis*.

Avui en dia els àcids grassos poliinsaturats són els que presenten més interès a nivell nutricional, ja que els àcids grassos omega 6 (n-6) i sobretot els àcids grassos omega 3 (n-3) presenten certs beneficis sobre la salut humana com la disminució dels triglicèrids en el plasma, la disminució de la pressió arterial, la disminució del nivell de colesterol en sang, entre d'altres (Grune et al., 2001; Mach et al., 2006; Ren et al., 2013). No obstant això, moltes dietes contenen una relació entre el sumatori dels àcids grassos

n-6 i n-3 de 15:1 i aquesta hauria de ser aproximadament de 1:1, ja que una ingesta elevada d'àcids grassos n-6 pot afavorir l'aparició de certes malalties com l'arteriosclerosi i la diabetis. L'interès en augmentar la ingesta dels àcids grassos omega 3 i el fet que l'organisme no és capaç de sintetitzar-los, provoca que cada vegada hi hagi més productes enriquits amb aquests àcids grassos. Els més importants són l'àcid α -linolènic (C18:3 (n-3)c), l'àcid eicosapentaenoic (C20:5 (n-3)c) i l'àcid docosahexaenoic (C22:6 (n-3)c) (Mach et al., 2006).

1.4.2.1 Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi

Per a la determinació dels àcids grassos totals en el rovell de l'ou cal realitzar una extracció de la fracció lipídica, ja sigui mitjançant el mètode de Folch, Lees, & Stanley (1957) o el de Bligh & Dyer (1959). Un cop obtingut l'extracte, el mètode més utilitzat per a la seva anàlisi és la cromatografia de gasos acoblada a un detector d'ionització de flama (GC-FID). No obstant això, previ a l'anàlisi cromatogràfica cal fer una saponificació, per alliberar els àcids grassos de les molècules en què formen part, i una derivatització, ja que presenten una elevada polaritat i una baixa volatilitat que dificulta l'anàlisi per cromatografia de gasos. Tot i que a la bibliografia existeixen diferents mètodes per a la saponificació i la derivatització dels àcids grassos, el procés més utilitzat per a l'obtenció dels èsters metilats és mitjançant l'addició d'hidròxid de potassi en metanol amb la presència d'un catalitzador (trifluorur de bor, àcid clorhídric o àcid sulfúric) i aplicant temperatura (50-100 °C) durant 20-60 minuts (Cherian et al., 2002; Milinsk et al., 2003; Raes et al., 2002; Ramasamy et al., 2009; Simcic et al., 2011; Szymczyk & Pisulewski, 2003).

1.4.3 Triglicèrids, àcids grassos lliures i fosfolípids

Els triglicèrids són lípids saponificables formats per una molècula de glicerol i tres àcids grassos. Es troben principalment en el teixit adipós i formen part de la reserva energètica dels organismes. Un elevat contingut de triglicèrids en sang pot incrementar el risc de patir malalties cardiovasculars.

Els àcids grassos lliures corresponen als àcids grassos que no es troben units a cap altra molècula.

El rovell de l'ou de gallina és una font important de fosfolípids. Aquests són una classe de lípids saponificables formats per una molècula de glicerol, un grup fosfat, dos àcids grassos i una base nitrogenada. Els fosfolípids majoritaris que es troben en el rovell de l'ou són la fosfatidilcolina (70 %) i la fosfatidiletanolamina (25 %). Les seves principals funcions són estructurals, ja que formen part de les membranes cel·lulars, però també són missatgers de la transducció de senyals, entre altres. A la indústria alimentària són utilitzats com a emulsionants.

1.4.3.1 Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi

Per a la determinació dels triglicèrids, dels àcids grassos lliures i dels fosfolípids cal realitzar una separació i una purificació de l'extracte lipídic. Per a dur a terme aquesta separació els mètodes més utilitzats són la cromatografia en capa fina (TLC) i l'extracció en fase sòlida (SPE), encara que també es pot realitzar mitjançant la cromatografia líquida. La SPE té l'avantatge que és més senzilla, més ràpida, més reproducible i permet recuperar més quantitat de lípids a cadascuna de les fraccions, comparat

amb la TLC. Els principals cartutxos utilitzats per a la SPE són d'aminopropil o de sílice, mentre que els solvents d'elució poden ser:

- Pels triglicèrids: cloroform, cloroform:2-propanol (2:1), hexà:dietil èter (8:2), etc.
- Pels àcids grassos lliures: 2 % àcid acètic:dietil èter, hexà:dietil èter (1:1), etc.
- Pels fosfolípids metanol:cloroform, metanol, hexà, etc.

En el cas de la TLC la separació lipídica es realitza sobre una fase estacionària de sílice i els solvents més utilitzats són mesclades d'hexà:dietil èter:àcid acètic, cloroform:metanol:aigua, entre d'altres (Bitman et al., 1981; Bondia-Pons et al., 2006; Fredriksson et al., 2006; Gladkowski et al., 2011; Kaluzny et al., 1985; Kivini et al., 2004; Pinkart et al., 1998; Prieto et al., 1992).

L'anàlisi dels àcids grassos procedents de les fraccions de triglicèrids, d'àcids grassos lliures i de fosfolípids es du a terme mitjançant la cromatografia de gasos acoblada a un detector de ionització en flama amb una prèvia saponificació i derivatització que permet transformar els àcids grassos en èsters metilats (apartat 1.4.2). D'altra banda, a part d'analitzar els àcids grassos de cada fracció lipídica, també es pot analitzar cadascun dels triglicèrids i dels fosfolípids que conté el rovell de l'ou. Per aquest tipus d'anàlisis s'utilitza la cromatografia de líquids acoblada a un detector de *evaporative light scattering* (HPLC-ELSD), a un detector d'índex de refracció (HPLC-RI), a un detector ultraviolat (HPLC-UV) o a un espectròmetre de masses (HPLC-MS, HPLC-TOF-MS) (Cunha & Oliveira, 2006; Dugo et al., 2005; Holcapek et al., 2005; Kivini et al., 2004; La Nasa et al., 2013; Lei et al., 2012; Paglia et al., 2010; Zhou et al., 2013). Tot i

això, Kallio, Yli-Jokipii, Kurvinen, Sjøvall, & Tahvonen (2001) van determinar els triglicèrids del rovell de l'ou sense cap tractament de mostra, injectant directament el rovell en l'espectròmetre de masses.

Encara que la majoria de mètodes utilitzin la cromatografia de líquids per a la determinació dels fosfolípids en el rovell de l'ou, alguns autors van fer-ho mitjançant la TLC acoblada a un MALDI-TOF-MS (Fuchs et al., 2007).

1.4.4 Colesterol

El colesterol és un lípid esteroide format per quatre anells hidrocarbonats. A un extrem conté un grup hidroxil (extrem polar), mentre que a l'altre hi ha una cadena hidrocarbonada (extrem apolar) (**figura 4**). Dins l'organisme actua com a precursor d'hormones corticosteroides, d'hormones sexuals, d'àcids biliars, de la vitamina D, així com també realitza funcions estructurals, ja que forma part de les membranes plasmàtiques dels animals. La seva concentració a l'individu depèn de la síntesi endògena i de la seva ingesta en la dieta (ous, carn, peix, productes làctics, entre d'altres).

A causa que l'ou conté una gran quantitat de colesterol, al llarg de la història s'ha cregut que el seu consum augmentava la concentració de colesterol en sang, cosa que incrementava el risc de les malalties cardiovasculars. No obstant això, després de realitzar nous estudis s'ha demostrat que el colesterol que prové de la dieta només augmenta lleugerament el colesterol en sang, comparat amb les dietes que contenen elevades quantitats d'àcids grassos saturats i d'àcids grassos *trans* insaturats. Com a conseqüència de que els àcids grassos majoritaris en l'ou

són *cis* insaturats, el risc que provoca aquest aliment vers les malalties cardiovasculars és baix. Per tant, les persones sanes i adultes que s'alimenten a través d'una dieta equilibrada i realitzen activitat física poden consumir tranquil·lament un ou de gallina al dia (Hu et al., 1999; Jones, 2009; Mensink et al., 2003).

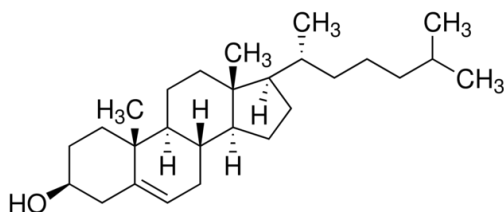


Figura 4 Estructura química del colesterol (Sigma-Aldrich, 2015).

1.4.4.1 Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi

Antigament, per a la determinació del colesterol en aliments es realitzava una extracció lipídica amb dissolvents orgànics seguida d'una saponificació. Al llarg dels anys, diferents estudis van comprovar que es podia reduir el temps i la manualitat d'aquest anàlisi si es duia a terme una saponificació directe sobre la mostra, evitant la prèvia extracció lipídica. La saponificació allibera el colesterol esterificat a altres compostos i elimina interferents com els àcids grassos, els triglicèrids i els fosfolípids (Beyer et al., 1989; Dinh et al., 2011; Fenton & Sim, 1991; Van Elswyk et al., 1991).

La reacció de saponificació més utilitzada consisteix en l'addició d'una solució alcohòlica d'hidròxid de potassi de 0,3-1 N, deixant-la reaccionar entre 15-60 minuts a 60-80 °C. Un cop saponificada la mostra es realitza l'extracció del material insaponificable (colesterol) mitjançant un solvent orgànic. El més usat avui en dia és l'hexà, però encara hi ha autors que

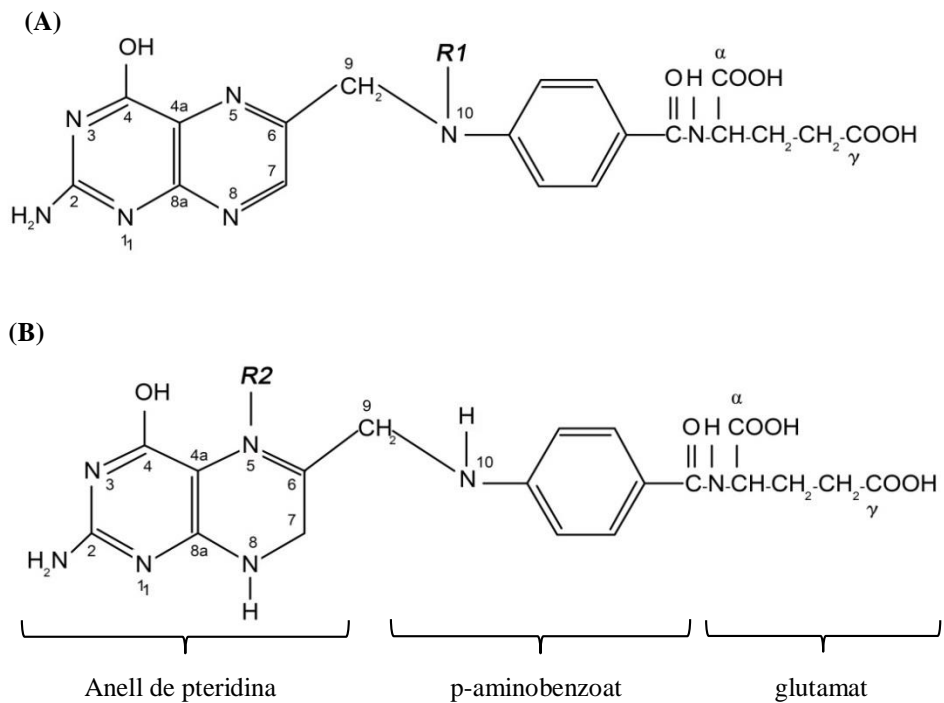
utilitzen l'èter, l'isooctà o el ciclohexà (Bragagnolo & Rodriguez-Amaya, 2003; Cayuela et al., 2003; Fenton, 1992; Maraschiello et al., 1996). Tot i això, Daneshfar, Khezeli, & Lotfi (2009) van utilitzar la microextracció líquid-líquid dispersiva per a l'extracció del colesterol en el rovell de l'ou de gallina.

Els primers mètodes d'anàlisi van ser els gravimètrics, els colorimètrics o els enzimàtics (Beyer & Jensen, 1989; Jiang et al., 1991; Nogueira & Bragagnolo, 2002; Pasin et al., 1998; Sweeney & WeBirauch, 1976; Tonks, 1967; Weston, 1914). Actualment els més utilitzats són els cromatogràfics, ja sigui la cromatografia de gasos acoblada a un detector d'ionització de flama (GC-FID) o la cromatografia de líquids acoblada a diversos detectors: de sèrie de díodes, de fluorescència, d'índex de refracció o espectròmetre de masses (HPLC-DAD, HPLC-FLD, HPLC-RI, HPLC-MS) (Ahn et al., 2012; Botsoglou et al., 1998; Gasior & Pietras, 2013; Lin et al., 2007; Mazalli et al., 2006; Naviglio et al., 2012; Piironen et al., 2002). També hi ha treballs que van utilitzar sensors per analitzar la concentració de colesterol en el rovell dels ous de gallina (Basu et al., 2007; Nagaoka et al., 2012).

1.4.5 Àcid 5-metiltetrahidrofòlic

L'àcid 5-metiltetrahidrofòlic forma part de la família dels folats. Folats és un terme genèric per referenciar-se als derivats mono- o poliglutamats de l'àcid pteròic, formats per un anell de pteridina, un p-aminobenzoat i *x* molècules de glutamat (**figura 5**). Aquests compostos pertanyen al grup de vitamines B solubles en aigua (vitamina B9) i són beneficiosos per la salut ja que redueixen el risc de defectes en el tub neural dels infants acabats de

néixer, prevenen de malalties cardiovasculars, així com d'alguns càncers. A més, són necessaris per a la síntesis de nucleòtids, per a la divisió cel·lular i per a l'expressió genètica. A causa que el cos humà no pot sintetitzar aquests compostos i tota l'aportació ha de ser mitjançant la dieta, molts aliments són enriquits amb àcid fòlic, per augmentar-ne la ingesta diària. No obstant això, avui en dia s'estan estudiant possibles efectes adversos com a conseqüència de l'addició d'àcid fòlic, compost sintetitzat químicament, als aliments. Alguns d'aquests efectes poden emascarar símptomes hematològics com la deficiència de la cobalamina, la leucèmia, l'artritis, el càncer de colon, entre d'altres. La deficiència de folats en el cos humà es pot associar a un gran nombre de desordres com l'Alzheimer, l'increment en la concentració d'homocisteïna en plasma, el càncer de colon, el risc de malalties cardiovasculars, defectes en el tub neural (Czeizel & Dudas, 1992; Jagerstad & Jastrebova, 2013; Lucock, 2000; Robinson, 2000).



Compost	Figura (A) R1	Figura (B) R2
Àcid fòlic	- H	
Àcid 10-HCO-fòlic	- HCO	
Àcid tetrahidrofòlic		- H
Àcid 5-metiltetrahidrofòlic		- CH ₃
Àcid 5-HCO-tetrahidrofòlic		- HCO

Figura 5 Estructura química dels diferents derivats dels folats. (A) derivats amb la forma oxidada de l'anell de pteridina, (B) derivats amb la forma reduïda de l'anell de pteridina (Patring & Jastrebova, 2007).

1.4.5.1 *Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi*

Per a la determinació dels folats cal treballar amb llum tènue i amb presència d'antioxidants per evitar la seva oxidació (àcid ascòrbic, 2-mercaptoetanol, etc.). Després de l'extracció mitjançant un tampó (fosfat, acetat o HEPES/CHES) es realitza un tractament enzimàtic, si és necessari (Arcot & Shrestha, 2005; Patring et al., 2005 b; Vishnumohan et al., 2011).

Sovint els folats es troben en els aliments en la seva forma poliglutamada (entre 5-7 molècules d'àcid glutàmic) i és quan arriben a l'intestí que són hidrolitzats a la forma monoglutamada per poder ser adsorbits (Leichter et al., 1979). Per hidrolitzar els enllaços poli- γ -glutamil de les formes poliglutamades dels folats, cal un tractament enzimàtic amb conjugases dels folats o pteroilpoliglutamatahidrolases o γ -glutamildhidrolases. La font principal d'aquests enzims és el sèrum de rata, però també se'n troben en el plasma humà, en el plasma de rata, en el fetge de gos, en el pàncrees de pollastre, entre d'altres (Wang et al., 1985). D'altra banda, el grup d'investigació d'Eitenmiller van introduir la utilització d'un tractament trienzimàtic compost per proteases, α -amilases i conjugases per millorar l'extracció dels folats de la matriu i hidrolitzar les formes poliglutamades a monoglutamades dels folats (Martin et al., 1990; Yon & Hyun, 2003). Els ous de gallina contenen majoritàriament l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic, encara que alguns treballs també han observat, de forma minoritària, l'àcid 10-formilfòlic (Ndaw et al., 2001; Seyoum & Selhub, 1998; Vahteristo et al., 1997). Com que en els ous de gallina tan sols s'han observat formes monoglutamades, no és necessari dur a terme el tractament enzimàtic amb conjugases.

Després de l'extracció i del tractament enzimàtic es realitza una purificació de l'extracte mitjançant l'extracció en fase sòlida, en què els

principals cartutxos utilitzats són el SAX (Nilsson et al., 2004; Vahteristo et al., 1996). D'altra banda, altres treballs van utilitzar columnes d'afinitat cromatogràfica per a la seva purificació (Gujska & Kunczewicz, 2005; Poo-Prieto et al., 2006).

Els principals mètodes usats en l'anàlisi de folats són els microbiològics i els cromatogràfics, encara que també hi han autors que han utilitzat un biosensor (Chen & Eitenmiller, 2007; Devi et al., 2008; Goyer & Navarre, 2007; Indyk & Woollard, 2013). Avui en dia el mètode més utilitzat és la cromatografia líquida en fase invertida acoblada a un detector ultraviolat i/o a un detector de fluorescència (HPLC-DAD, HPLC-FLD, HPLC-DAD-FLD) o a un espectròmetre de masses (HPLC-MS). A l'hora d'analitzar els folats cal tenir en compte que l'àcid fòlic i el 10-formilfolat no presenten propietats naturals de fluorescència, a diferència de les altres formes monoglutamades (tetrahidrofolat, 5-metiltetrahidrofolat, etc.) que tenen més resposta en el detector de fluorescència (Camara et al., 2013; Chandra-Hioe et al., 2011; De Brouwer et al., 2010; Doherty & Beecher, 2003; Iyer & Tomar, 2013; Jastrebova et al., 2011; Patring et al., 2005 a).

1.4.6 Carotenoides, α -tocoferol i retinol

Els carotenoides són pigments naturals de color groc, vermell i taronja que se sintetitzen en plantes i micro-organismes i que són les responsables del color groguenc del rovell. Dins de la família dels carotenoides es poden diferenciar dos grans grups: els carotens i les xantofil·les. Estructuralment parteixen d'una cadena hidrocarbonada de poliens conjugats amb diferents substituents, on la principal diferència estructural entre els dos grups de carotenoides és que les xantofil·les (luteïna, zeaxantina, etc.), a diferència

dels carotens (α -carotè, el β -carotè, etc.), tenen un o més àtoms d'oxigen a la seva estructura (**figura 6**).

A més, els carotenoides són antioxidants liposolubles que presenten efectes beneficiosos sobre la salut humana com la disminució del risc de malalties cardiovasculars, d'algun tipus de càncer, de l'oxidació lipídica, de danys en el DNA, etc (Amorim-Carrilho et al., 2014). D'altra banda, el rovell d'ou és una font molt important de luteïna i de zeaxantina, fet que comporta beneficis davant de certs trastorns visuals com la degeneració macular i les cataractes.

A causa que les gallines no poden sintetitzar aquests compostos, el seu contingut i la seva composició en l'ou dependrà de la seva dieta. Avui en dia hi ha uns 600 carotenoides caracteritzats, dels quals 12 són els més significatius en la dieta dels animals i dels humans. Alguns d'aquests carotenoides són considerats precursors de la vitamina A (l' α -carotè, el β -carotè, la β -criptoxantina, etc.) (Amorim-Carrilho et al., 2014; Karppi et al., 2008). Tot i que la vitamina A presenta tres formes el retinol, el retinal i l'àcid retinoic, és el retinol el compost que bàsicament es troba en l'ou de gallina (**figura 6**). En aquest cas, les gallines ponedores tampoc poden sintetitzar de forma endògena el retinol, però el poden sintetitzar a partir dels carotenoides que actuen com a provitamina A i a través de la ingesta d'èsters de retinol sintètics en la dieta. Les principals funcions biològiques del retinol estan associades amb la vista, la reproducció, el desenvolupament embrionari, el desenvolupament ossi, les funcions immunològiques, entre d'altres (Gleize et al., 2012).

La vitamina E és un antioxidant liposoluble que consta de vuit isòmers: α -, β -, γ -, i δ -tocoferol i α -, β -, γ -, i δ -tocotrienol. Estructuralment estan formats per un anell de cromanol on se li uneix un grup hidroxil, grups metil

(segons l'isòmer) i una cadena carbonada hidrofòbica. La principal diferència estructural entre els tocoferols i els tocotrienols és que els tocotrienols tenen tres dobles enllaços a la cadena carbonada mentre que els tocoferols no. De les 8 formes de la vitamina E, l' α -tocoferol (**figura 6**) és l'isòmer que presenta una major activitat biològica, i per tant és el compost més estudiat (Pinheiro-Sant'Ana et al., 2011).

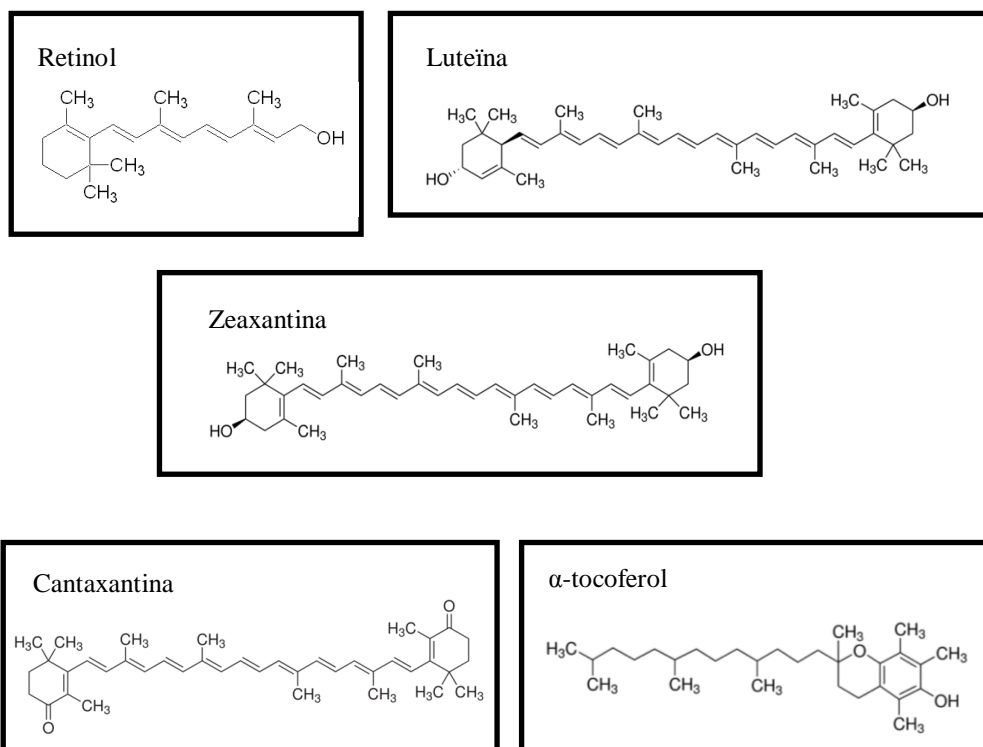


Figura 6 Estructures dels carotenoids analitzats en aquest treball, de l' α -tocoferol i del retinol (Sigma-Aldrich, 2015).

1.4.6.1 *Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi*

Durant l'anàlisi dels carotenoides, de l' α -tocoferol i del retinol cal treballar amb condicions de llum tènue i amb la presència d'antioxidants (BHT) per evitar-ne la seva oxidació. L'extracció es pot realitzar mitjançant una extracció directe amb un solvent orgànic com l'hexà, amb una mescla de dissolvents, o bé realitzant una prèvia saponificació amb hidròxid de potassi (50-60 % KOH, a 70 °C, entre 30-120 minuts), tot i que durant la saponificació es pot provocar la degradació d'alguns anàlits (Kang et al., 1998; Kimura et al., 1990; Van Ruth et al., 2011).

Per a la seva determinació en aliments existeixen diferents mètodes mitjançant la cromatografia de líquids. Aquests compostos tant es poden analitzar de forma separada, utilitzant mètodes específics per a cada família de compostos o de forma simultània (Gleize et al., 2012; Nimalaratne et al., 2012; Otlés & Hisil, 1991; Pinheiro-Sant'Ana et al., 2011; Sanches-Silva et al., 2013).

Fins fa uns anys, la tècnica més utilitzada era la cromatografia de líquids acoblada a un detector de sèrie de díodes o de fluorescència, en canvi avui en dia alguns mètodes usen l'espectrometria de masses. Per millorar la resolució entre la luteïna i la zeaxantina, diversos estudis utilitzen dues columnes en sèrie o una columna de fase C30, en lloc d'una columna C18 (Chauveau-Duriot et al., 2010; Gentili & Caretti, 2011; Hargitai et al., 2006; Kang et al., 1998; Pinheiro-Sant'Ana et al., 2011; Wenzel et al., 2011).

1.4.7 Oxidació lipídica del rovell d'ou

La determinació de l'oxidació lipídica és important ja que pot provocar canvis en les propietats físiques i organolèptiques dels aliments (canvis en l'aspecte, en el sabor, en l'aroma, en la textura, així com canvis nutricionals). L'oxidació del rovell de l'ou pot ser a causa del pH, de la llum, de la temperatura, entre d'altres factors. Tot i això, la closca protegeix l'ou de factors externs, fet que provoca una menor oxidació (Botsoglou et al., 1997).

L'oxidació lipídica té lloc mitjançant un conjunt de reaccions en cadena de radicals lliures que es distribueixen en tres etapes: iniciació, propagació i acabament.

1.4.7.1 Revisió bibliogràfica dels mètodes d'anàlisi

A l'hora de mesurar l'oxidació lipídica es pot realitzar mitjançant la determinació de productes primaris, com els hidroperòxids (R-COOH), o de productes secundaris, com el malondialdehid (MDA), el pentanal o l'hexanal. Els productes primaris es formen durant les primeres etapes de l'oxidació lipídica, però són compostos poc estables ja que es descomponen ràpidament per formar els productes secundaris. A causa d'això, els mètodes més utilitzats per a la mesura de l'oxidació lipídica són els que determinen els productes secundaris, sobretot el MDA, com el test de l'àcid tiobarbitúric (TBA), l'espectrofotometria UV-Visible, la cromatografia de líquids, la cromatografia de gasos, entre d'altres. Tot i que el test de TBA presenta poca sensibilitat, poca especificitat i poca reproductibilitat, és un dels més utilitzats per a la determinació de l'oxidació lipídica ja que és

econòmic i poc laboriós (Barriuso et al., 2013; Gray, 1978; Kanner & Rosenthal, 1992; Papastergiadis et al., 2012).

El mecanisme de reacció del test de TBA es troba il·lustrat a la **figura 7** i consisteix en què una molècula de MDA reacciona amb dues molècules de TBA per formar un complex de color rosa que absorbeix a una longitud d'ona de 532 nm (TBA₂-MDA). Perquè aquesta reacció tingui lloc cal medi àcid i temperatura elevada (95-100 °C). No obstant això, un dels inconvenients d'aquesta tècnica és la poca especificitat que té, ja que altres substàncies com aldehyds, sucres, aminoàcids i proteïnes que es troben a la matriu també reaccionen amb el TBA formant adductes que presenten un màxim d'adsorció a l'UV-Visible molt proper al del complex TBA₂-MDA. És per aquest motiu que aquest mètode s'utilitza per a la mesura de l'oxidació lipídica en general i no per a la quantificació del MDA. Així doncs, per fer referència als resultats de l'oxidació lipídica s'utilitzarà el terme TBARS (*TBA-reactive substances*) i s'expressarà com a mmols d'equivalents de MDA/ kg de rovell.

L'obtenció de l'extracte, per a la determinació de l'índex de TBARS, es pot realitzar mitjançant l'extracció simple, on els compostos reaccionen directament amb una solució aquosa i àcida de TBA, per destil·lació de la mostra o per escalfament amb reflux. Encara que l'extracció mitjançant la destil·lació minimitzi els interferents que reaccionen amb el TBA, l'anàlisi és llarg i es poden formar artefactes durant el procés d'escalfament. De les tres tècniques la més usada és l'extracció simple (Fernandez et al., 1997; Guillen-Sans & Guzman-Chozas, 1998).

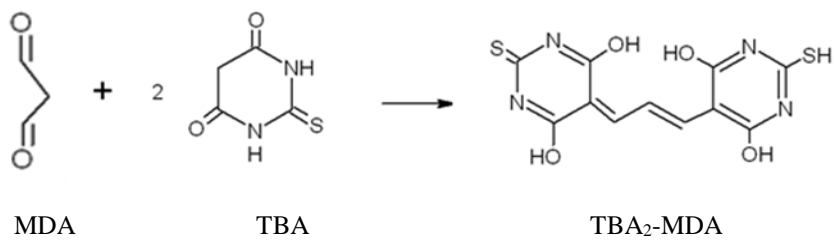


Figura 7 Reacció entre el MDA i el TBA per formar el complex TBA₂-MDA.

2. OBJECTIUS

Els límits màxims residuals i els plans de vigilància de residus en aliments d'origen animal s'han establert per garantir un nivell adequat de protecció vers el consumidor. Tot i això, hi ha raons per sospitar que la utilització d'antibiòtics pot afectar el metabolisme de l'animal així com les propietats i la qualitat dels aliments que se'n deriven. Cal destacar l'escassa bibliografia referent als efectes que poden provocar l'administració de medicaments veterinaris sobre paràmetres nutricionals i de composició dels aliments d'origen animal.

En el cas de les gallines ponedores, l'administració terapèutica de l'antibiòtic tilosina A està permesa, en canvi l'ús de l'antibiòtic doxiciclina no ho està (Reglament (UE) núm. 37/2010). No obstant això, la doxiciclina és un dels antibiòtics permesos en els pollastres d'engreix i es podria produir un subministrament involuntari a les gallines ponedores com a conseqüència d'una contaminació creuada entre un pinso medicat i un no medicat.

Per aquests motius, els objectius principals d'aquest treball van ser:

- Estudiar l'efecte de l'administració de **tilosina A** en gallines ponedores sobre paràmetres nutricionals i de composició de l'ou durant el tractament amb antibiòtic i després d'un temps de retirada. La seva administració es va dur a terme seguint les indicacions terapèutiques del medicament en gallines ponedores.
- Estudiar l'efecte de l'administració de **doxiciclina** en gallines ponedores sobre paràmetres nutricionals i de composició de l'ou durant el tractament amb antibiòtic i després d'un temps de retirada. La seva administració es va dur a terme reproduint el subministrament

involuntari a causa de la contaminació creuada entre un pinso medicat i un de no medicat.

- Identificar possibles biomarcadors per a la detecció d'una contaminació creuada i/o de pràctiques fraudulentas en l'ús dels antibiòtics, tilosina A i doxiciclina, en gallines ponedores.

Per poder assolir els objectius plantejats es van optimitzar els mètodes analítics necessaris per a la determinació de:

- La proteïna soluble a la clara de l'ou.
- Els àcids grassos totals, el fraccionament lipídic, els triglicèrids, els àcids grassos lliures, els àcids grassos procedents de la fracció dels fosfolípids, el colesterol, l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic, els carotenoides, l' α -tocoferol, el retinol i l'oxidació lipídica en el rovell de l'ou.
- Els residus de tilosina A i doxiciclina en el rovell i la clara de l'ou.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Per realitzar el treball experimental es van criar 45 gallines ponedores de l'espècie *Hy Line Brown* a la Granja Experimental de l'IRTA del Prat de Llobregat. Les gallines ponedores es van col·locar en una gàbia individual equipada amb un dipòsit d'aigua de beguda i van ser alimentades amb el pinso descrit a la **taula 3** (Super's, Nutrició Animal N.º 6, Interdiana S.L).

Taula 3 Composició del pinso subministrat a les gallines ponedores de l'estudi (Super's, Nutrició animal N.º 6, Interdiana S.L).

Ingredients	%
Blat de moro	61
Farina extreta de soja torrada	20
CaCO ₃	9
Farinetes de blat	6
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	1,33
Mantega	1,2
NaCl	0,3
NaHCO ₃	0,1
Additius ¹	1,07

Additius¹: Vitamina A 8.000 ui/kg; Vitamina D3 1.500 ui/kg; Vitamina E (α -tocoferol) 15 mg/kg; Anàleg hidroxilat de metionina 2.000 mg/kg; CuSO₄ · 5H₂O 4 mg/kg; 6 fitasa EC3.1.3.25 500 FTU/kg; Cantaxantina 3 mg/kg; Àcid propiònic i fumàric.

Les gallines ponedores es van distribuir en 3 grups aleatoris de 15 animals. Un grup control (sense tractament), un grup tractat amb tilosina A i un grup tractat amb doxiciclina (**figura 8**). Per a cada tractament (control, tilosina A i doxiciclina) i per a cada mostreig (abans o després del període de retirada) es van analitzar 10 mostres, amb un duplicat per a cada paràmetre analític.

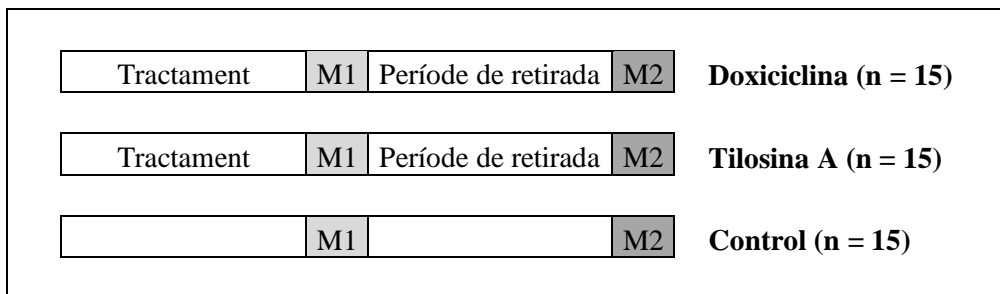


Figura 8 Esquema dels grups d'estudi i dels mostreigs.

M1 = Primer mostreig després de 5 dies de tractament amb antibiòtic (n = 15 x 3).

M2 = Segon mostreig després de 5 dies de període de retirada (n = 15 x 3).

Els tractaments amb antibiòtic es van administrar durant 5 dies consecutius, dissolent les dosis terapèutiques recomanades pel fabricant en aigua de beguda (**taula 4**). Tot i això també es podrien haver administrat a través del pinso, per via intramuscular, per via intravenosa, entre d'altres. La tilosina A es va administrar en forma de tartrat de tilosina, ja que el tartrat de tilosina és més soluble en aigua i s'adsorbeix amb molta facilitat en el tracte digestiu de les gallines i dels pollastres (Iritani et al., 1976). En canvi, la doxiciclina es va administrar en forma d'hiclat de doxiciclina.

El primer mostreig es va realitzar l'endemà d'haver acabat el tractament amb antibiòtic (M1), mentre que el segon es va dur a terme el sisè dia després d'iniciar el període de retirada del tractament (M2). El temps de retirada va ser de 5 dies ja que és el que recomana el fabricant per gallines ponedores i per pollastres. A cada mostreig es va recollir un ou de cada animal.

Els ous recollits a cada mostreig es van refrigerar immediatament a 5 °C. Al llarg de les següents 24 h es van separar, manualment, els rovells de les clares i es van congelar a -80 °C.

Taula 4 Productes comercials dels antibiòtics utilitzats en l'estudi.

Producte comercial	Composició	Dosi terapèutica
ORATIL 100	99-100 % tartrat de tilosina ¹	0,5 g/L
DOXI 100	10 % hidrat de doxiciclina ¹	1 g/L

¹ Fabricat per SP Veterinària, S.A., Riudoms, Espanya.

3.2 ANÀLISI DE LES PROTEÏNES DE LA CLARA D'OU

En aquest treball es va realitzar un estudi preliminar sobre els efectes de l'administració de tilosina A i de doxiciclina en les proteïnes de la clara d'ou. Per una banda es va determinar la concentració total de proteïna mitjançant un mètode colorimètric (Bradford, 1976) i per altra banda es va avaluar el perfil proteic mitjançant l'electroforesi microfluídica amb l'equip Bioanalyser®.

3.2.1 Determinació de la proteïna en la clara d'ou (Bio-Rad)

Per a la determinació de la proteïna de la clara d'ou es va utilitzar un assaig colorimètric de l'empresa Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU), basat en el mètode de Bradford (1976).

3.2.1.1 Fonament

Aquest és un procés simple i acurat que s'utilitza per a la determinació de la concentració total de les proteïnes solubles. En aquest assaig es du a terme una reacció colorimètrica entre les proteïnes solubilitzades i un tint àcid, el Coomassie® Brilliant Blue, formant un compost de color marró-verd en funció de la concentració proteica. L'absorbància del compost format es llegeix a una longitud d'ona de 595 nm.

A l'hora de solubilitzar les proteïnes s'ha de tenir en compte que els reactius utilitzats no creïn interferències en la reacció colorimètrica de l'assaig.

3.2.1.2 *Reactius*

Tots els reactius utilitzats per a la solubilització de les proteïnes, així com l'albumina de sèrum boví (BSA) van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). El reactiu específic per l'assaig de Bio-Rad va ser proporcionat per Bio-Rad (BioRad Laboratories Inc, Hercules, CA, EEUU), mentre que l'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU). Els dissolvents de puresa HPLC van ser proporcionats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos).

3.2.1.3 *Preparació de solucions*

Es va preparar una solució de BSA de 1 g/L amb el tampó de solubilització (urea 7 M, tiourea 2 M, tris 30 mM a pH = 8,5).

3.2.1.4 *Solubilització de les proteïnes de la clara d'ou*

A 1 g de clara d'ou s'hi van afegir 2,5 mL del tampó de solubilització (urea 7 M, tiourea 2 M, tris 30 mM a pH = 8,5). Es van pipetejar 200 µL de la solució i s'hi van afegir 900 µL de tampó de solubilització. Seguidament es va pipetejar una alíquota de 500 µL, es va mesclar amb 3,5 mL d'aigua i es va vortexar.

Aquest extracte proteic tant es va utilitzar per a l'assaig de Bio-Rad com per a l'estudi del perfil proteic mitjançant el Bioanalyser[®] (apartat 3.2.2).

3.2.1.5 *Procediment experimental de l'assaig de Bio-Rad*

Aquest procediment experimental es troba descrit al manual d'usuari Bio-Rad Protein Assay (2008).

A una alíquota de 100 µL de l'extracte proteic s'hi van afegir 5 mL del reactiu diluït de Bio-Rad (reactiu de Bio-Rad:aigua, 20:80, v/v), es va vortexar i es va deixar incubar durant 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es va fer la lectura de l'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm amb un espectrofotòmetre Graphicord UV-240 (Shimadzu, Kyoto, Japó).

3.2.1.6 Quantificació

La determinació de la concentració de proteïna soluble es va dur a terme mitjançant una recta de calibratge, on el contingut proteic corresponia a la BSA. Per fer la recta de calibratge es van preparar diferents nivells de concentració de proteïna i es va realitzar la lectura de l'absorbància ($\lambda = 595$ nm).

3.2.2 Estudi del perfil proteic de la clara d'ou (Bioanalyser®)

Per a l'estudi del perfil de les proteïnes de la clara d'ou es va utilitzar l'estoig d'Agilent anomenat "*Agilent High Sensitivity Protein 250 kit*", que consisteix en una tinció covalent de les proteïnes amb un colorant fluorescent. La separació de les proteïnes segons la seva massa molecular es va realitzar mitjançant el Bioanalyser® (Agilent, Palo Alto, CA, EEUU, **figura 9**).

Aquest estoig permet la separació i la detecció de les proteïnes amb masses moleculars entre 10-250 kDa.

3.2.2.1 *Reactius*

Tots els reactius utilitzats van ser subministrats per Agilent (Palo Alto, CA, EEUU), excepte el DTT que es va adquirir a Sigma-Aldrich i l'aigua ultra pura que es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.2.2.2 *Preparació de solucions*

La solució de tinció fluorescent es va preparar afegint 54 μL de DMSO en el vial que contenia el colorant blau.

La solució desnaturalitzant es va preparar afegint 1,4 μL d'una solució aquosa de DTT (1 M) sobre 40 μL del tampó que contenia l'estoig.

3.2.2.3 *Procediment experimental*

Per a dur a terme aquest mètode es va seguir el procediment experimental descrit pel fabricant (Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide, 2008).

Es van pipetejar 5 μL de l'extracte proteic obtingut a l'apartat 3.2.1.4, s'hi van addicionar 0,5 μL de la solució de tinció fluorescent i es va deixar incubar durant 30 minuts a 1 $^{\circ}\text{C}$. Passat aquest temps es van afegir 0,5 mL d'etanolamina i es va deixar incubar durant 10 minuts a 1 $^{\circ}\text{C}$ per eliminar els excessos del tint fluorescent. Tot seguit es va pipetejar 1 μL de la mescla i es va diluir amb 199 μL d'aigua. A 4 μL de la mescla diluïda s'hi van afegir 2 μL de la solució desnaturalitzant i es va deixar incubar 5 minuts a 98 $^{\circ}\text{C}$. Després de condicionar el xip, es va introduir la mostra (6 μL) al corresponent forat del xip i es va col·locar en el Bioanalyser[®]. Un cop introduït el xip es va iniciar la separació de les proteïnes segons la seva massa molecular, així com la seva detecció.



Figura 9 Bioanalyser® (Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide, 2008).

3.3 EXTRACCIÓ DELS LÍPIDS EN EL ROVELL D'OU

Per a l'extracció lipídica en el rovell d'ou es va utilitzar el mètode descrit per Folch, Lees, & Stanley (1957).

3.3.1 Reactius

Els dissolvents utilitzats eren de puresa HPLC i van ser subministrats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos).

3.3.2 Extracció

1 g de rovell d'ou es va homogeneïtzar amb 50 mL d'una solució de cloroform:metanol (2:1, v/v) durant 30 minuts. La mescla es va filtrar i l'extracció es va repetir. Després d'ajuntar els dos extractes, es va evaporar el dissolvent en un rotavapor i el residu sec es va tornar a dissoldre amb 25 mL de cloroform:metanol (2:1, v/v).

Aquest extracte es va guardar a -80 °C fins que s'utilitzés per a la determinació dels àcids grassos totals i per a la realització del fraccionament lipídic, que permetria la determinació dels triglicèrids, dels àcids grassos lliures i dels fosfolípids (**figura 10**).

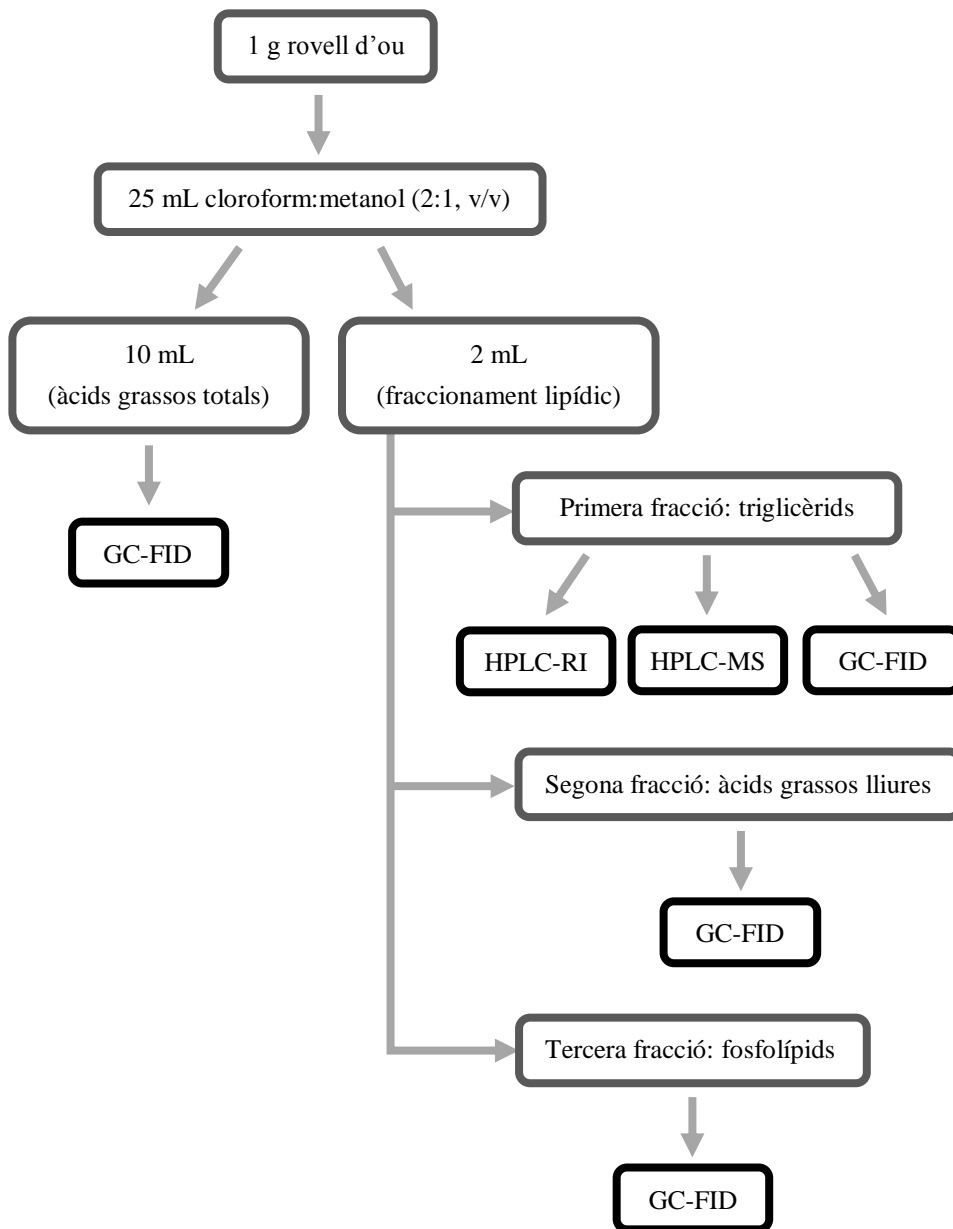


Figura 10 Esquema de les determinacions analítiques realitzades a partir de l'extracte lipídic.

3.4 DETERMINACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS TOTALS EN EL ROVELL D'OU

La determinació dels àcids grassos totals es va realitzar mitjançant una variació del mètode descrit per Mach et al. (2006).

3.4.1 Reactius

Tots els patrons i els reactius van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU). Els dissolvents de puresa HPLC van ser proporcionats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos), mentre que l'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.4.2 Preparació de patrons

Es va preparar una solució de 1 g/L de gliceril tritridecanoat amb cloroform que es va emmagatzemar a -20 °C.

3.4.3 Procediment experimental

Per a dur a terme aquesta determinació es va utilitzar una alíquota de 10 mL de l'extracte lipídic (apartat 3.3 i **figura 10**).

Els 10 mL d'extracte lipídic es van barrejar amb 2 mg de gliceril tritridecanoat (patró intern) i es va evaporar el dissolvent usant una corrent de nitrogen. A continuació es va realitzar una derivatització dels àcids grassos afegint, sobre el residu sec, 2 mL d'hidròxid de potassi (1 N) en metanol i 2 mL de trifluorur de bor-metanol. Aquesta mescla es va escalfar a 90 °C durant 1 hora. Seguidament es van afegir 2 mL de clorur de sodi (10 %), 2 mL d'hexà, per extreure els èsters metilats dels àcids grassos, i es va centrifugar a 2.990 x g durant 5 minuts (Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech,

Osterode/Harz-Germany). 200 µL de la fase amb hexà es van diluir amb 600 µL d'hexà i es va injectar al GC-FID.

3.4.4 Condicions cromatogràfiques

Per analitzar els èsters metilats dels àcids grassos es va utilitzar un cromatògraf de gasos HP 5890 series II equipat amb un detector d'ionització amb flama (GC; Hewlett Packard SA, Barcelona, Espanya) i amb una columna capil·lar de sílice fosa BPX70 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de gruix de fase estacionària; SGE, Milton Keynes, Regne Unit). Les mostres es van injectar en mode *split* a 250 °C amb un cabal de 1 mL/min d'heli (gas portador). El gradient de temperatura es va iniciar a 150 °C durant 1 minut i va créixer de forma lineal (3 °C/min) fins arribar a 200 °C, on es va mantenir durant 13 minuts. La temperatura del detector es va programar a 300 °C.

3.4.5 Identificació i quantificació

Els àcids grassos es van identificar per comparació dels seus temps de retenció a la mostra amb els dels seus corresponents patrons (es va utilitzar una mescla comercial de 37 àcids grassos metilats que va ser subministrada per Sigma-Aldrich, 47885-U).

El percentatge de cadascun dels àcids grassos de la mostra es va calcular respecte el patró intern.

3.5 FRACCIONAMENT LIPÍDIC

El fraccionament lipídic es va realitzar mitjançant una modificació del mètode de Kaluzny, Duncan, Merritt, & Epps (1985).

3.5.1 Reactius

Tots els reactius van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU). Els dissolvents de puresa HPLC van ser proporcionats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos).

3.5.2 Preparació de patrons

Es va preparar una solució de 2 g/L de gliceril tritridecanoat i una altra de 1 g/L d'àcid tridecanoic, totes dues amb cloroform. Aquestes dissolucions es van emmagatzemar a -20 °C.

3.5.3 Procediment experimental

El fraccionament lipídic es va dur a terme a partir de 2 mL de l'extracte lipídic, preparat seguint les indicacions de l'apartat 3.3.2. En aquests 2 mL s'hi van afegir els patrons interns necessaris per a la determinació dels triglicèrids i dels àcids grassos lliures. Per a l'anàlisi dels triglicèrids es va addicionar 1 mL de gliceril tritridecanoat (2 g/L) i pel dels àcids grassos lliures 100 µL d'àcid tridecanoic (1 g/L). El patró intern dels fosfolípids no s'hi va afegir, ja que es va utilitzar el mateix que en la determinació dels triglicèrids (gliceril tritridecanoat) i hauria eluït a la fracció dels triglicèrids en lloc de la dels fosfolípids. Seguidament es va evaporar el dissolvent amb una corrent de nitrogen i el residu sec es va reconstituir amb 1 mL de cloroform.

Per poder realitzar la separació dels lípids es van usar cartutxos d'extracció en fase sòlida Bond Elut NH₂ (500 mg, 3 mL, Varian) que es van activar fent passar 10 mL d'hexà. Tot seguit es va preparar el tub per recollir els triglicèrids i es va carregar la mostra al cartutx. El dissolvent de la càrrega es va recollir juntament amb els 9 mL de la solució de cloroform:isopropanol (2:1, v/v) que es van utilitzar per a l'elució dels triglicèrids retinguts al cartutx. Seguidament es van eluir els àcids grassos lliures amb 10 mL d'una solució de dietil èter:àcid acètic (98:2, v/v) i finalment es van fer passar 10 mL d'una solució de metanol:àcid clorhídric-metanol (3 N) (97:3, v/v) per eluir els fosfolípids. Totes les fraccions es van guardar a -80 °C fins que s'analitzessin.

Abans de dur a terme el fraccionament lipídic de les mostres d'estudi es van realitzar unes proves prèvies per adaptar el procediment a les mostres de rovell d'ou. En aquestes proves es va observar que una part dels triglicèrids no es retenien al cartutx, sinó que s'eluien juntament amb la càrrega de la mostra.

3.6 CARACTERITZACIÓ DELS TRIGLICÈRIDS EN EL ROVELL D'OU

Per determinar els triglicèrids del rovell d'ou es van utilitzar diferents mètodes que van proporcionar informacions complementaries.

Per una banda es van identificar i confirmar els triglicèrids a través de la HPLC-MS, mentre que la seva quantificació es va realitzar mitjançant la HPLC-RI. A més, també es van analitzar els àcids grassos que formaven part de la fracció dels triglicèrids mitjançant la GC-FID.

3.6.1 Reactius

Tots els reactius necessaris per a dur a terme aquesta determinació van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU), excepte els patrons dels triglicèrids que van ser proporcionats per Larodan (Malmö, Suècia). D'altra banda, els dissolvents de puresa HPLC van ser subministrats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos).

3.6.2 Preparació de patrons

Es va preparar una solució de 1 g/L amb cloroform per a cadascun dels triglicèrids. Aquestes dissolucions es van guardar a -20 °C.

3.6.3 Procediment experimental

Per aquesta determinació es va utilitzar la primera fracció que es va obtenir del fraccionament lipídic (apartat 3.5).

El residu sec, que es va obtenir després d'evaporar fins a sequedat els 10 mL de la fracció de cloroform:isopropanol (2:1, v/v) mitjançant una corrent de nitrogen, es va dissoldre amb 2 mL d'acetona. Aquests 2 mL es van separar en 3 alíquotes, una per a cada analítica (**figura 11**).

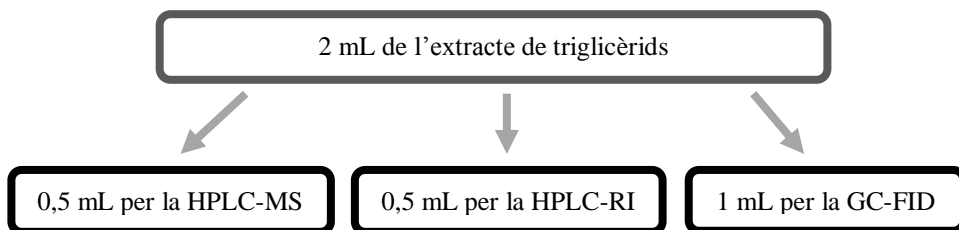


Figura 11 Esquema de les determinacions analítiques realitzades a partir de l'aliquota destinada a l'extracte de triglicèrids.

3.6.4 Identificació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-MS

Per a la identificació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-MS es va utilitzar una modificació del mètode descrit per Diaz, Garcia Regueiro, Casillas, & De Pedro (1996).

3.6.4.1 Preparació de patrons

Procediment descrit a l'apartat 3.6.2.

3.6.4.2 Preparació de l'extracte

L'alíquota destinada per aquesta determinació (0,5 mL, apartat 3.6.3) es va mesclar amb 0,5 mL d'acetona, es va filtrar amb un filtre de membrana de PTFE 0,45 µm i es va injectar al HPLC-MS.

3.6.4.3 Condicions cromatogràfiques

Per a la determinació dels triglicèrids es va utilitzar un Agilent de la sèrie 1200 (Palo Alto, CA, EEUU), equipat amb una bomba binària i acoblat a un detector d'espectrometria de masses amb un quadrupol com a analitzador (Model 6120, Agilent).

La separació cromatogràfica es va dur a terme en una columna LiChrospher 100 RP-18 encapped (4 x 250 mm, 5 µm de diàmetre de partícula; Merck, Darmstadt, Alemanya) amb un cabal de 1,2 mL/min i amb una temperatura de la columna i del detector de 25 °C i 35 °C, respectivament. La fase mòbil A va ser acetonitril i la fase mòbil B acetona:2-propanol (50:50, v/v). El gradient es va iniciar amb un 40 % de fase mòbil B i va anar augmentant de forma lineal fins a un 70 % de B en 35 minuts.

L'espectròmetre de masses va operar amb un mètode d'ionització química a pressió atmosfèrica en mode positiu (APCI⁺), amb un voltatge del capil·lar de 3.000 V i una corrent de corona de 4 µA. El nitrogen es va utilitzar com a gas de nebulització amb un cabal de 5 L/min, amb una pressió de 50 psi i amb una temperatura de 300 °C. La temperatura de vaporització es va programar a 400 °C. Es va treballar amb mode *scan* entre *m/z* 250-900, amb un voltatge del fragmentador de 20.

3.6.4.4 Identificació

Utilitzant aquesta tècnica instrumental es van poder identificar els triglicèrids mitjançant la comparació del temps de retenció, de la massa molecular i de l'espectre de fragmentació, entre la mostra i els respectius patrons.

3.6.5 Determinació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-RI

El mètode que es va utilitzar era una modificació del mètode usat per a la identificació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-MS.

3.6.5.1 Preparació de patrons

Procediment descrit a l'apartat 3.6.2.

3.6.5.2 Preparació de l'extracte

L'alíquota destinada per aquesta determinació (0,5 mL, apartat 3.6.3) es va filtrar amb un filtre de membrana de PTFE 0,45 µm i es va injectar directament al HPLC-RI.

3.6.5.3 Condicions cromatogràfiques

Per analitzar els triglicèrids es va utilitzar un cromatògraf de líquids de Waters equipat amb una bomba 515 HPLC Pump Water i amb un detector d'índex de refracció 2410 (Waters Corp, Milford, MA, EEUU).

La separació cromatogràfica es va dur a terme en una columna LiChrospher 100 RP-18 encapped (4 x 250 mm, 5 µm de diàmetre de partícula; Merck, Darmstadt, Alemanya), amb un cabal de 1,2 mL/min i amb una temperatura de la columna i del detector de 35 °C. La fase mòbil utilitzada estava composta per acetonitril:acetona (50:50, v/v) i la separació es va realitzar amb condicions isocràtiques.

3.6.5.4 Identificació i quantificació

Cadascun dels triglicèrids es va identificar per comparació del seu temps de retenció a la mostra amb el del seu patró.

La quantificació es va realitzar mitjançant una recta de calibratge externa amb diferents nivells de concentració de patró per a cada compost d'estudi.

3.6.5.5 *Límit de detecció i de quantificació*

El límit de detecció es va estimar com la concentració d'un compost, corresponent a la relació senyal / soroll igual a 3.

El límit de quantificació es va estimar com la concentració d'un compost, corresponent a la relació senyal / soroll igual a 10.

3.6.6 Determinació dels àcids grassos dels triglicèrids mitjançant la GC-FID

Aquest mètode es va optimitzar a partir del mètode descrit per Mach et al. (2006).

3.6.6.1 Preparació de l'extracte

L'alíquota destinada per aquesta determinació (1 mL, apartat 3.6.3) es va evaporar fins a sequedat amb una corrent de nitrogen. Sobre el residu sec es van afegir 2 mL d'hidròxid de potassi (1 N) en metanol, 2 mL de trifluorur de bor-metanol i es va escalfar a 90 °C durant 1 hora. Després de deixar-ho refredar a temperatura ambient s'hi van afegir 2 mL de clorur de sodi (10 %) i 2 mL d'hexà. Una vegada centrifugat a 2.990 x g durant 5 minuts (Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech, Osterode/Harz-Germany), la fase amb hexà, que contenia els èsters metilats dels àcids grassos provinents dels triglicèrids, es va injectar al GC-FID.

3.6.6.2 Condicions cromatogràfiques

Per analitzar els èsters metilats dels àcids grassos es va utilitzar un cromatògraf de gasos HP 5890 series II equipat amb un detector d'ionització amb flama (Hewlett Packard SA, Barcelona, Espanya) i amb una columna capil·lar de sílice fosa BPX70 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de gruix de fase estacionària; SGE, Milton Keynes, Regne Unit). Les mostres es van injectar amb mode split a 250 °C amb una pressió de 133 kPa d'hidrogen (gas portador). El gradient de temperatura es va iniciar a 100 °C durant 1 min i va créixer de forma lineal (3 °C/min) fins arribar a 210 °C, on es va mantenir durant 12,3 minuts. La temperatura del detector es va programar a 280 °C.

3.6.6.3 *Identificació i quantificació*

Els àcids grassos es van identificar per comparació dels seus temps de retenció a la mostra amb els d'una mescla comercial de 37 àcids grassos metilats que va ser subministrada per Sigma-Aldrich, 47885-U.

El percentatge de cadascun dels àcids grassos de la mostra es va calcular respecte el patró intern (gliceril tritridecanoat). En aquest cas, l'addició del patró intern sobre les mostres es va realitzar abans del fraccionament lipídic.

3.7 DETERMINACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS LLIURES EN EL ROVELL D'OU

El mètode que es va utilitzar per a la determinació dels àcids grassos lliures en el rovell de l'ou va ser una modificació del mètode usat en la determinació dels àcids grassos totals (apartat 3.4).

3.7.1 Reactius

Els reactius i patrons van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU), mentre que els dissolvents de puresa HPLC van ser proporcionats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos). L'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.7.2 Procediment experimental

Per a dur a terme aquesta determinació es va utilitzar la segona fracció que es va obtenir en el fraccionament lipídic (apartat 3.5).

Sobre el residu sec, obtingut després d'haver evaporat fins a sequedat els 10 mL de la fracció de dietilèter mitjançant una corrent de nitrogen, es van afegir 2 mL de trifluorur de bor-metanol i es va escalfar a 90 °C durant 1 hora. Quan s'havia refredat es van afegir 2 mL de clorur de sodi (10 %), 1 mL d'hexà i es va centrifugar a 2.990 x g durant 5 minuts (Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech, Osterode/Harz-Germany). Finalment, la fase que contenia l'hexà es va injectar al GC-FID.

3.7.3 Condicions cromatogràfiques

Les condicions cromatogràfiques utilitzades van ser les mateixes que en la determinació dels àcids grassos totals (apartat 3.4.4).

3.7.4 Identificació i quantificació

Els àcids grassos es van identificar per comparació dels seus temps de retenció a les mostres amb els dels seus corresponents patrons (mescla comercial de 37 àcids grassos metilats que va ser subministrada per Sigma-Aldrich, 47885-U).

El percentatge de cadascun dels àcids grassos de la mostra es va calcular respecte el patró intern (àcid tridecanoic). En aquest cas, l'addició del patró intern sobre les mostres es va realitzar abans del fraccionament lipídic.

3.8 DETERMINACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS DE LA FRACCIÓ DELS FOSFOLÍPIDS EN EL ROVELL D'OU

Per a la determinació dels àcids grassos procedents de la fracció dels fosfolípids del rovell de l'ou es va utilitzar una variació del mètode usat en la determinació dels àcids grassos totals (apartat 3.4).

3.8.1 Reactius

Tots els patrons i els reactius van ser proporcionats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU), mentre que els dissolvents de puresa HPLC van ser subministrats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos). L'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.8.2 Preparació de patrons

Es va preparar una solució de 1 g/L de gliceril tritridecanoat amb cloroform i es va emmagatzemar a -20 °C.

3.8.3 Procediment experimental

Per aquesta determinació es va utilitzar la tercera fracció que es va obtenir en el fraccionament lipídic (apartat 3.5).

A 10 mL de la fracció de metanol:àcid clorhídric (3N amb metanol) s'hi van afegir 500 µL d'una solució de gliceril tritridecanoat (patró intern) i es va evaporar fins a sequedat, mitjançant una corrent de nitrogen. Seguidament es va dissoldre el residu sec amb 2 mL de cloroform i es va tornar a evaporar fins a sequedat. Posteriorment es va realitzar una derivatització dels àcids grassos afegint, sobre el residu sec, 2 mL

d'hidròxid de potassi (1 N) en metanol i 2 mL de trifluorur de bor-metanol. Aquesta mescla es va escalfar a 90 °C durant 1 hora. Tot seguit es van afegir 2 mL de clorur de sodi (10 %), 2 mL d'hexà i es va centrifugar a 2.990 x g durant 5 minuts (Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech, Osterode/Harz-Germany). La fase amb hexà, que contenia els èsters metilats dels àcids grassos, es va injectar al GC-FID.

3.8.4 Condicions cromatogràfiques

Les condicions cromatogràfiques usades van ser les mateixes que en la determinació dels àcids grassos corresponents a la fracció dels triglicèrids (apartat 3.6.6.2).

3.8.5 Identificació i quantificació

Els àcids grassos es van identificar per comparació dels seus temps de retenció a les mostres de rovell d'ou amb els dels seus corresponents patrons (mescla comercial de 37 àcids grassos metilats que va ser subministrada per Sigma-Aldrich, 47885-U).

El percentatge de cadascun dels àcids grassos de la mostra es va calcular respecte el patró intern (gliceril tritridecanoat). En aquest cas, l'addició del patró intern es va dur a terme abans de començar la saponificació dels fosfolípids.

3.9 DETERMINACIÓ DEL COLESTEROL EN EL ROVELL D'OU

La determinació del colesterol es va dur a terme mitjançant una modificació dels mètodes descrits per Cayuela, Garrido, Banon, & Ros (2003) i Maraschiello, Diaz, & Regueiro (1996).

3.9.1 Reactius

Tots els reactius i els patrons van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU). Els dissolvents de puresa HPLC van ser proporcionats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos) i l'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU)

3.9.2 Preparació de patrons

Es va preparar una solució de 1 g/L de colesterol i una altra de 1 g/L de 5- α -colestanol, totes dues amb cloroform. Aquestes dissolucions es van conservar a -20 °C.

3.9.3 Extracció

A 100 mg de rovell d'ou s'hi va afegir 1 mL de la solució concentrada (1 mg/mL) de 5 α -colestan-3 β -ol (patró intern) i es va evaporar fins a sequedat. A continuació es va dur a terme la reacció de saponificació, afegint 7,3 mL de la solució de saponificació (hidròxid de potassi 1 N en etanol:aigua, 55:45 v/v) i escalfant-ho en un bany d'aigua a 80 °C durant 15 minuts. Quan la solució s'havia refredat, s'hi van afegir 1,5 mL d'aigua, 3 mL d'etanol, 3 mL d'hexà i es va centrifugar a 272 \times g durant 10 minuts (Megafuge 1.0 Heraeus Sepatech, Osterode/Harz-Germany). De la fase superior (hexà) es va pipetejar una alíquota de 1,5 mL i es va evaporar amb

nitrogen fins a sequedat. Un cop evaporat es va dissoldre el residu sec amb 1,5 mL de fase mòbil, acetonitril:acetona (50:50, v/v), es va filtrar amb un filtre de membrana de PTFE de 0,45 µm i es va injectar al HPLC-RI.

3.9.4 Condicions cromatogràfiques

L'anàlisi es va realitzar en un Waters equipat amb una bomba 515 HPLC Pump Water i amb un detector d'índex de refracció 2410 (Waters Corp, Milford, MA, EEUU). La separació es va dur a terme amb condicions isocràtiques (acetonitril:acetona (50:50, v/v)), en una columna Nucleosil 100-5 C18 (4 x 250 mm, 5 µm de diàmetre de partícula; Agilent, Palo Alto CA, EEUU) amb un cabal de 1,2 mL/min i amb una temperatura de la columna i del detector de 35 °C.

3.9.5 Identificació i quantificació

El colesterol es va identificar mitjançant la comparació entre el temps de retenció a la mostra i el del seu patró.

Per a la seva quantificació es va utilitzar una recta de calibratge amb patró intern, obtinguda addicionant 1 mg de patró intern a totes les solucions de colesterol utilitzades per a l'elaboració de la recta de calibratge.

3.9.6 Recuperació del mètode

La recuperació del mètode es va calcular seguint la fórmula següent:

$$\% recuperació = \frac{X}{Y} \times 100$$

X = Increment de l'àrea en la mostra fortificada = $A_F - A_C$.

A_F = Àrea de la mostra fortificada amb una concentració coneguda del patró.

A_C = Àrea de la mostra sense fortificar.

Y = Àrea del patró que correspon a la mateixa concentració de fortificació de la mostra.

El procés de fortificació es va realitzar abans d'iniciar el procediment experimental.

3.9.7 Repetibilitat del mètode

La repetibilitat intradia del mètode d'anàlisi es va calcular analitzant tres extractes diferents de tres mostres de rovell d'ou en un mateix dia (n = 9).

En canvi, la repetibilitat interdia es va calcular analitzant tres mostres de rovell d'ou durant tres dies consecutius (n = 9).

3.9.8 Exactitud del mètode

Per calcular l'exactitud del mètode es van analitzar diverses mostres fortificades amb quantitats conegudes de patró. Posteriorment es va relacionar la concentració obtinguda del patró, segons la recta de calibratge, amb la concentració teòrica del patró afegida a la mostra fortificada.

L'exactitud es va calcular segons:

$$\% \text{ exactitud} = \frac{X}{Y} \times 100$$

X = Concentració de patró afegida a la mostra segons la recta de calibratge.

Y = Concentració teòrica de patró afegida a la mostra.

3.9.9 Límit de detecció i de quantificació

Tant el límit de detecció com el límit de quantificació es van calcular seguint el procés descrit a l'apartat 3.6.5.5.

3.10 DETERMINACIÓ DE L'ÀCID 5-MTHF EN EL ROVELL D'OU

La determinació de l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic (5-MTHF) es va realitzar mitjançant una adaptació dels mètodes descrits per Doherty & Beecher (2003) i Jastrebova, Witthoft, Grahn, Svensson, & Jagerstad (2003).

3.10.1 Reactius

Tots els patrons i els reactius van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU). Els dissolvents de puresa HPLC van ser proporcionats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos), mentre que l'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU)

3.10.2 Preparació de patrons

Es va preparar una solució de 1 g/L d'àcid 5-metiltetrahidrofòlic amb tampó d'extracció (apartat 3.10.3). Aquesta dissolució es va conservar a -20 °C.

3.10.3 Extracció

500 mg de rovell d'ou es van homogeneïtzar amb 10 mL de tampó d'extracció (0,1 M tampó fosfat pH 6, amb 10 mM d'àcid ascòrbic i 10 mM 2-mercaptoetanol) i es van posar en un bany d'aigua a 100 °C durant 10 minuts. Un cop refredat l'extracte, es va centrifugar a 27.200 x g, a 4 °C durant 10 minuts (Beckman J2-MC, Palo Alto, CA, EEUU) i es van transferir 5 mL del sobrenedant en dos tubs diferents (protocol 1 o protocol 2).

3.10.3.1 *Protocol 1 (amb tractament enzimàtic)*

En aquest protocol es va utilitzar un tractament enzimàtic amb sèrum de rata (R9759, Sigma-Aldrich) per estudiar si el rovell d'ou contenia formes poliglutamades de folats.

En els 5 mL d'extracte s'hi van afegir 100 µL de sèrum de rata i es va deixar incubar durant 2 hores en un bany d'aigua a 37 °C. Finalitzat aquest temps es va submergir en un bany d'aigua a 100 °C durant 5 minuts, per aturar l'activitat enzimàtica, i es va refredar en gel. Quan l'extracte ja s'havia refredat es va centrifugar a 3.220 x g durant 15 segons (Beckman J2-MC, Palo Alto, CA, EEUU) i es va separar el residu sòlid del sobrenedant. Aquest sobrenedant es va reservar fins al procés de purificació.

3.10.3.2 *Protocol 2 (sense tractament enzimàtic)*

Els 5 mL d'extracte es van purificar sense cap tractament previ.

3.10.4 **Purificació**

La purificació es va dur a terme amb els cartutxos d'intercanvi aniònic fort, ISOLUTE SAX (500 mg, 6 mL, Biotage, EEUU). Aquests cartutxos es van condicionar fent passar 10 mL de metanol, 5 mL d'aigua i 5 mL de tampó d'extracció. Un cop condicionats, es va carregar la mostra, procedent del protocol 1 o 2, i es va rentar amb 5 mL de tampó d'extracció. L'elució de l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic es va realitzar amb 10 mL de tampó d'elució (0,1 M tampó acetat de sodi pH 4, amb 1 % d'àcid ascòrbic, 10 % de clorur de sodi i 0,1 % de 2-mercaptoetanol). L'eluat es va filtrar amb un filtre de membrana de niló de 13 mm de diàmetre i 0,22 µm de porus (Teknokroma, St. Cugat del Vallès, Espanya) i es va injectar en el HPLC-FLD.

3.10.5 Condicions cromatogràfiques

L'equip utilitzat va ser un Waters equipat amb una bomba binària 1525 i amb un detector de fluorescència 2475 (Waters Corp., Milford, MA, EEUU). La longitud d'ona d'excitació es va programar a 290 nm i la d'emissió a 360 nm. La separació cromatogràfica es va dur a terme a través d'una columna XBridge Shield C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm de diàmetre de partícula) de Waters, a 30 °C i amb un cabal de 1,1 mL/min. El gradient utilitzat es va iniciar amb un 100 % de la fase mòbil A (H₃PO₄ 0,04 % :metanol, 95:5, v/v) i es va incrementar de forma lineal fins al 30 % de fase mòbil B (0,04 % H₃PO₄ en metanol) en 15 minuts.

3.10.6 Identificació i quantificació

L'àcid 5-metiltetrahidrofòlic es va identificar comparant el temps de retenció a la mostra amb el del seu patró.

La quantificació es va dur a terme mitjançant una recta de calibratge obtinguda a partir de mostres fortificades amb diferents concentracions de patró. La fortificació es va realitzar abans de l'extracció, afegint una quantitat coneguda de patró a la mostra.

3.10.7 Recuperació del mètode

La recuperació d'aquest mètode d'anàlisi va ser calculada seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.6.

3.10.8 Repetibilitat del mètode

Tant la repetibilitat intradia com la repetibilitat interdia d'aquest mètode d'anàlisi es van calcular seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.7.

3.10.9 Exactitud del mètode

L'exactitud del mètode d'anàlisi es va determinar seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.8.

3.10.10 Límit de detecció i de quantificació

Tant el límit de detecció com el límit de quantificació es van calcular seguint el procés descrit a l'apartat 3.6.5.5.

3.11 DETERMINACIÓ DE CAROTENOIDES, α -TOCOFEROL I RETINOL EN EL ROVELL D'OU

La determinació de carotenoides, d' α -tocoferol i de retinol es va realitzar mitjançant un mètode de HPLC-DAD-FLD.

3.11.1 Reactius

Els patrons de luteïna, retinol, α -tocoferol juntament amb la resta de reactius van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU), excepte la cantaxantina que es va obtenir de CaroteNature (Lupsingen, Suïssa) i la zeaxantina que la va proporcionar Extrasynthese (Genay Cedex, França). Tots els dissolvents de puresa HPLC van ser subministrats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos) i l'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.11.2 Preparació de patrons

Es van preparar unes solucions de 1 g/L de retinol, de 50 mg/L de luteïna, de 50 mg/L de zeaxantina, de 50 mg/L de cantaxantina i de 200 mg/L d' α -tocoferol amb acetonitril. Totes aquestes dissolucions es van conservar a -20 °C.

3.11.3 Extracció

L'extracció dels carotenoides, del retinol i de l' α -tocoferol en el rovell d'ou es va realitzar mitjançant una adaptació del mètode d'extracció descrit per Karppi, Nurmi, Olmedilla-Alonso, Granado-Lorencio, & Nyysönen (2008).

Durant tot el procés d'extracció es va treballar en condicions de llum tènue. 1 mL d'etanol amb 0,01 % de butil-hidroxitoluè (BHT) es va mesclar amb 200 mg de rovell d'ou. Després de l'homogeneïtzació es van afegir 2 mL d'hexà, 500 µL de clorur de sodi (5 %, p/v) i es va centrifugar a $1.580 \times g$, a 4 °C durant 5 minuts (Beckman J2-MC, Palo Alto, EEUU). Es va separar la fase d'hexà i l'extracció es va repetir dues vegades més. Un cop combinades les fraccions d'hexà de les tres extraccions, es va evaporar el dissolvent amb una corrent de nitrogen fins a sequedat. Posteriorment es va reconstituir el residu sec i es va injectar al HPLC-DAD-FLD.

3.11.4 Proves de reconstitució

Abans de l'anàlisi de les mostres es van estudiar diferents condicions per a la reconstitució dels compostos d'interès.

Les condicions de reconstitució avaluades van ser:

1. + 500 µL d'acetonitril
2. + 750 µL d'acetonitril
3. + 2.000 µL d'acetonitril
4. + 750 µL d'acetonitril: tetrahidrofur (80:20)
5. + 1.500 µL d'acetonitril: tetrahidrofur (80:20)

3.11.5 Condicions cromatogràfiques

Per a la determinació dels carotenoides, del retinol i de l' α -tocoferol es va utilitzar un Agilent de la sèrie HP1100 (Palo Alto, CA, EEUU), equipat amb una bomba quaternària i amb un detector de sèrie de díodes i un detector de fluorescència (FLD, Model 1046 A, Hewlett Packard) en sèrie. Les longituds d'ona programades al DAD van ser 325 nm pel retinol i

445 nm pels carotenoides, mentre que en el FLD es va programar una $\lambda_{\text{excitació}} = 280 \text{ nm}$ i una $\lambda_{\text{emissió}} = 330 \text{ nm}$ per l' α -tocoferol.

La separació cromatogràfica va ser optimitzada a partir del mètode descrit per Karadas, Surai, Sparks, & Grammenidis (2005). En aquest cas es va utilitzar una columna Luna C18 100 A (150 mm x 3 mm, 3 μm de diàmetre de partícula; Phenomenex, Torrance, EEUU) amb un cabal de 0,5 mL/min. Les fases mòbils usades van ser: acetonitril (A), acetonitril:tetrahidrofuran (40:60, v/v, B) i aigua (C). L'elució es va realitzar mantenint la composició de la fase mòbil inicial (90 % A, 10 % C) durant els primers tres minuts. Llavors, es va variar linealment la composició fins al 80 % A i al 20 % B en 7 minuts i tot seguit, mitjançant un altre gradient lineal, es va arribar a una composició del 15 % de A i del 85 % de B en 20 minuts.

3.11.6 Identificació i quantificació

Els anàlits es van identificar comparant els seus temps de retenció i els seus espectres d'ultraviolat a les mostres de rovell d'ou amb els dels seus patrons.

La quantificació es va dur a terme mitjançant una recta de calibratge per a cada compost, obtinguda a partir de mostres fortificades amb diverses concentracions de cadascun dels patrons. La fortificació es va realitzar abans de l'extracció, afegint una quantitat coneguda de patró a la mostra.

3.11.7 Recuperació del mètode

La recuperació d'aquest mètode d'anàlisis va ser calculada seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.6.

3.11.8 Repetibilitat del mètode

Tant la repetibilitat intradia com la repetibilitat interdia d'aquest mètode d'anàlisi es van calcular seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.7.

3.11.9 Exactitud del mètode

L'exactitud del mètode d'anàlisi es va determinar seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.8.

3.11.10 Límit de detecció i de quantificació

Tant el límit de detecció com el límit de quantificació es van calcular seguint el procés descrit a l'apartat 3.6.5.5.

3.12 DETERMINACIÓ DE L'OXIDACIÓ LIPÍDICA EN EL ROVELL D'OU

Per a la determinació de l'oxidació lipídica en el rovell d'ou es va utilitzar el test de l'àcid tiobarbitúric (TBA) no induït i induït.

3.12.1 Reactius

Tots els reactius van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU), excepte l'aigua ultra pura que es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.12.2 Determinació de l'oxidació lipídica del rovell d'ou mitjançant el test del TBA no induït

El test del TBA no induït que es va provar en aquest treball va ser una modificació del mètode descrit prèviament per Buege & Aust (1978).

300 mg de rovell d'ou es van homogeneïtzar amb 4 mL de la solució aquosa de TBA (26 mM d'àcid tiobarbitúric, 0,92 M d'àcid tricloroacètic, 0,8 M d'àcid clorhídric) i es va incubar en un bany d'aigua bullent durant 10 minuts. Un cop refredat, es va centrifugar a 1.940 x g durant 25 minuts (Beckman J2-MC, Palo Alto, CA, EEUU) i es va fer la lectura de l'absorbància del sobrenedant a una longitud d'ona de 532 nm en un espectrofotòmetre Graphicord UV-240 (Shimadzu, Kyoto, Japó).

3.12.3 Determinació de l'oxidació lipídica del rovell d'ou mitjançant el test del TBA induït

En aquest cas l'oxidació lipídica va ser mesurada utilitzant una variació del mètode descrit per Kornbrust & Mavis (1980), publicada per Carreras et al. (2004).

600 mg de rovell d'ou es van homogeneïtzar amb 6,75 mL de clorur de potassi (1,15 %). En un tub s'hi van afegir 500 µL de tampó trizma-maleat (80 mM, pH = 7,4), 200 µL d'àcid ascòrbic (2 mM), 200 µL de sulfat ferrós (5 mM) i 100 µL de l'homogeneïtzat obtingut. La mescla es va incubar a 37 °C durant 60 minuts en un bany d'aigua amb agitació. A continuació es van afegir 2 mL de la solució aquosa de TBARS (26 mM d'àcid tiobarbitúric, 0,92 M d'àcid tricloroacètic, 0,8 M d'àcid clorhídric) i es va posar en un bany d'aigua bullent durant 15 minuts. Un cop refredat, es va centrifugar a 1.940 x g, a 4 °C durant 15 minuts (Beckman J2-MC, Palo Alto, CA, EEUU) i el sobrenedant es va transvasar en un altre tub per poder-lo vortexar i eliminar totes les bombolles. La solució es va llegir a una longitud d'ona de 532 nm amb un espectrofotòmetre Graphicord UV-240 (Shimadzu, Kyoto, Japó).

3.12.4 Quantificació

La quantificació de l'oxidació lipídica es va realitzar mitjançant la llei de Lambert-Beer (Concentració = Absorbància / $\epsilon \cdot l$), on l'absortivitat molar del MDA (ϵ) és de $1,56 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ i el camí òptim recorregut per la llum (l) és de 1 cm.

L'oxidació lipídica es va expressar com a mmols d'equivalents de MDA per kg de rovell d'ou.

3.12.5 Repetibilitat del mètode

Tant la repetibilitat intradia com la repetibilitat interdia del test del TBA induït es van calcular seguint el procediment descrit a l'apartat 3.9.7.

3.13 DETERMINACIÓ DELS RESIDUS DE TILOSINA A I DE DOXICICLINA EN EL ROVELL I LA CLARA D'OU

Per a la determinació dels residus antibiòtics es van utilitzar dos mètodes diferents. Un per a l'anàlisi de la tilosina A i la doxiciclina en el rovell d'ou i per a l'anàlisi de la doxiciclina en la clara d'ou, i un altre mètode per a l'anàlisi de la tilosina A en la clara d'ou.

3.13.1 Reactius

Tots els patrons i els reactius van ser subministrats per Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EEUU). Els dissolvents de puresa HPLC van ser proporcionats per J.T.Baker (Deventer, Països Baixos), mentre que l'aigua ultra pura es va produir al laboratori mitjançant un sistema de purificació d'aigua MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

3.13.2 Preparació de patrons

Es van preparar solucions de 500 mg/L amb metanol per a cada antibiòtic d'estudi.

3.13.3 Extracció de la doxiciclina en el rovell i en la clara d'ou i extracció de la tilosina A en el rovell d'ou

Aquest procediment és una modificació del mètode descrit per Heller, Nochetto, Rummel, & Thomas (2006).

1 g de rovell o clara d'ou es va mesclar amb 100 µL d'EDTA (0,1 M), 1 mL d'aigua i 9 g de solució d'extracció (100 mM de tampó succinat a pH = 3,5:metanol, 30:70, v/v). A continuació es van afegir 3 mL d'hexà i es va centrifugar a $1.940 \times g$, a 4 °C durant 15 minuts (Beckman J2-MC,

Palo Alto, EEUU). Una vegada centrifugat, es va agafar una alíquota de 2 g de la fase metanòlica i s'hi van afegir 4 mL d'acetona. Es va centrifugar amb les mateixes condicions anteriors i el sobrenedant es va evaporar fins a sequedat, mitjançant una corrent de nitrogen. Posteriorment el residu sec es va dissoldre amb 750 µL de la fase mòbil A (àcid fòrmic 0,1 %:acetonitril, 95:5, v/v) i es va injectar al UPLC-MS/MS[®] (Waters Corp., Milford, EEUU).

Abans de realitzar l'anàlisi de les mostres es va optimitzar el dissolvent orgànic utilitzat en la solució d'extracció. Els dissolvents estudiats van ser el metanol i l'acetonitril.

- Solució d'extracció 1: 100 mM de tampó succinat a pH = 3,5:metanol, 30:70, v/v.
- Solució d'extracció 2: 100 mM de tampó succinat a pH = 3,5:acetonitril, 30:70, v/v.

Per a la comparació de les dues solucions d'extracció es van utilitzar tres extractes, per a cada solució d'extracció, d'una mostra de rovell d'ou fortificats amb tilosina A i doxiciclina.

3.13.4 Extracció de la tilosina A en la clara de l'ou

Al realitzar l'extracció de la tilosina A en la clara d'ou amb el mètode descrit a l'apartat 3.13.3 es va observar que aquest compost no s'extreia correctament. Per millorar la seva extracció es van estudiar tres mètodes diferents:

- Protocol 1: precipitació de les proteïnes mitjançant un dissolvent orgànic, l'acetonitril.

- Protocol 2: utilització d'un agent reductor (per trencar els enllaços disulfur), d'un agent alquilant i d'un enzim per a la digestió de les proteïnes.
- Protocol 3: es va seguir el mateix procediment que el protocol 2, però sense la digestió de les proteïnes mitjançant un enzim.

3.13.4.1 Protocol 1

Aquest protocol és una modificació del mètode descrit per Bogialli, Ciampanella, Curini, Di Corcia, & Lagana (2009).

1 g de clara d'ou es va mesclar amb 9 g d'acetonitril i es va centrifugar a $1.940 \times g$, a 4 °C durant 15 minuts (Beckman J2-MC, Palo Alto, EEUU). Es va agafar una alíquota de 1 g del sobrenedant, s'hi van afegir 4 mL d'àcid fòrmic 0,1 % i es va injectar al UPLC-MS/MS[®] (Waters Corp., Milford, EEUU).

3.13.4.2 Protocol 2

Aquest procés d'extracció és una modificació del mètode descrit per Yue, Li, Liang, Dong, Dong, & Zhong (2010).

A 1 g de clara d'ou s'hi van afegir 280 µL de DTT (10 g/L de DTT dissolts amb una solució aquosa de 20 mM d'hidrogencarbonat d'amoni), es va vortexar i es va deixar durant una hora en un bany d'aigua a 37 °C. A continuació s'hi van afegir 400 µL de iodoacetamida (20 g/L), es va vortexar i es va deixar a temperatura ambient durant dues hores i a les fosques. Un cop les proteïnes es trobaven reduïdes i alcalinitzades, es van addicionar 400 µL de tripsina (10 g/L dissolts amb un tampó de trizma a pH = 7,6 amb presència de clorur de calci, per evitar l'autòlisi de la tripsina) i es va deixar incubar durant tota la nit en un bany d'aigua a 37 °C.

Després de la digestió amb tripsina, es va mesclar amb 9 g d'acetonitril i es va seguir el mateix procediment que el protocol 1 (apartat 3.13.4.1).

3.13.4.3 Protocol 3

Aquest mètode segueix el mateix protocol de l'apartat 3.13.4.2, però sense l'addició de la tripsina.

A 1 g de clara d'ou s'hi van afegir 280 µL de DTT (10 g/L de DTT dissolts amb una solució aquosa de 20 mM d'hidrogencarbonat d'amoni), es va vortexar i es va deixar durant una hora en un bany d'aigua a 37 °C. A continuació s'hi van afegir 400 µL de iodoacetamida (20 g/L), es va vortexar i es va deixar a temperatura ambient durant dues hores i a les fosques. Un cop les proteïnes es trobaven reduïdes i alcalinitzades, es va mesclar amb 9 g d'acetonitril i es va seguir el mateix procediment que el protocol 1 (apartat 3.13.4.1).

3.13.5 Condicions cromatogràfiques

Per a la separació de la tilosina A i de la doxiciclina es va utilitzar un UPLC[®] Acquity equipat amb un detector de sèrie de díodes i un triple quadrupol, UPLC-DAD-MS/MS[®], (Waters Corp., Milford, MA). La separació cromatogràfica es va dur a terme mitjançant una columna BEH Shield RP18 (1,0 x 150 mm, 1,7 µm de diàmetre de partícula) a 35 °C amb un cabal de 0,130 mL/min. El gradient es va realitzar entre la fase mòbil A (àcid fòrmic 0,1 %:acetonitril, 95:5, v/v) i la fase mòbil B (àcid fòrmic 0,1 %:acetonitril, 40:60, v/v), començant amb un 15 % de fase mòbil B i augmentant aquest percentatge de forma lineal fins a un 85 % en 7 minuts.

L'espectròmetre de masses va operar amb mode electroesprai en positiu (ESI⁺), amb un voltatge del capil·lar de 3.0 kV, amb un voltatge

extractor de 3 V i amb un voltatge de les lents RF de 0,1 V. La temperatura de solvatació i de la font es van programar a 350 °C i a 140 °C, respectivament. El nitrogen es va utilitzar com a gas de desolvatació i del con, amb un cabal de 500 L/h i de 25 L/h, respectivament. El gas de coalició va ser l'argó amb un cabal de 0,10 mL/min. El voltatge del con, les transicions MRM i l'energia de coalició van ser de 62 V, m/z 916 > 174 (44 eV) i m/z 916 > 101 (53 eV) per a la tilosina A i de 32 V, m/z 445 > 428 (19 eV) i m/z 445 > 154 (29 eV) per a la doxiciclina.

3.13.6 Identificació i quantificació

Els dos antibiòtics d'estudi es van identificar comparant el temps de retenció, l'espectre de masses i les transicions MRM entre la mostra i els seus corresponents patrons.

La quantificació es va dur a terme mitjançant una recta de calibratge per a cada anàlit, obtinguda a partir de mostres fortificades amb diferents concentracions de cadascun dels patrons. Aquestes fortificacions es van realitzar abans de l'extracció, afegint una quantitat coneguda de patró a la mostra.

3.13.7 Recuperació del mètode

La recuperació del mètode es va calcular seguint la següent fórmula:

$$\% \text{ recuperació} = \frac{X}{Y} \times 100$$

X = Àrea de la mostra fortificada abans del procés d'extracció.

Y = Àrea de la mostra fortificada abans de la injecció al cromatògraf de líquids.

3.13.8 Límit de detecció i de quantificació

El límit de detecció i de quantificació del mètode es va calcular seguint el procediment de l'apartat 3.6.5.5.

3.14 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats dels diferents paràmetres analítics s'han analitzat estadísticament, mitjançant ANOVA, considerant el tractament farmacològic com a variable independent i els paràmetres de composició de l'ou com a variable dependent. Per a cada mostreig es va realitzar una anàlisi estadística independent. En el cas d'efectes significatius, es va utilitzar el test de HSD Tukey per evidenciar diferències significatives entre les mitjanes. El nivell de confiança establert va ser de $p < 0,05$.

També es va realitzar l'anàlisi de components principals (PCA), per determinar quins paràmetres de composició diferencien millor les mostres en funció del tractament antibiòtic administrat (control, tilosina A i doxiciclina) i del mostreig.

Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el JMP (versió 11; SAS Institute Inc, Cary, NC, EEUU).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 ANÀLISI DE LES PROTEÏNES DE LA CLARA D'OU

En aquest treball es va realitzar un estudi preliminar de l'efecte de l'administració de tilosina A i de doxiciclina en les gallines ponedores sobre les proteïnes de la clara d'ou.

4.1.1 Determinació de la proteïna soluble de la clara d'ou (Bio-Rad)

4.1.1.1 *Optimització del mètode d'anàlisi*

Per a la determinació de la proteïna soluble de la clara d'ou es va utilitzar un assaig colorimètric de l'empresa Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU), basat en el mètode de Bradford (1976).

La recta de calibratge utilitzada per a la quantificació de la proteïna soluble es va elaborar usant albúmina de sèrum boví i la seva equació era $y = 0,0047 \cdot x + 0,0112$ amb una $r^2 = 0,9944$.

4.1.1.2 *Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics*

Com es pot observar a la **taula 5**, la clara d'ou conté, aproximadament, un 5 % de proteïna soluble. Després de realitzar una anàlisi estadística independent per a cada mostreig, no es van evidenciar diferències significatives ($p > 0,05$) entre els valors mitjans ($n = 10$) del percentatge de proteïna soluble de la clara d'ou dels diferents grups, dins de cada mostreig.

Taula 5 Mitjana dels valors del percentatge de proteïna soluble en la clara d'ou.
Per a cada grup, n = 10.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Proteïna soluble	5,9	5,9	5,8	5,8	5,7	5,9

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

4.1.2 Estudi del perfil proteic de la clara d'ou (Bioanalyser®)

4.1.2.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Per a l'estudi del perfil de les proteïnes de la clara d'ou es va utilitzar l'estoig d'Agilent anomenat "Agilent High Sensitivity Protein 250 kit".

A la **figura 12** s'observa la separació de les proteïnes de la clara d'ou segons la seva massa molecular. El primer pic (5 kDa) correspon a un fixador de l'anàlisi, mentre que la resta són les diverses proteïnes de la clara d'ou. Tot i que no es va realitzar aquest anàlisi amb proteïnes individuals, la proteïna amb 14 kDa correspon al lisozim i la de 45 kDa a l'ovoalbúmina. Respecte la de 85 kDa no es va identificar (Mine, 1995; Stevens, 1991).

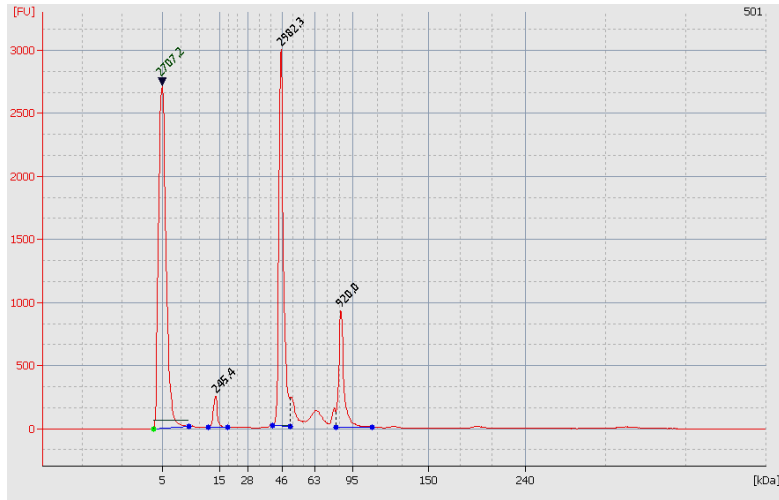


Figura 12 Perfil proteic d'una mostra de clara d'ou obtingut mitjançant l'estoig d'Agilent "High Sensitivity Protein 250 kit".

4.1.2.2 *Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics*

Per detectar si hi havia diferències significatives entre els perfils proteics de les clares dels diversos grups d'estudi, es van seleccionar les proteïnes majoritàries (14 kDa, 45 kDa i 85 kDa) i es van comparar estadísticament les mitjanes de les relacions de les seves àrees: 45 kDa/14 kDa, 85 kDa/14 kDa i 45 kDa/85 kDa (**taula 6**).

Després de realitzar una anàlisi estadística independent per a cada mostreig, no es van evidenciar diferències significatives ($p > 0,05$) entre les mitjanes ($n = 10$) de cadascuna de les relacions de proteïnes dels diferents grups, dins de cada mostreig. Així doncs, cap dels tractaments antibiòtics administrats en aquest estudi va afectar el perfil proteic de la clara.

Taula 6 Mitjana dels valors de les relacions entre les proteïnes majoritàries del perfil proteic de la clara d'ou. Per a cada grup, n = 10.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
45 kDa/14 kDa	10,8	10,7	10,8	11,3	12	10,8
85 kDa/14 kDa	3,9	3,7	3,4	4,1	3,9	3,1
45 kDa/85 kDa	2,8	2,9	3,2	2,8	3,1	3

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

4.1.3 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

Tal com s'ha descrit anteriorment, l'administració de tilosina A i de doxiciclina a les gallines ponedores no va afectar significativament la proteïna soluble de la clara d'ou ni el perfil proteic de la clara d'ou obtingut mitjançant el Bioanalyser.

Els resultats obtinguts mostren l'interès de realitzar un estudi que permeti una exploració més exhaustiva de l'efecte dels antibiòtics estudiats en aquest treball sobre la concentració de les proteïnes minoritàries i sobre l'expressió d'enzims. Per realitzar aquest estudi es podria utilitzar l'electroforesi bidimensional en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (2D-SDS-PAGE).

A la bibliografia hi ha descrit un treball on es van detectar diferències significatives en els perfils proteics de mostres de múscul de porc a causa de l'administració de tetraciclina (Gratacos-Cubarsi et al., 2008). D'altra banda, es coneix que alguns antibiòtics poden inhibir enzims de bacteris com és el cas de la tilosina A, que inhibeix la peptidil transferasa i la síntesi

de proteïnes mitjançant la seva unió amb la subunitat 50S del ribosoma del bacteri (Lewicki, 2006; Poehlsgaard & Douthwaite, 2005; Poulsen et al., 2000).

4.2 DETERMINACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS TOTALS EN EL ROVELL D'OU

4.2.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Per a la determinació dels àcids grassos totals es va realitzar una extracció lipídica, seguida d'una saponificació i una derivatització, per aconseguir els èsters metilats dels àcids grassos. L'extracte es va injectar en un GC-FID (apartat 3.4).

A la **figura 13** es mostra un cromatograma dels àcids grassos totals del rovell de l'ou.

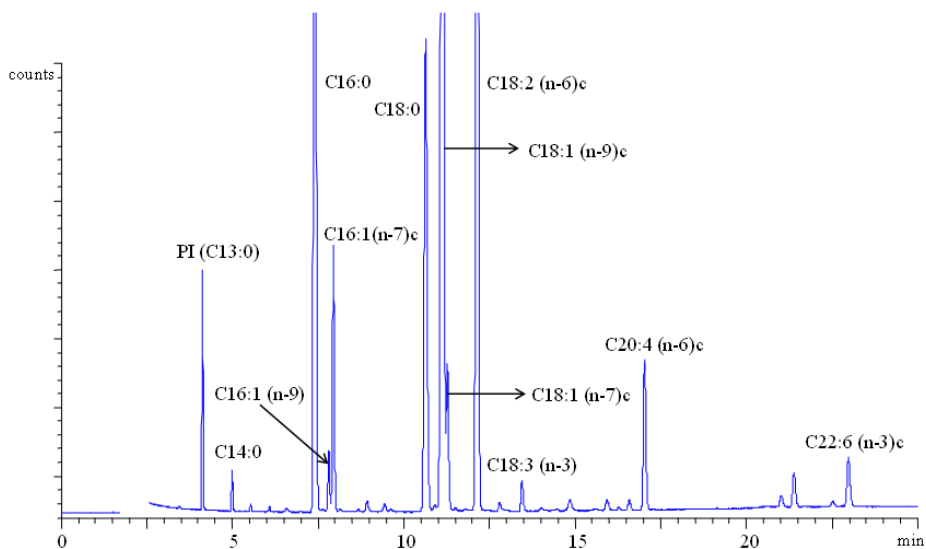


Figura 13 Cromatograma dels àcids grassos totals obtingut mitjançant la GC-FID d'una mostra de rovell d'ou.

4.2.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

A la **taula 7** es mostra la mitjana ($n = 10$) de la concentració dels àcids grassos que contenen els rovells dels ous analitzats.

Taula 7 Mitjana dels valors de la concentració dels àcids grassos del rovell de l'ou (g/kg rovell).
Per a cada grup, n = 10.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Σ Àcids grassos	242,48^a	265,11^b	265,89^b	240,61^a	312,21^b	239,69^a
Àcids grassos saturats (SFA)						
C14:0	0,87	0,96	0,98	0,89^a	1,11^b	0,88^a
C15:0	0,18	0,18	0,2	0,17	0,21	0,18
C16:0	62,75^a	69,16^{ab}	70,75^b	62,89^a	81,94^b	62,85^a
C17:0	0,45	0,43	0,46	0,39^a	0,51^b	0,41^{ab}
C18:0	23,29	23,63	25,64	22,47^{ab}	25,59^b	21,71^a
C21:0	0,2	0,17	0,16	0,16	0,18	0,16
Àcids grassos monoinsaturats (MUFA)						
C14:1	0,2	0,22	0,23	0,21^{ab}	0,26^b	0,21^a
C16:1 (n-9)	1,84	1,86	1,81	1,71	2,09	1,61
C16:1 (n-7)c	6,58	7,47	7,77	6,91^a	9,52^b	7,18^a
C17:1	0,29	0,29	0,3	0,27^a	0,36^b	0,29^{ab}
C18:1 (n-9)t	0,26^b	0,22^a	0,26^b	0,16^a	0,21^b	0,15^a
C18:1 (n-9)c	90,19	101,85	96,44	90,84^a	122,04^b	88,66^a
C18:1 (n-7)c	4,67	5,17	5,12	4,53^a	6,44^b	4,55^a
C20:1 (n-9)c	0,53	0,58	0,56	0,47^a	0,77^b	0,48^a
Àcids grassos poliinsaturats (PUFA)						
C18:2 (n-6)c	37,31	40,97	41,61	36,70^a	48,56^b	39,04^a
C18:3 (n-6)c	0,44	0,38	0,47	0,32	0,43	0,32
C18:3 (n-3)c	0,93	0,99	1,01	0,86^a	1,25^b	0,97^a
C20:2 (n-6)c	0,55	0,59	0,62	0,54^a	0,70^b	0,53^a
C20:3 (n-6)c	0,52	0,49	0,58	0,43^a	0,54^b	0,47^{ab}
C20:4 (n-6)c	7,30^{ab}	6,86^a	7,74^b	6,91	6,86	6,36
C22:6 (n-3)c	3,12^b	2,64^a	3,19^b	2,78	2,65	2,67

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

A més, també s'hi observen els efectes produïts per l'administració de tilosina A i de doxiciclina sobre les concentracions d'aquests àcids grassos (**taula 7**).

Els àcids grassos majoritaris en el rovell de l'ou són l'àcid oleic (C18:1(n-9)c), l'àcid palmític (C16:0), l'àcid linoleic (C18:2(n-6)) i l'àcid esteàric (C18:0). Aquests resultats concideixen amb treballs de la bibliografia que van estudiar la composició d'àcids grassos en ous de gallina (Cherian et al., 2002; Galobart et al., 2001 a).

Després de realitzar una anàlisi estadística independent per a cada mostreig, es va observar que el sumatori de la concentració dels àcids grassos va patir un increment significatiu en el cas de les mostres que provenien de les gallines tractades amb doxiciclina, tant del M1 com del M2, així com en les tractades amb tilosina A i recollides en el M1. Va ser en els rovells dels ous recollits després del període de retirada i que provenien dels animals tractats amb doxiciclina on l'increment va ser major (+ 30 %) (taula 7).

Aquests resultats concorden amb el treball fet per Mukherje, Ghosh, & Mukherje (1971), els quals van descriure un increment de la biogènesi dels àcids grassos en el fetge de rata després d'administrar-los tetraciclina.

Si ara s'observa cadascun dels àcids grassos analitzats, es veu com en les mostres del mostreig previ al període de retirada la concentració de l'àcid palmític (C16:0) va ser incrementada significativament pel tractament amb tilosina A, comparat amb les mostres control. En canvi, la concentració de l'àcid elaídic (C18:1 (n-9)t) i de l'àcid docosahexaenoic (C22:6 (n-3)c) va disminuir significativament pel tractament amb doxiciclina si es compara amb les mostres control. D'altra banda, en els

rovells provinents dels ous recollits en el mostreig posterior al temps de retirada, 13 dels 21 àcids grassos van augmentar significativament la seva concentració a causa del tractament amb doxiciclina, comparat amb les mostres control. Alguns d'aquests corresponen a àcids grassos majoritaris com l'àcid palmític (C16:0), l'àcid palmitoleic (C16:1 (n-7)c), l'àcid oleic (C18:1 (n-9)c) i l'àcid linoleic (C18:2 (n-6)c) (**taula 7**).

La biosíntesi dels àcids grassos amb un nombre parell de carbonis i superior a 16, ja siguin àcids grassos saturats, monoinsaturats o poliinsaturats, parteix de l'àcid palmític (C16:0) (KEGG). Així doncs, és conseqüent que l'augment de la concentració de l'àcid palmític comporti l'augment de la concentració de la majoria d'àcids grassos del rovell d'ou com l'àcid esteàric, l'àcid oleic, l'àcid linoleic, l'àcid α -linolènic, entre d'altres. L'augment de la concentració de l'àcid palmític pot estar relacionada amb la molècula malonil-CoA. La reacció de carboxilació de l'acetil-CoA per a la formació del malonil-CoA és l'etapa limitant de la biosíntesi dels àcids grassos i depèn de la concentració de biotina (KEGG).

A la **figura 14** es mostra una altra representació dels canvis produïts en el perfil dels àcids grassos dels rovells dels ous, a causa dels tractaments antibiòtics administrats. En aquesta figura s'observa que en les mostres recollides abans del període de retirada es va incrementar de manera significativa el sumatori de la concentració dels àcids grassos saturats, a causa del tractament amb tilosina A, i la relació entre el sumatori de la concentració dels àcids grassos n-6/n-3, pel tractament amb doxiciclina. En el cas de les mostres recollides després del període de retirada, tant el sumatori de la concentració dels àcids grassos saturats, com la dels monoinsaturats, com la dels poliinsaturats, com la dels àcids grassos n-6, així com la relació entre el sumatori de la concentració dels àcids grassos

n-6 i n-3 van augmentar significativament per l'efecte de l'administració de doxiciclina. En canvi, la concentració dels àcids grassos n-3 no va patir canvis significatius.

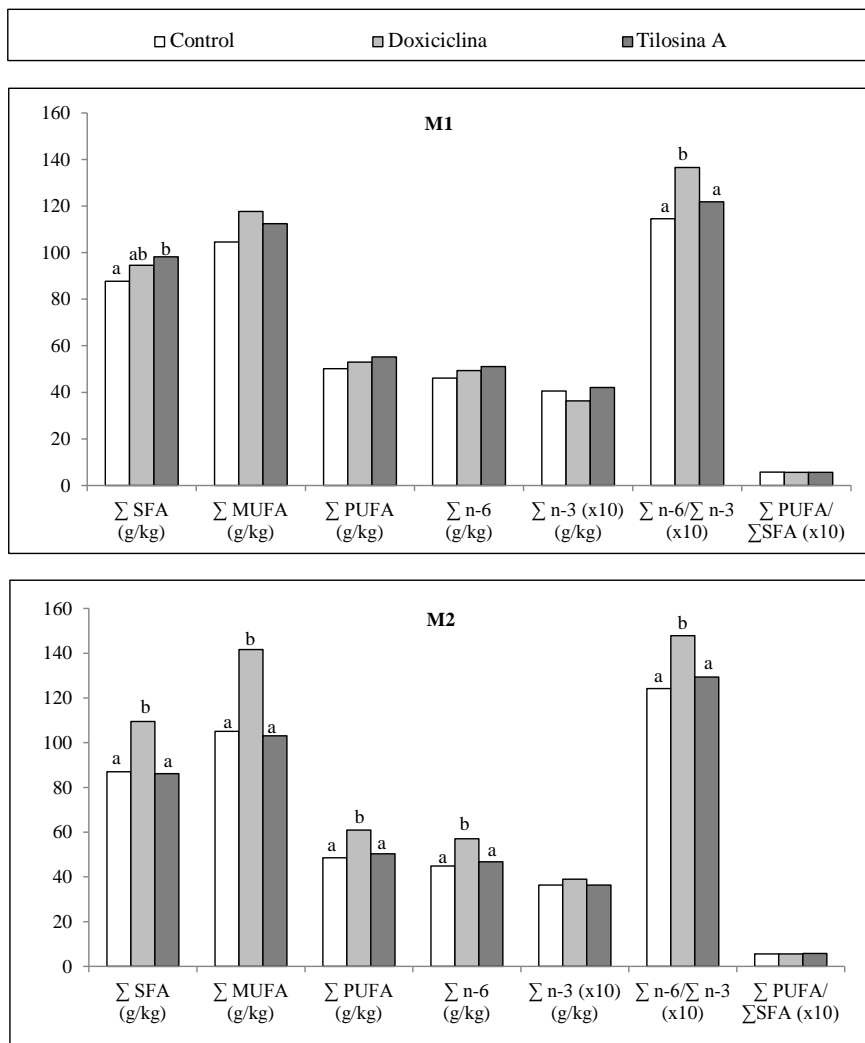


Figura 14 Perfil dels àcids grassos de les mostres de rovell d'ou recollides abans del període de retirada (M1) i després del període de retirada (M2).

Σ SFA = Mitjana dels valors del sumatori de la concentració dels àcids grassos saturats.

Σ MUFA = Mitjana dels valors del sumatori de la concentració dels àcids grassos monoinsaturats.

Σ PUFA = Mitjana dels valors del sumatori de la concentració dels àcids grassos poliinsaturats.

Σ n-6 = Mitjana dels valors del sumatori de la concentració dels àcids grassos n-6.

Σ n-3 = Mitjana dels valors del sumatori de la concentració dels àcids grassos n-3.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

4.3 DETERMINACIÓ DELS TRIGLICÈRIDS EN EL ROVELL D'OU

4.3.1 Identificació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-MS

Per a la identificació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-MS es va diluir (1:1) l'alíquota destinada per aquesta determinació amb acetona i es va injectar al HPLC-MS (apartat 3.6.4).

Els paràmetres utilitzats per a la identificació i la confirmació dels triglicèrids van ser la massa molecular, el temps de retenció, així com la fragmentació dels triglicèrids amb els corresponents diglicèrids (Dugo et al., 2005; La Nasa et al., 2013).

Després de fer la comparació entre les mostres d'estudi i els patrons, es van poder identificar i confirmar els triglicèrids que formaven part de les mostres de rovell d'ou (**taula 8**).

Taula 8 Massa molecular dels triglicèrids identificats en el rovell de l'ou.

Compost	Massa molecular (g/mol)
LLO	880
OOL	882
POL	856
OOO	884
POO	858
SOO	886
POS	861

LLO = 1,3-linoleic-2-oleic.

OOL = 1,2-oleic-3-linoleic.

POL = 1-palmític-2-oleic-3-linoleic.

OOO = Trioleic.

POO = 1,2-oleic-3-palmític.

SOO = 1,2-oleic-3-esteàric.

POS = 1-palmític-2-oleic-3-esteàric.

A la **figura 15** es mostra un cromatograma d'una mostra de rovell d'ou analitzada amb mode *scan* (m/z 250-900).

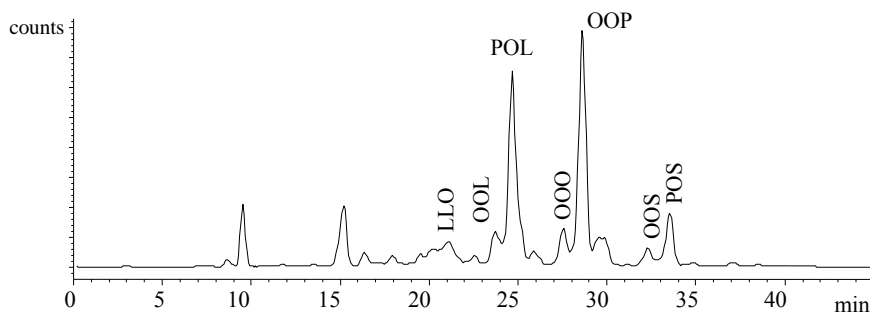


Figura 15 Cromatograma dels triglicèrids d'una mostra de rovell d'ou obtingut mitjançant la HPLC-APCI⁺-MS (*scan*: m/z 250 - 900).

L'espectre de masses que es mostra a la **figura 16** correspon al triglicèrid POL.

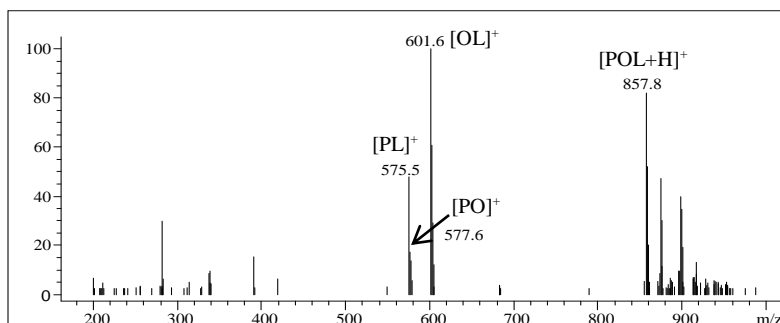


Figura 16 Espectre del POL d'una mostra de rovell d'ou.

Després d'estudiar la fragmentació de cadascun dels triglicèrids d'interès, es va observar que tots els compostos es fragmentaven en els seus diglicèrids corresponents, excepte el POS que en lloc de fragmentar-se en els diglicèrids PO, PS i OS només ho feia en el PO i el OS.

Una vegada identificats els triglicèrids de les mostres de rovell d'ou, es van analitzar totes les mostres en el HPLC-RI per avaluar si hi havien canvis

significatius en les seves concentracions a causa del tractament amb doxiciclina o tilosina A.

4.3.2 Determinació dels triglicèrids mitjançant la HPLC-RI

4.3.2.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Per a la quantificació dels triglicèrids es va injectar directament al HPLC-RI l'alíquota destinada per a aquesta determinació (apartat 3.6.5).

A la **figura 17** s'il·lustra un cromatograma de la separació cromatogràfica dels triglicèrids del rovell d'ou mitjançant la HPLC-RI.

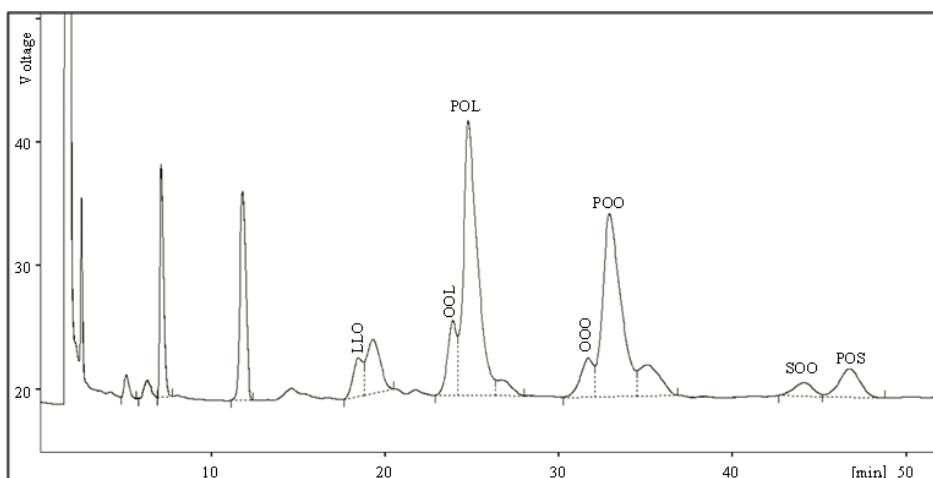


Figura 17 Cromatograma dels triglicèrids d'una mostra de rovell d'ou obtingut mitjançant la HPLC-RI.

Per a avaluar el mètode es va calcular el límit de detecció i el límit de quantificació per a cada triglicèrid (**taula 9**). La quantificació dels triglicèrids es va realitzar mitjançant una recta de calibratge externa per a cadascun d'ells. Les equacions de les rectes de calibratge utilitzades es mostren a la **taula 9**.

Taula 9 Paràmetres d'avaluació del mètode per a cada triglicèrid (mitjana \pm desviació estàndard).

	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	Repetibilitat interdia (CV, %) n = 9	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recta de calibratge	r²
LLO	3,41 \pm 1,67	4,85 \pm 1,00	35,0	116,6	y = 10,6 · x + 1,1	0,9998
OOL	4,79 \pm 1,85	5,71 \pm 1,91	22,0	73,3	y = 9,1 · x - 0,2	0,9986
POL	2,11 \pm 0,81	3,09 \pm 0,84	7,4	25,3	y = 20,9 · x - 22,9	0,9950
OOO	3,20 \pm 0,88	3,35 \pm 0,94	16,8	56,0	y = 10,7 · x + 2,4	0,9976
POO	3,82 \pm 1,12	5,48 \pm 1,15	37,5	124,9	y = 9,4 · x + 13,4	0,9981
SOO	6,47 \pm 3,89	6,94 \pm 0,48	22,6	75,6	y = 10,0 · x + 2,5	0,9945
POS	1,66 \pm 0,89	6,75 \pm 1,28	38,6	128,9	y = 9,1 · x + 1,4	0,9985

LOD = Límit de detecció.
 LOQ = Límit de quantificació.
 r² = Coeficient de regressió.

LLO = 1,3-linoleic-2-oleic.
 OOL = 1,2-oleic-3-linoleic.
 POL = 1-palmític-2-oleic-3-linoleic.
 OOO = Trioleic.
 POO = 1,2-oleic-3-palmític.
 SOO = 1,2-oleic-3-esteàric.
 POS = 1-palmític-2-oleic-3-esteàric.

4.3.2.2 *Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics*

A la **taula 10** es mostra la mitjana (n = 10) de la concentració de cadascun dels triglicèrids, així com els efectes que han patit a causa del tractament amb els antibiòtics d'estudi. Els triglicèrids majoritaris del rovell de l'ou són el POO i el POL, resultats que concorden amb la bibliografia (Kallio et al., 2001).

Després de realitzar una anàlisi estadística independent per a cada mostreig, s'observa que la concentració del POL va augmentar significativament en les mostres recollides després del període de retirada, com a conseqüència de l'administració de doxiciclina. Aquest increment va

ser de més del 16 % comparat amb les mostres control. La resta de triglicèrids no van patir els efectes del tractament amb tilosina A ni amb doxiciclina (**taula 10**).

Taula 10 Mitjana dels valors de la concentració dels triglicèrids en el rovell de l'ou (g/kg). Per a cada grup, n = 10.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
POL	25,81	26,14	27,46	25,39^a	29,50^b	28,19^{ab}
LLO	4,02	3,71	4,10	3,87	4,53	4,45
OOL	10,65	10,34	10,08	10,81	10,97	10,75
OOO	9,26	8,70	8,28	9,29	8,55	8,37
POO	61,44	60,62	60,72	61,02	63,12	59,36
SOO	5,53	5,10	5,18	6,01	4,81	4,85
POS	11,89	11,35	11,94	12,05	11,58	11,27

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

LLO = 1,3-linoleic-2-oleic.

OOL = 1,2-oleic-3-linoleic.

POL = 1-palmític-2-oleic-3-linoleic.

OOO = Trioleic.

POO = 1,2-oleic-3-palmític.

SOO = 1,2-oleic-3-esteàric.

POS = 1-palmític-2-oleic-3-esteàric.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

4.3.3 Determinació dels àcids grassos dels triglicèrids mitjançant la GC-FID

4.3.3.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Per a la determinació dels àcids grassos procedents de la fracció dels triglicèrids es va saponificar i derivatitzar l'alíquota destinada per a aquesta analítica. Seguidament es van extreure els èsters metilats dels àcids grassos amb hexà i es van injectar al GC-FID (apartat 3.6.6).

A la **figura 18** s'il·lustra un cromatograma del perfil dels àcids grassos que provenen de la fracció dels triglicèrids del rovell de l'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.

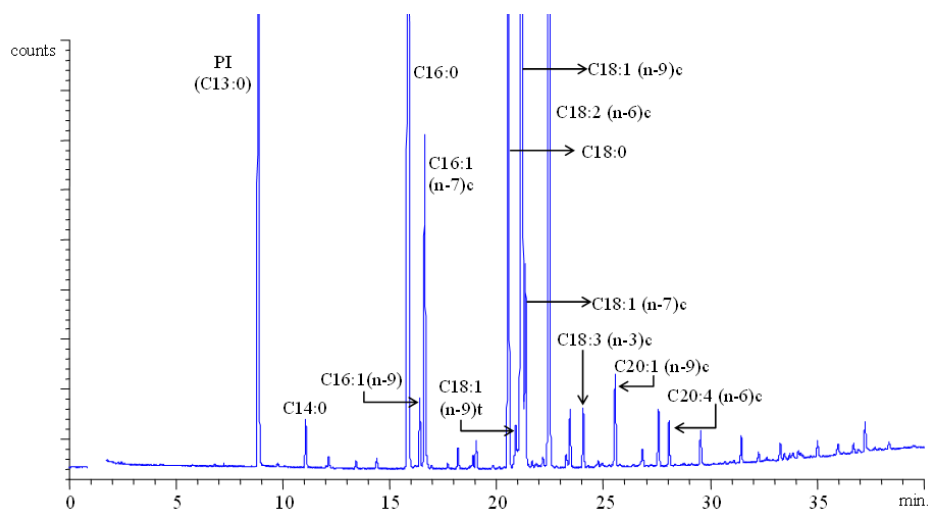


Figura 18 Cromatograma dels àcids grassos procedents de la fracció dels triglicèrids d'una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.

PI = Patró intern.

4.3.3.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

La mitjana del sumatori dels àcids grassos corresponents a la fracció dels triglicèrids es mostren a la **taula 11**. Els àcids grassos majoritaris són l'oleic (C18:1 (n-9)c), seguit del palmític (C16:0) i del linoleic (C18:2 (n-6)c). Aquests resultats concorden amb els obtinguts amb el mètode HPLC-RI, on els triglicèrids majoritaris eren el POL i el POO que estan formats per l'àcid palmític (P), l'oleic (O) i el linoleic (L), i també concorden amb diversos treballs de la bibliografia (Kallio et al., 2001; Pacetti et al., 2005; Shinn et al., 2014).

En l'anàlisi estadística que es va realitzar independentment per a cada mostreig no es van evidenciar diferències significatives ($p > 0,05$) entre les mitjanes ($n = 10$) dels sumatoris dels àcids grassos dels diferents grups, dins de cada mostreig. Així doncs, cap dels àcids grassos procedents de la fracció dels triglicèrids va patir canvis significatius a causa del tractament amb doxiciclina i tilosina A.

Taula 11 Mitjana dels valors del sumatori dels àcids grassos procedents de la fracció dels triglicèrids del rovell d'ou (g/kg rovell). Per a cada grup, $n = 10$.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Σ Àcids grassos	252,21	226,87	232,65	230,21	243,31	230,27

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

4.4 DETERMINACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS LLIURES EN EL ROVELL D'OU

4.4.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Un cop obtinguda la fracció corresponent als àcids grassos lliures es va derivatitzar amb trifluorur de bor-metanol, es van extreure els èsters metilats dels àcids grassos amb hexà i es va injectar l'extracte al GC-FID (apartat 3.7.2).

A la **figura 19** s'il·lustra un cromatograma dels àcids grassos lliures que es troben en el rovell de l'ou, obtingut mitjançant l'anàlisi per GC-FID.

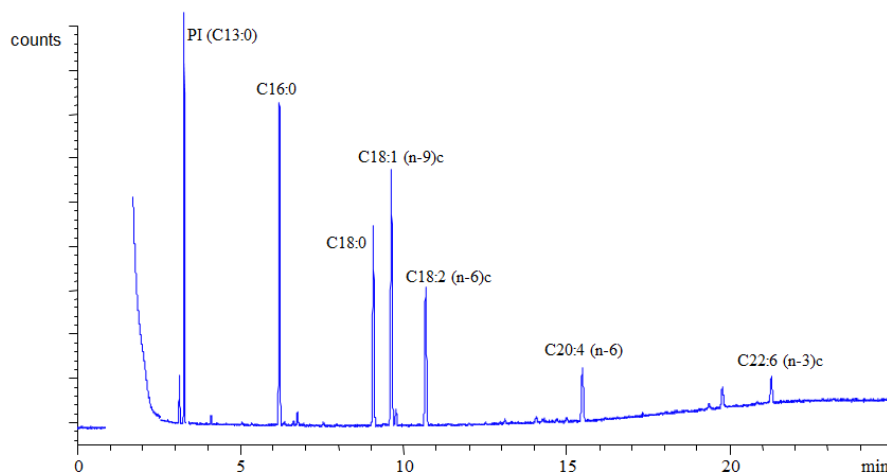


Figura 19 Cromatograma dels àcids grassos procedents de la fracció dels àcids grassos lliures d'una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.

PI = Patró intern.

4.4.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

La mitjana ($n = 10$) del sumatori dels àcids grassos lliures en el rovell de l'ou es mostren a la **taula 12**.

En l'anàlisi estadística que es va realitzar independentment per a cada mostreig no es van evidenciar diferències significatives ($p > 0,05$) entre les mitjanes ($n = 10$) dels sumatoris dels àcids grassos dels diferents grups, dins de cada mostreig. Així doncs, cap dels àcids grassos lliures va patir un efecte significatiu a causa de l'administració de tilosina A ni de doxiciclina.

Els àcids grassos lliures majoritaris són l'àcid palmític (C16:0), l'àcid esteàric (C18:0), l'àcid oleic (C18:1 (n-9)c) i l'àcid linoleic (C18:2 (n-6)c).

Taula 12 Mitjana dels valors del sumatori dels àcids grassos lliures del rovell d'ou (g/kg rovell). Per a cada grup, $n = 10$.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Σ Àcids grassos	2,41	2,83	2,85	2,55	2,74	2,27

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

4.5 DETERMINACIÓ DELS ÀCIDS GRASSOS DE LA FRACCIÓ DELS FOSFOLÍPIDS EN EL ROVELL D'OU

4.5.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Per a la determinació dels àcids grassos procedents dels fosfolípids es va saponificar i derivatitzar la fracció corresponent, obtinguda en el fraccionament lipídic (apartat 3.5). Posteriorment es va injectar l'extracte al GC-FID (apartat 3.8).

A la **figura 20** s'il·lustra un cromatograma dels àcids grassos que provenen de la fracció dels fosfolípids d'una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.

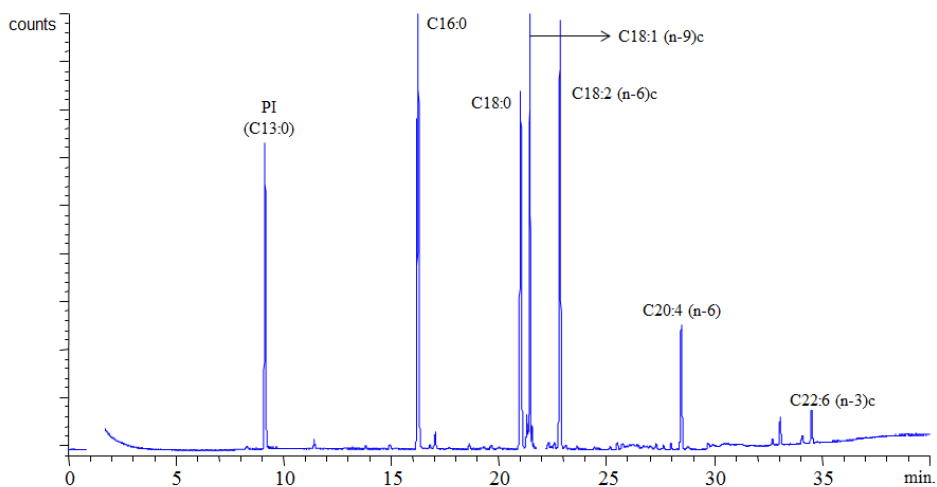


Figura 20 Cromatograma dels àcids grassos procedents de la fracció dels fosfolípids d'una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la GC-FID.

PI = Patró intern.

4.5.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

A la **taula 13** es mostra la mitjana ($n = 10$) del sumatori dels àcids grassos que provenen de la fracció dels fosfolípids en el rovell de l'ou. Els àcids grassos majoritaris de la fracció dels fosfolípids són l'àcid palmític (C16:0), seguit de l'àcid oleic (C18:1 (n-9)c), de l'àcid esteàric (C18:0) i de l'àcid linoleic (C18:2 (n-6)c). Aquests resultats concorden amb diversos treballs de la bibliografia (Gladkowski et al., 2011; Lei et al., 2012; Pacetti et al., 2005).

En l'anàlisi estadística realitzada independentment per a cada mostreig no es van evidenciar diferències significatives ($p > 0,05$) entre les mitjanes ($n = 10$) dels sumatoris dels àcids grassos dels diferents grups, dins de cada mostreig. Així doncs, cap dels àcids grassos procedents de la fracció dels fosfolípids va patir un efecte significatiu a causa de l'administració de tilosina A ni de doxiciclina.

Taula 13 Mitjana dels valors del sumatori dels àcids grassos de la fracció dels fosfolípids del rovell de l'ou (g/kg rovell). Per a cada grup, $n = 10$.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Σ Àcids grassos	62,59	57,88	58,66	60,65	63,51	61,39

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

4.6 DETERMINACIÓ DEL COLESTEROL EN EL ROVELL D'OU

4.6.1 Optimització del mètode d'anàlisi

El mètode utilitzat per a l'anàlisi del colesterol va consistir en una saponificació directa, seguida d'una extracció amb hexà. La seva determinació es va realitzar a través de la HPLC-RI (apartat 3.9).

Per avaluar el mètode es va estudiar la recuperació, l'exactitud, la repetibilitat intradia i interdia, el límit de detecció i el límit de quantificació. Aquest mètode presenta una recuperació i una exactitud del 98 %, un coeficient de variació de la repetibilitat intradia i interdia de 1,2 i 3,3 %, respectivament. El límit de detecció és de 6 mg/kg i el límit de quantificació és de 20 mg/kg (**taula 14**).

A la **figura 21** es mostra un cromatograma de l'anàlisi del colesterol on s'hi observa que el temps de retenció del colesterol és de 5,9 minuts i el del patró intern, 5 α -colestan-3 β -ol, és de 7,5 minuts.

La quantificació de la concentració del colesterol es va dur a terme mitjançant una recta de calibratge amb patró intern (**taula 14**). Per a l'elaboració de la recta de calibratge es va fortificar una mostra de rovell d'ou amb diferents concentracions de colesterol (entre 5-25 g/kg mostra) i amb 1 mg de 5 α -colestan-3 β -ol (10 g/kg rovell). Tant el patró intern com el colesterol es van addicionar a la mostra abans del procés d'extracció.

Taula 14 Paràmetres d'avaluació del mètode (mitjana ± desviació estàndard).

Recuperació (%) n = 9	Exactitud (%) n = 9	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	Repetibilitat interdia (CV, %) n = 9	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recta de calibratge	r ²
98,64 ± 0,05	98,2 ± 8,1	1,22 ± 0,51	3,31 ± 0,42	6,0	20,2	$y = 1,15 \cdot x + 0,01$	0,9950

CV = Coeficient de variació.

LOD = Límit de detecció.

LOQ = Límit de quantificació.

r² = Coeficient de regressió.

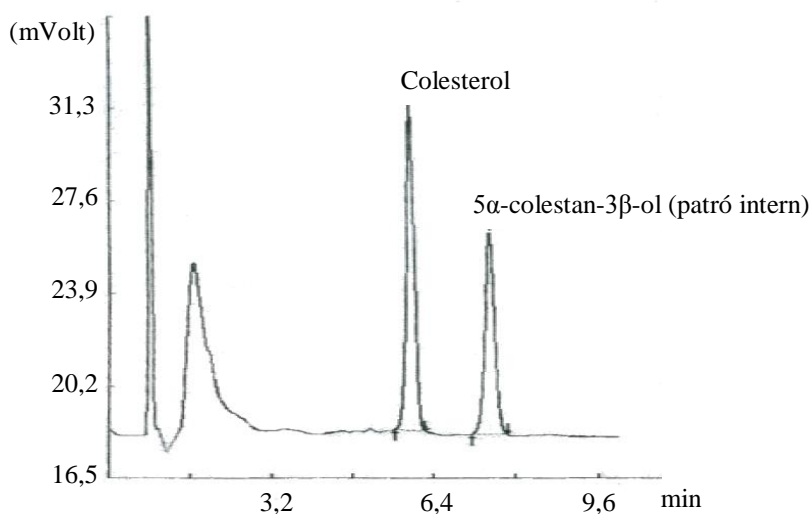


Figura 21 Cromatograma del colesterol i del 5α-colestan-3β-ol (patró intern) obtingut mitjançant la HPLC-RI d'una mostra de rovell d'ou.

4.6.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

A la **taula 15** es mostra la mitjana (n = 10) de les concentracions de colesterol obtingues en l'anàlisi de les mostres de rovell d'ou. Segons aquests resultats hi ha un augment significatiu de la concentració de colesterol en les mostres que provenen dels animals tractats amb doxiciclina i recollides en el mostreig posterior al període de retirada, si es compara

amb les mostres del grup control. En canvi, la tilosina A no produeix canvis significatius ($p > 0,05$) en la concentració de colesterol.

Taula 15 Mitjana dels valors de la concentració de colesterol en el rovell de l'ou (g/kg rovell). Per a cada grup, $n = 10$.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Colesterol	11,48	11,38	11,18	10,96^a	11,74^b	11,02^a

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

Aquests resultats es troben en concordança amb altres estudis de la bibliografia que van observar com la concentració del colesterol hepàtic augmentava quan als ratolins se'ls hi aplicava un tractament amb doxiciclina (Bocker et al., 1981; Hopf, et al., 1985). A més, Yin et al. (2006) van manifestar la sobre-expressió d'alguns enzims involucrats en la biosíntesis del colesterol hepàtic (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa, mevalonat quinasa, isopentenil-difosfat delta isomerasa, entre d'altres), en fetges provinents de ratolins que havien estat sotmesos a un tractament amb tetraciclina. De tota manera, altres treballs van observar que la concentració de colesterol en fetge o en sang disminuïa en les mostres provinents d'animals tractats amb tetraciclina (Mukherje et al., 1971; Yamamoto et al., 2006). També és el cas de l'estudi de Brown et al. (2005) on van comprovar que un tractament amb doxiciclina a dosis sub-antibacterianes disminuïa la concentració de LDL-colesterol en el plasma de pacients amb síndromes coronaris.

4.7 DETERMINACIÓ DE L'ÀCID 5-MTHF EN EL ROVELL D'OU

4.7.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Per a la determinació de l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic (5-MTHF) es va realitzar una extracció amb tampó fosfat (pH = 6), una purificació amb cartutxos d'intercanvi aniònic fort i l'eluat es va injectar al HPLC-FLD (apartat 3.10).

Abans d'iniciar l'anàlisi de les mostres es va estudiar si, tal com alguns treballs de la bibliografia mencionaven, el rovell de l'ou només contenia la forma monoglutamada dels folats, l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic (House et al., 2002; Ndaw et al., 2001; Seyoum & Selhub, 1998). Mentre s'estava posant a punt el mètode d'extracció es van seguir dos protocols, un amb un tractament enzimàtic amb sèrum de rata (protocol 1) i un altre sense (protocol 2).

Després de fer una anàlisi estadística dels resultats obtinguts en els dos protocols (amb o sense tractament enzimàtic), no es van evidenciar diferències significatives ($p > 0,05$) entre les mitjanes ($n = 5$) de les concentracions de folats (**taula 16**). Per tant, totes les mostres es van analitzar seguint el protocol sense tractament enzimàtic.

Taula 16 Mitjana dels valors de la concentració de l'àcid 5-MTHF segons el protocol 1 o 2. Per a cada protocol, $n = 5$.

	Protocol 1	Protocol 2
µg àcid 5-MTHF / g rovell de l'ou	3,24	3,23

Protocol 1: amb tractament enzimàtic.

Protocol 2: sense tractament enzimàtic.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

El mètode utilitzat es va avaluar determinant la recuperació, l'exactitud, la repetibilitat intradia, la repetibilitat interdia, el límit de detecció i el límit de quantificació. A la **taula 17** es mostren els resultats de cadascun dels paràmetres d'avaluació on s'observa que el mètode utilitzat permet extreure l'àcid 5-MTHF amb una recuperació del 101,5 %, amb una exactitud del 94,4 %. A més, tant la mitjana del coeficient de variació de la repetibilitat intradia com el de la repetibilitat interdia és de 8 % aproximadament. El límit de detecció és de 8,9 µg/kg, mentre que el límit de quantificació és de 30 µg/kg.

A la **figura 22** es mostra un cromatograma d'un extracte de rovell d'ou on s'il·lustra que l'àcid 5-MTHF elueix a un temps de retenció de 8,7 minuts.

La quantificació de l'àcid 5-MTHF es va realitzar mitjançant una recta de calibratge en matriu (**taula 17**), elaborada a partir de mostres fortificades amb una solució de patró a diferents concentracions (1,1-11,2 mg d'àcid 5-MTHF / kg de rovell d'ou).

Taula 17 Paràmetres d'avaluació del mètode (mitjana ± desviació estàndard).

Recuperació (%) n = 9	Exactitud (%) n = 9	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	Repetibilitat interdia (CV, %) n = 9	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recta de calibratge	r ²
101,5 ± 10,6	94,4 ± 7,7	8,69 ± 0,95	8,3 ± 3,4	8,9	29,7	$y = 1.217.723,16 \cdot x + 292.084,62$	0,9984

CV = Coeficient de variació.

LOD = Límit de detecció.

LOQ = Límit de quantificació.

r² = Coeficient de regressió.

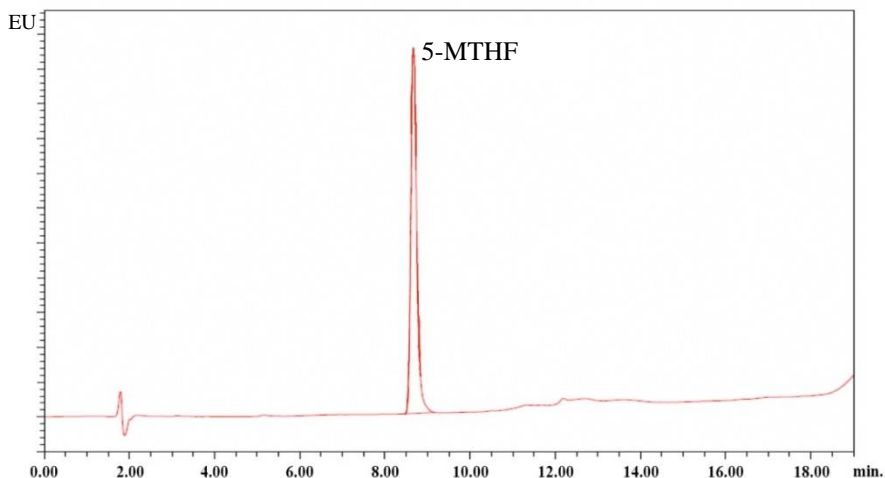


Figura 22 Cromatograma de l'àcid 5-MTHF d'una mostra de rovell d'ou mitjançant la HPLC-FLD.

4.7.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

A la **taula 18** s'il·lustra la mitjana ($n = 10$) de la concentració de l'àcid 5-MTHF de les mostres de rovell d'ou analitzades.

Taula 18 Mitjana dels valors de la concentració de l'àcid 5-MTHF en el rovell d'ou (mg/kg rovell). Per a cada grup, $n = 10$.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Àcid 5-MTHF	3,11	3,51	3,27	3,74	3,63	3,80

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

Després de realitzar una anàlisi estadística independentment per a cada mostreig, no es van evidenciar diferències significatives ($p > 0,05$) entre les mitjanes ($n = 10$) de les concentracions de l'àcid 5-MTHF dels diferents grups d'estudi, dins de cada mostreig. Així doncs, l'administració de tilosina A i de doxiciclina a les gallines ponedores no té efectes significatius en el metabolisme de l'àcid 5-MTHF. Tot i això, cal esmentar que les sulfonamides competeixen amb l'àcid p-amino-benzoic del bacteri, en la síntesi enzimàtica de l'àcid dihidrofòlic, fet que provoca una disminució de la disponibilitat de les formes reduïdes dels folats que són essencials per a la formació d'àcids nucleics (Richter et al., 2013; Roland et al., 1979).

4.8 DETERMINACIÓ DE CAROTENOIDES, α -TOCOFEROL I RETINOL EN EL ROVELL D'OU

4.8.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Els carotenoides, el retinol i l' α -tocoferol es van extreure mitjançant hexà i es van analitzar en un HPLC-DAD-FLD (apartat 3.11).

Abans de l'anàlisi de les mostres es van optimitzar les condicions de reconstitució de l'extracte, estudiant diferents mescles de dissolvents i diferents volums afegits (**taules 19 i 20**). Per avaluar quina reconstitució era la més adequada es va calcular la recuperació dels anàlits.

Taula 19 Optimització de les condicions de reconstitució de l'extracte de rovell d'ou.

nº prova	Volum afegit (μ l)	Dissolvents utilitzats
1	500	Acetonitril
2	750	Acetonitril
3	2000	Acetonitril
4	750	Acetonitril:tetrahidrofuran (80:20)
5	1500	Acetonitril:tetrahidrofuran (80:20)

A la **taula 20** s'observa que les condicions de reconstitució de la prova nº 5, addició de 1500 μ L d'acetonitril:tetrahidrofuran (80:20) sobre l'extracte, són les que presenten una major recuperació per a tots els compostos d'anàlisi. Així doncs, es van utilitzar aquestes condicions de reconstitució per a l'anàlisi de les mostres.

Taula 20 Recuperació dels anàlits segons les condicions de reconstitució de l'extracte de rovell d'ou (mitjana \pm desviació estàndard).

n ^o prova	Recuperació Retinol (%, n = 3)	Recuperació Luteïna (%, n = 3)	Recuperació Cantaxantina (%, n = 3)	Recuperació α -tocoferol (%, n = 3)
1	45,0 \pm 1,8	34,5 \pm 1,9	21,4 \pm 1,4	17,1 \pm 2,1
2	62,3 \pm 4,3	49,8 \pm 0,3	29,2 \pm 1,1	26,1 \pm 2,3
3	74,6 \pm 1,0	69,5 \pm 1,7	35,7 \pm 1,5	52,6 \pm 0,7
4	78,3 \pm 0,6	78,8 \pm 0,8	39,1 \pm 1,7	57,5 \pm 2,4
5	83,4 \pm 0,1	88,4 \pm 0,1	40,8 \pm 0,4	78,6 \pm 0,3

Per avaluar el mètode escollit es va estudiar la recuperació, l'exactitud, la repetibilitat intradia i interdia, així com el límit de detecció i de quantificació (**taula 21**).

Taula 21 Paràmetres d'avaluació del mètode per a cada anàlit (mitjana \pm desviació estàndard).

	Recuperació (%) n = 9	Exactitud (%) n = 9	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	Repetibilitat interdia (CV, %) n = 9	LOD (μ g/kg)	LOQ (μ g/kg)	Recta de calibratge	r ²
A	83,4 \pm 0,9	103,1 \pm 2,9	5,4 \pm 0,8	4,6 \pm 0,5	0,07	0,24	$y = 17,12 \cdot x - 0,50$	0,9982
B	88,4 \pm 1,3	101,7 \pm 6,3	2,5 \pm 0,7	3,4 \pm 2,0	0,07	0,25	$y = 21,54 \cdot x + 1,72$	0,9957
C	40,8 \pm 2,3	98,5 \pm 6,5	3,0 \pm 1,8	4,4 \pm 0,7	0,09	0,33	$y = 11,72 \cdot x - 0,24$	0,9982
D	78,6 \pm 2,9	98,6 \pm 11,7	2,2 \pm 0,7	4,5 \pm 1,7	0,95	3,17	$y = 2,95 \cdot x - 2,98$	0,9975

A = Retinol.

B = Luteïna.

C = Cantaxantina.

D = α -tocoferol.

CV = Coeficient de variació

LOD = Límit de detecció.

LOQ = Límit de quantificació.

r² = Coeficient de regressió.

La recuperació del mètode es troba entre el 78-88 %, excepte per la cantaxantina que és del 41 %. Respecte l'exactitud cal esmentar que en tots els compostos es troba al voltant del 100 %. Tant la repetibilitat intradia com interdia presenten un coeficient de variació inferior al 5 % per a cada

anàlit, excepte en el cas del retinol que la repetibilitat intradia és del 5,4 %. Els límits de detecció dels compostos estudiats són inferiors a 0,10 mg/kg i els de quantificació inferiors a 0,40 mg/kg, excepte en el cas de l' α -tocoferol que són 0,95 i 3,17 mg/kg, respectivament.

En el cromatograma que es mostra a la **figura 23** s'observa la separació cromatogràfica d'una mostra de rovell d'ou mitjançant la HPLC-DAD-FLD. Aquesta separació compleix les necessitats d'aquest estudi, encara que la luteïna i la zeaxantina no es separin correctament. Així doncs, els resultats de luteïna obtinguts mitjançant aquest mètode sempre faran referència a la suma de la luteïna i de la zeaxantina. A la bibliografia també hi ha treballs que presenten aquest problema (Nierenberg & Nann, 1992; Sowell et al., 1994).

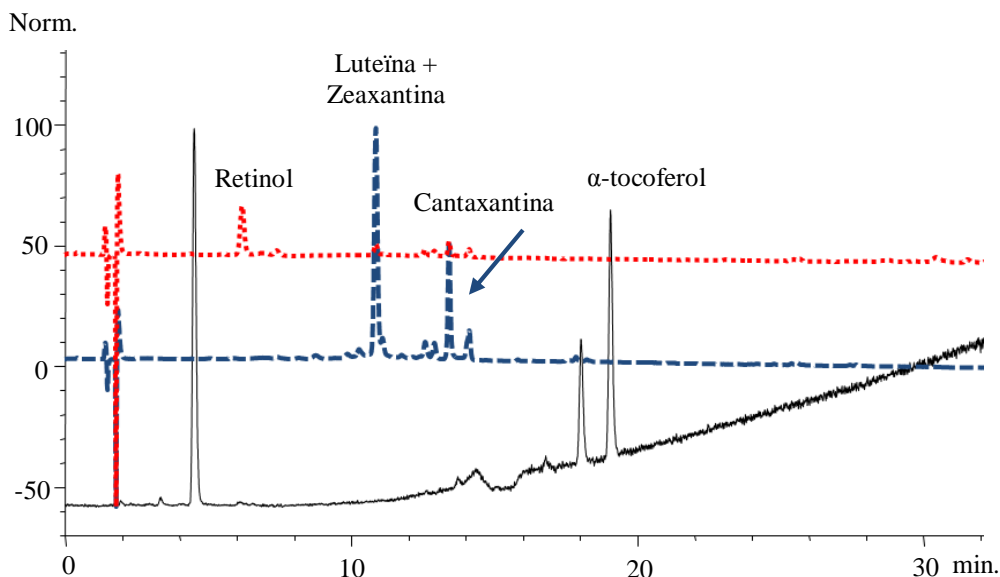


Figura 23 Separació cromatogràfica del retinol, de la luteïna, de la cantaxantina i de l' α -tocoferol mitjançant la HPLC-DAD-FLD en una mostra de rovell d'ou.

Línia puntejada: DAD 1 amb $\lambda = 325$ nm

Línia de ratlles: DAD 2 amb $\lambda = 445$ nm

Línia continua: FLD amb λ excitació = 280 nm i λ emissió = 330 nm

El retinol es detecta mitjançant el DAD a una $\lambda = 325$ nm i s'elueix a un temps de retenció de 6,2 min. La luteïna, juntament amb la zeaxantina, i la cantaxantina també es detecten en DAD, però a una $\lambda = 445$ nm i s'elueixen a un temps de retenció de 10,9 i de 13,4 min, respectivament. En canvi, l' α -tocoferol es determina mitjançant un FLD, a una $\lambda_{\text{excitació}} = 280$ nm i $\lambda_{\text{emissió}} = 330$ nm, i s'elueix a 19,0 min.

Tal com s'ha comentat a l'apartat 3.11, la quantificació del retinol, de la luteïna, de la cantaxantina i de l' α -tocoferol es va realitzar mitjançant una recta de calibratge per a cada compost (**taula 21**). Aquestes rectes es van elaborar fortificant un rovell d'ou, abans del procés d'extracció, amb diferents nivells de concentració de cadascun dels patrons d'interès. L'interval de μg addicionats al rovell d'ou varia segons cada compost (el retinol entre 4-14 $\mu\text{g}/\text{kg}$; la luteïna entre 1,25-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$; la cantaxantina entre 1,25-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$; l' α -tocoferol entre 16-160 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

4.8.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

A la **taula 22** es mostren les mitjanes ($n = 10$) de les concentracions dels carotenoides, del retinol i de l' α -tocoferol de les mostres de rovell d'ou analitzades.

4. Resultats i discussió

Taula 22 Mitjana dels valors de la concentració de retinol, luteïna, cantaxantina i α -tocoferol en el rovell d'ou (mg/kg rovell). Per a cada grup, n = 10.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Retinol	7,91	7,36	7,51	7,65	7,87	8,03
Luteïna ¹	12,55	15,14	14,01	12,19	11,57	14,73
Cantaxantina	13,34	12,67	14,78	12,71^a	16,14^b	13,41^a
α -tocoferol	58,01^b	50,35^a	56,51^b	57,88^b	51,51^a	51,43^a

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

¹: concentració de luteïna + zeaxantina.

L'anàlisi estadística es va realitzar per a cada mostreig i per a cada compost de forma independent. A les mostres recollides en el primer mostreig es va observar la disminució de la concentració de l' α -tocoferol com a conseqüència de l'administració de doxiciclina, comparat amb les mostres control. D'altra banda, després del període de retirada la concentració de cantaxantina es va incrementar de forma significativa en les mostres procedents de les gallines tractades amb doxiciclina, mentre que els nivells d' α -tocoferol van disminuir significativament a causa d'ambdós tractaments antibiòtics, si es compara amb les mostres del grup control. La concentració de retinol i de luteïna no van patir cap efecte a causa de l'administració dels antibiòtics d'estudi a les gallines ponedores (**taula 22**).

En contra dels resultats obtinguts en aquest treball, Carreras et al. (2004) van descriure que la concentració de l' α -tocoferol, en el múscul del pit i de la cuixa de pollastre, no es trobava afectada com a conseqüència de l'administració d'enrofloxacina. No obstant això, cal tenir en compte que es tracta d'una matriu i d'un antibiòtic diferent.

4.9 DETERMINACIÓ DE L'OXIDACIÓ LIPÍDICA EN EL ROVELL D'OU

Després d'observar que la concentració de l' α -tocoferol disminuïa com a conseqüència de l'administració de tilosina A i de doxiciclina, es va analitzar l'oxidació lipídica mitjançant el mètode de TBARS per corroborar que els rovells dels ous procedents de les gallines tractades amb antibiòtic fossin més sensibles davant l'oxidació lipídica.

4.9.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Abans d'analitzar les mostres per avaluar l'efecte de la tilosina A i de la doxiciclina sobre l'oxidació lipídica en el rovell de l'ou es van estudiar dos possibles mètodes analítics, el test del TBA no induït i induït.

A la **taula 23** s'il·lustren els valors de TBARS obtinguts segons els dos mètodes estudiats, on s'observa que l'oxidació lipídica en el test del TBA no induït és inferior a la del test del TBA induït. Aquests resultats concorden amb treballs de la bibliografia on expressen que, tot i la dificultat que els lípids s'oxidin en els ous frescos, l'oxidació lipídica pot esdevenir quan els ous es sotmeten a elevades temperatures o a processos tecnològics, com la cocció o el spray-drying (Galobart, 2001 a; Galobart, 2001 b; Ren et al., 2013). Després d'avaluar els resultats obtinguts en els dos mètodes d'estudi, es va decidir utilitzar el test del TBA induït, ja que l'oxidació lipídica era major.

En el mètode escollit, tant el sulfat de ferro com l'àcid ascòrbic s'utilitzen per a induir l'oxidació lipídica. Encara que l'àcid ascòrbic sigui un antioxidant, a concentracions baixes i en presència de ions ferro actua com a prooxidant (Grau et al., 2001; Mielnik et al., 2003).

Taula 23 Resultats de l'oxidació lipídica segons el mètode de TBA no induït i induït (mitjana \pm desviació estàndard).

Mètode TBA no induït	Mètode TBA induït
Valor de TBARS ¹ (n = 8)	Valor de TBARS ¹ (n = 8)
0,017 \pm 0,005	0,685 \pm 0,062

¹ Els valors de TBARS es troben expressats en mmols d'equivalents de MDA/kg rovell d'ou.

Un cop seleccionat el test del TBA induït per a la mesura de l'oxidació lipídica es va optimitzar el temps d'incubació de les mostres. Després d'estudiar diversos temps d'incubació (0, 30, 60 i 120 minuts) es va observar que els temps òptims eren els de 60 i 120 minuts (**figura 24**). Finalment es va decidir incubar les mostres a 60 minuts ja que el temps d'anàlisi era més curt i la dispersió menor (CV 0,52 %), comparat amb el de 120 minuts (CV 2,99 %).

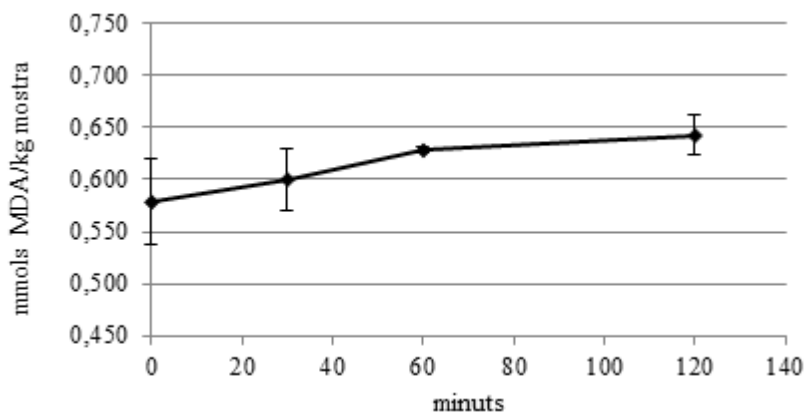


Figura 24 Optimització del temps d'incubació de les mostres en el test del TBA induït.

¹ El valor de TBARS s'expressa en mmols d'equivalents de MDA/kg rovell d'ou.

Després de l'optimització del temps d'incubació es van avaluar la repetibilitat intradia i la repetibilitat interdia (**taula 24**).

Taula 24 Paràmetres d'avaluació del mètode (mitjana \pm desviació estàndard).

Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	Repetibilitat interdia (CV, %) n = 9
1,9 \pm 0,4	10,8 \pm 4,9

CV = Coeficient de variació.

La quantificació de l'oxidació lipídica, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.12.4, es va realitzar mitjançant la llei de Lambert-Beer.

4.9.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

A la **taula 25** es mostren les mitjanes (n = 10) dels valors de TBARS de cada grup analitzat. L'anàlisi estadística es va realitzar independentment per a cada mostreig.

Taula 25 Mitjana del valor de l'oxidació lipídica en el rovell d'ou (el valor de TBARS s'expressa en mmols d'equivalents de MDA/kg rovell d'ou). Per a cada grup, n = 10.

	M1			M2		
	Control	Doxiciclina	Tilosina A	Control	Doxiciclina	Tilosina A
Valor de TBARS	1,90^a	2,28^b	2,29^b	1,26^a	1,51^b	1,48^b

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Les lletres que es troben en el superíndex indiquen diferències significatives (test de Tukey, $p < 0,05$) entre els valors mitjans dels diferents grups, dins de cada mostreig.

Les mostres procedents de les gallines ponedores tractades amb qualsevol dels dos antibiòtics d'estudi van presentar un increment significatiu del valor de TBARS, tant en les recollides abans com després del període de retirada, comparat amb les mostres del grup control (**taula 25**). Així doncs, aquests resultats confirmen que, tant la tilosina A com la doxiciclina provoquen una major sensibilitat del rovell de l'ou davant l'oxidació lipídica (augment del valor de TBARS i disminució de la concentració d' α -tocoferol).

No obstant això, a l'estudi que van realitzar Carreras et al., (2004) no es van observar diferències significatives en l'oxidació del múscul de la cuixa i del pit de pollastre com a conseqüència de l'administració d'enrofloxacina. Tot i això, es tracta d'una matriu i d'un antibiòtic diferent.

4.10 DETERMINACIÓ DELS RESIDUS DE TILOSINA A I DE DOXICICLINA EN EL ROVELL I LA CLARA DE L'OU

Per a la determinació dels dos antibiòtics d'estudi es van utilitzar dos mètodes:

- Extracció de la doxiciclina, en el rovell i en la clara d'ou, i extracció de la tilosina A en el rovell de l'ou (modificació del mètode descrit per Heller, Nochetto, Rummel, & Thomas (2006)).
- Extracció de la tilosina A en la clara d'ou (apartat 3.13.4).

4.10.1 Optimització del mètode d'anàlisi

Abans de dur a terme l'anàlisi de les mostres es va optimitzar el dissolvent orgànic utilitzat en la solució d'extracció. Les solucions d'extracció que es van estudiar van ser:

- Solució d'extracció 1: 100 mM de tampó succinat a pH = 3,5:metanol, 30:70, v/v.
- Solució d'extracció 2: 100 mM de tampó succinat a pH = 3,5:acetonitril, 30:70, v/v.

Per comparar les dues solucions d'extracció es va avaluar la recuperació i el coeficient de variació de cadascuna d'elles (**taula 26**).

Taula 26 Comparació de la recuperació (%) i del coeficient de variació (%) entre les dues solucions d'extracció (mitjana \pm desviació estàndard).

	Recuperació Metanol¹ (%) (n = 3)	Recuperació Acetonitril² (%) (n = 3)	CV (%) Metanol¹ (n = 3)	CV (%) Acetonitril² (n = 3)
Doxiciclina	41,9 \pm 2,8	49,6 \pm 3,2	6,8	6,5
Tilosina A	82,1 \pm 2,6	73,2 \pm 8,1	3,3	11,1

¹: solució d'extracció 1, elaborada amb metanol.

²: solució d'extracció 2, elaborada amb acetonitril.

CV = Coeficient de variació.

A la **taula 26** es pot observar que la tilosina A té una millor recuperació quan s'extreu amb metanol, en canvi la doxiciclina presenta una recuperació més elevada en l'extracció amb acetonitril. Tot i això, es va decidir utilitzar la solució d'extracció 1 ja que la dispersió de les dades de la tilosina A era menor comparat amb la solució d'extracció 2, mentre que la doxiciclina presentava una dispersió semblant en les dues solucions.

Un cop optimitzada la solució d'extracció es va observar que el protocol d'extracció utilitzat en el rovell d'ou no permetia extreure la tilosina A de la clara d'ou. Així doncs, es van provar tres mètodes diferents per a la seva extracció en la clara d'ou (apartat 3.13.4).

- Protocol 1: precipitació de les proteïnes mitjançant un dissolvent orgànic, l'acetonitril.
- Protocol 2: utilització d'un agent reductor (per trencar els enllaços disulfur), d'un agent alquilant i d'un enzim per a la digestió de les proteïnes.
- Protocol 3: es va seguir el mateix procediment que el protocol 2, però sense la digestió de les proteïnes mitjançant un enzim.

Després de calcular la recuperació dels tres protocols, el protocol escollit va ser el n° 1 ja que és el que presentava una major recuperació (**taula 27**).

Taula 27 Recuperació dels tres mètodes utilitzats per a l'extracció de la tilosina A en la clara d'ou (mitjana \pm desviació estàndard).

Protocol	Recuperació (%) (n = 3)
1	73,2 \pm 5,2
2 ^a	15,0 \pm 1,0
3	13,7 \pm 1,3

Protocol 1 = extracció amb acetonitril.

Protocol 2 = extracció amb agent reductor + agent d'alquilació + enzim.

Protocol 3 = extracció amb agent reductor + agent d'alquilació.

^a: modificació del mètode descrit per Yue et al., 2010.

Els resultats descrits a la **taula 27** no concorden amb els resultats obtinguts en el treball de Yue, Li, Liang, Dong, Dong, & Zhong (2010), en el qual van aconseguir millorar la recuperació d'alguns pesticides organofosforats en sang, gràcies a la utilització d'un agent reductor, d'un agent d'alquilació i d'un enzim en el procés d'extracció. No obstant això, es tracta de matrius i de compostos diferents (pesticides en lloc d'antibiòtics).

A la **figura 25** es mostren els cromatogrames amb mode SIM de la doxiciclina i de la tilosina A en una mostra de rovell d'ou, mitjançant la UPLC-MS/MS[®]. Les transicions MRM utilitzades per a la doxiciclina i per a la tilosina A van ser 445 > 428 i 916 > 174, respectivament. D'altra banda, a la **figura 26** s'il·lustren dos cromatogrames amb mode SIM de la tilosina A. El primer cromatograma (**figura 26 A**) prové d'un extracte de clara d'ou, obtingut mitjançant l'extracció del rovell de l'ou. En canvi, l'extracte de

clara d'ou del segon cromatograma es va obtenir mitjançant el protocol d'extracció número 1 de la clara d'ou (**figura 26 B**).

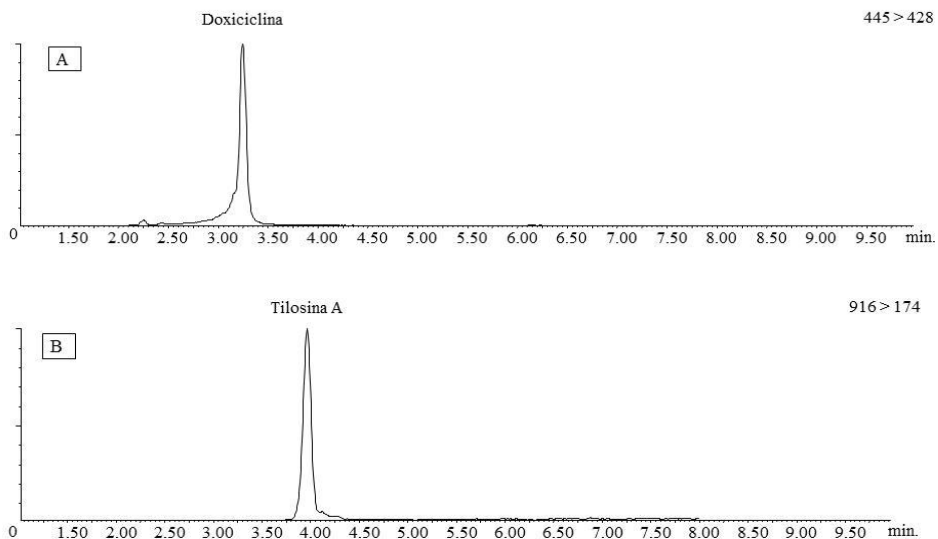


Figura 25 Cromatogrames amb mode SIM de la doxiciclina (A) i de la tilosina A (B) en una mostra de rovell d'ou, obtingut mitjançant la UPLC-MS/MS®.

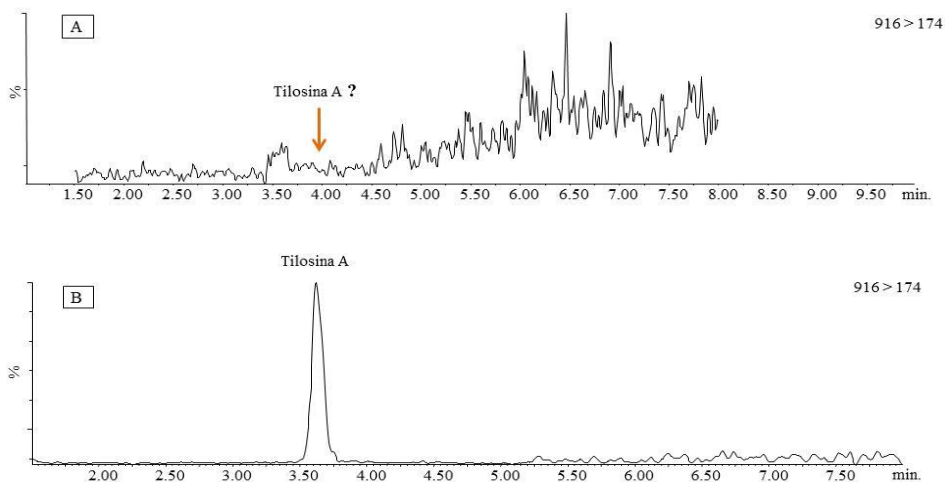


Figura 26 Cromatogrames amb mode SIM de la tilosina A en una mostra de clara d'ou, obtingut mitjançant la UPLC-MS/MS®. **A:** extracció de la tilosina A mitjançant el protocol d'extracció del rovell d'ou. **B:** extracció de la tilosina A mitjançant el protocol número 1 de la clara d'ou.

L'avaluació del mètode utilitzat, tant del rovell de l'ou (**taula 28**) com de la clara de l'ou (**taula 29**), es va realitzar calculant la recuperació, la repetibilitat intradia, el límit de detecció i el de quantificació. Aquests procediments es troben descrits a l'apartat 3.13.7, 3.9.7 o 3.6.5.5, respectivament.

Per a la quantificació de la tilosina A i de la doxiciclina es va usar una recta de calibratge per a cada matriu i per a cada compost (**taula 28 i 29**). Aquestes rectes es van elaborar fortificant mostres amb diferents concentracions dels patrons, abans dels procés d'extracció. Els intervals de fortificació estaven compresos entre 1-9000 µg/kg, segons l'anàlisi i la matriu.

Taula 28 Paràmetres d'avaluació del mètode de les mostres de rovell d'ou (mitjana ± desviació estàndard).

	Recuperació (%) n = 9	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recta de calibratge	r²
Doxiciclina	45,7 ± 4,7	7,0 ± 1,7	6,5 ± 1,8	0,50	1,61	$y = 59,2 \cdot x - 1619,7$	0,9985
Tilosina A	78,4 ± 2,7	6,9 ± 1,7	6,7 ± 1,4	0,19	0,63	$y = 229,9 \cdot x - 130,7$	0,9995

CV = Coeficient de variació.

LOD = Límit de detecció.

LOQ = Límit de quantificació.

r² = Coeficient de regressió.

Taula 29 Paràmetres d'avaluació del mètode de les mostres de la clara d'ou (mitjana ± desviació estàndard).

	Recuperació (%) n = 9	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	Repetibilitat intradia (CV, %) n = 9	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recta de calibratge	r²
Doxiciclina	42,7 ± 3,8	6,8 ± 1,8	6,4 ± 1,3	0,33	1,09	$y = 79,9 \cdot x - 2076,2$	0,9996
Tilosina A	73,2 ± 5,2	6,7 ± 1,1	6,1 ± 1,6	2,42	7,88	$y = 8,2 \cdot x + 102,6$	0,9987

CV = Coeficient de variació.
 LOD = Límit de detecció.
 LOQ = Límit de quantificació.
 r² = Coeficient de regressió

4.10.2 Avaluació dels efectes de l'administració d'antibiòtics

Un cop avaluat el mètode es van analitzar les mostres d'estudi. A les **taules 30 i 31** s'il·lustren les concentracions de doxiciclina i de tilosina A de cada matriu i de cada mostreig.

Taula 30 Concentració de doxiciclina en els rovells i en les clares dels ous de gallina (µg/kg de mostra). Per a cada grup, n = 10.

Doxiciclina	Rovell (µg/kg)	Clara (µg/kg)
	Mínim - màxim	Mínim - màxim
M1	676,3 - 2.041,2	3.565,1 - 8.174,0
M2	385,0 - 1.333,2	77,9 - 610,1

M1 = Mostreig previ al període de retirada.
 M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Taula 31 Concentració de tilosina A en els rovells i en les clares dels ous de gallina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de mostra). Per a cada grup, $n=10$.

Tilosina A	Rovell ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Clara ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Mínim - màxim	Mínim - màxim
M1	21,2 - 535,3	9,9 - 660,6
M2	12,0 - 111,7	< LOD

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

Després d'analitzar el contingut de tilosina A i de doxiciclina en els rovells i en les clares d'ou es va observar que:

- En les mostres del grup control, tant abans com després del període de retirada, la concentració dels antibiòtics d'estudi era inferior al límit de detecció.
- Les concentracions de doxiciclina detectades en els rovells i en les clares d'ou sempre van ser majors respecte les de tilosina A, tant en el M1 com en el M2.
- En cap de les mostres procedents dels animals tractats amb doxiciclina es va detectar tilosina A i tampoc es va detectar doxiciclina en cap de les mostres procedents de les gallines tractades amb tilosina A.
- En les mostres recollides abans del període de retirada, els dos antibiòtics d'estudi es van acumular en major quantitat en la clara, en lloc del rovell d'ou.
- Tant l'eliminació de la tilosina A com de la doxiciclina va ser més ràpida en la clara que en el rovell d'ou.

- Després del període de retirada, les concentracions de tilosina A eren inferiors al límit de detecció, mentre que les concentracions de doxiciclina encara eren elevades ($> 385 \mu\text{g}/\text{kg}$ en el rovell i $> 78 \mu\text{g}/\text{kg}$ clara).

El conjunt de resultats obtinguts, respecte la distribució i l'acumulació de tilosina A i de doxiciclina en l'ou, coincideixen amb altres estudis realitzats prèviament (Kan & Petz, 2000; Keukens et al., 2000; Yoshimura et al., 1991).

4.11 EFECTES GLOBALS SOBRE PARÀMETRES DE COMPOSICIÓ DE L'OU

Els efectes globals que van patir els paràmetres d'estudi, a causa de l'administració de doxiciclina a les gallines ponedores, es troben descrits a la **taula 32**.

Taula 32 Efectes causats per l'administració de doxiciclina sobre els paràmetres de composició que s'han analitzat en els ous de gallina.

	Doxiciclina	
	M1	M2
Proteïnes	=	=
Àcids grassos totals		
Σ AGT (g/kg rovell)	↑	↑
Σ SFA (g/kg rovell)	=	↑
Σ MUFA (g/kg rovell)	=	↑
Σ PUFA (g/kg rovell)	=	↑
Σ n-6 (g/kg rovell)	=	↑
Σ n-6/ Σ n-3	↑	↑
Triglicèrid POL (g/kg rovell)	=	↑
Àcids grassos triglicèrids (g/kg rovell)	=	=
Àcids grassos lliures (g/kg rovell)	=	=
Àcids grassos fosfolípids (g/kg rovell)	=	=
Colesterol (g/kg rovell)	=	↑
5-MTHF (mg/kg rovell)	=	=
Retinol (mg/kg rovell)	=	=
Luteïna (mg/kg rovell)	=	=
Cantaxantina (mg/kg rovell)	=	↑
α -tocoferol (mg/kg rovell)	↓	↓
Valor de TBARS (mmolsMDA/kg rovell)	↑	↑

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

= : No hi ha hagut canvis significatius² respecte les mostres del grup control.

↑ : el valor mitjà ha augmentat significativament² respecte les mostres del grup control.

↓ : el valor mitjà ha disminuït significativament² respecte les mostres del grup control.

² L'anàlisi estadística per evidenciar diferències significatives entre les mitjanes es va realitzar mitjançant ANOVA i el test de HSD Tukey. El nivell de confiança establert va ser de $p < 0,05$.

A la **taula 33** es mostren els efectes globals que van patir els compostos estudiats a causa de l'administració de tilosina A a les gallines ponedores.

Taula 33 Efectes causats per l'administració de tilosina A sobre els paràmetres de composició que s'han analitzat en els ous de gallina.

	Tilosina A	
	M1	M2
Proteïnes	=	=
Àcids grassos totals		
Σ AGT (g/kg rovell)	↑	=
Σ SFA (g/kg rovell)	↑	=
Σ MUFA (g/kg rovell)	=	=
Σ PUFA (g/kg rovell)	=	=
Σ n-6 (g/kg rovell)	=	=
Σ n-6/ Σ n-3	=	=
Triglicèrid POL (g/kg rovell)	=	=
Àcids grassos triglicèrids (g/kg rovell)	=	=
Àcids grassos lliures (g/kg rovell)	=	=
Àcids grassos fosfolípids (g/kg rovell)	=	=
Colesterol (g/kg rovell)	=	=
5-MTHF (mg/kg rovell)	=	=
Retinol (mg/kg rovell)	=	=
Luteïna (mg/kg rovell)	=	=
Cantaxantina (mg/kg rovell)	=	=
α -tocoferol (mg/kg rovell)	=	↓
Valor de TBARS (mmolsMDA/kg rovell)	↑	↑

M1 = Mostreig previ al període de retirada.

M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

= : No hi ha hagut canvis significatius³ respecte les mostres del grup control.

↑: el valor mitjà ha augmentat significativament² respecte les mostres del grup control.

↓: el valor mitjà ha disminuït significativament² respecte les mostres del grup control.

³ L'anàlisi estadística per evidenciar diferències significatives entre les mitjanes es va realitzar mitjançant ANOVA i el test de HSD Tukey. El nivell de confiança establert va ser de $p < 0,05$.

El tractament amb doxiciclina, a diferència del tractament amb tilosina A, és el que va produir més canvis significatius en els compostos estudiats, sobretot en els ous recollits en el mostreig posterior al període de retirada. La majoria d'aquests canvis es van manifestar amb un increment de la concentració d'aquests anàlits respecte la del grup control.

A les **taules 32 i 33** s'observa la disminució de la concentració de l' α -tocoferol i l'augment en el valor de TBARS, tant en els rovells procedents dels ous tractats amb tilosina A com amb doxiciclina, fet que comporta que els rovells presentin una major sensibilitat davant de l'oxidació lipídica. Com a conseqüència de l'augment en la predisposició dels rovells davant l'oxidació lipídica es poden produir efectes negatius en les qualitats organolèptiques i en les propietats nutricionals de l'ou de gallina o dels seus derivats (Chen et al., 1998).

Les rutes metabòliques mostren que tant la biosíntesi del colesterol, de l' α -tocoferol, de la luteïna com de la zeaxantina estan relacionades pel pirofosfat de farnesil. No obstant això, en aquest treball s'han detectat canvis significatius en la concentració del colesterol i de l' α -tocoferol, però no s'han detectat canvis significatius en la concentració de la luteïna ni de la zeaxantina. A més, la concentració de colesterol augmenta mentre que la d' α -tocoferol disminueix com a conseqüència de l'administració de tilosina A i de doxiciclina. Per aquest motiu, encara que el pirofosfat de farnesil estigui involucrat en la biosíntesi dels terpens, dels terpenoids i dels esterols, la tilosina A i la doxiciclina han d'afectar algun enzim que formi part de cada ruta metabòlica en concret (KEGG).

Per minimitzar els canvis composicionals i nutricionals no desitjats en els ous de gallina, com a conseqüència del tractament antibiòtic, es podria estudiar si l'administració d'una dieta específica a les gallines ponedores

durant el tractament antibiòtic i durant el període de retirada seria eficaç contra aquests canvis. Per exemple, una dieta rica en vitamina E pot disminuir la sensibilitat dels rovells d'ou davant de l'oxidació lipídica (Carreras et al., 2004).

4.12 IDENTIFICACIÓ DE POSSIBLES BIOMARCADORS

El conjunt de resultats indiquen una influència significativa entre l'administració de tilosina A i de doxiciclina a les gallines ponedores i el metabolisme d'alguns components nutricionals del rovell de l'ou.

A la **figura 27** es mostren els resultats de l'anàlisi de components principals (PCA), on els dos components principals (PC) representen el 91 % de la variància total. El primer PC contrasta les mostres en base la concentració de cinc paràmetres (àcid palmític, àcid oleic, àcid vaccènic, sumatori dels àcids grassos saturats i sumatori dels àcids grassos monoinsaturats), mentre que el segon PC contrasta les mostres segons el valor de tres relacions entre triglicèrids (POL/OOO, POL/POO, POO/OOO).

La representació gràfica de les funcions en el pla coordinat, definida pels dos PC, mostra que:

- Les mostres control tant del mostreig previ com posterior al període de retirada estan solapades unes amb les altres.
- Les mostres procedents de les gallines tractades amb tilosina A pràcticament també es troben solapades amb les mostres control.
- Les mostres procedents de les gallines tractades amb doxiciclina mostren una tendència cap a una discriminació respecte les mostres control. Les concentracions dels cinc paràmetres, corresponents al primer component principal, s'incrementen en les mostres recollides després del període de retirada, encara que la concentració de doxiciclina vagi disminuint.

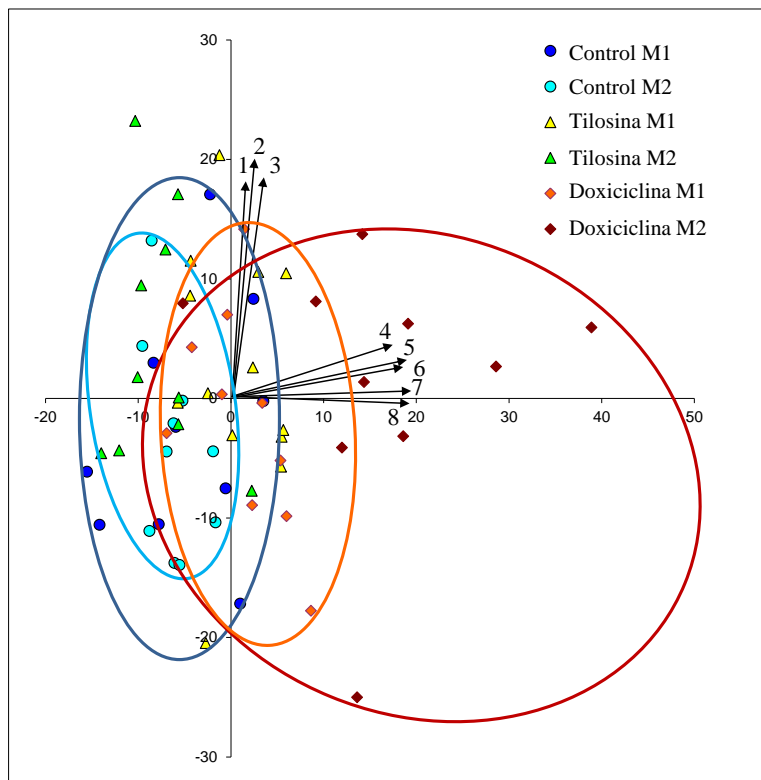


Figura 27 Representació de l'anàlisi de components principals.

M1 = Mostreig previ al període de retirada.
 M2 = Mostreig posterior al període de retirada.

- 1 = POL/OOO
- 2 = POL/POO
- 3 = POO/OOO
- 4 = Àcid palmític
- 5 = Àcid oleic
- 6 = Àcid vaccènic
- 7 = Sumatori dels àcids grassos saturats
- 8 = Sumatori dels àcids grassos monoinsaturats

Cal destacar la falta d'informació prèvia, a nivell bibliogràfic, referent als efectes de l'administració de tilosina A i de doxiciclina sobre paràmetres nutricionals i de composició de l'ou de gallina. Per aquesta raó, es va incloure a l'estudi un elevat nombre de paràmetres de composició de l'ou.

A l'anàlisi de components principals s'il·lustra una certa tendència de possibles biomarcadors, com a conseqüència del tractament amb doxiciclina, sobretot relacionats amb la fracció lipídica (**figura 27**). No obstant això, aquest estudi és preliminar i s'hauria de fer un treball més exhaustiu per poder treure'n més conclusions. A més, també seria interessant estudiar els enzims relacionats amb el metabolisme lipídic per si es produeixen canvis significatius.

Amb l'ajuda de biomarcadors es podrien detectar pràctiques fraudulentas en l'ús de medicaments, hormones, promotors de creixement, etc. en gallines ponedores. A la bibliografia hi ha algun estudi on han identificat o estudiat biomarcadors com a conseqüència de l'administració d'hormones, com la testosterona i la dexametasona, o d'antibiòtics, com la tetraciclina, a animals destinats al consum humà (Cacciatore et al., 2009; Castagnaro & Poppi, 2006; Gratacos-Cubarsi et al., 2008). Cal destacar que hi ha poca informació al respecte i que encara falta molt per investigar en aquest àmbit.

5. CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquest estudi són:

- En el cas de les gallines ponedores tractades amb **tilosina A**:

Els rovells dels ous recollits abans del període de retirada van patir un increment significatiu en la concentració dels àcids grassos totals i en la dels àcids grassos saturats, si es compara amb les mostres control.

Els rovells dels ous procedents del mostreig posterior al període de retirada van mostrar una disminució significativa de la concentració de l' α -tocoferol i un augment significatiu de la predisposició davant l'oxidació lipídica (valors de TBARS), comparat amb les mostres control.

Els rovells dels ous recollits tant abans com després del període de retirada no van patir canvis significatius en la concentració dels triglicèrids, dels àcids grassos lliures, dels fosfolípids, del colesterol, de l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic, del retinol, de la luteïna ni de la cantaxantina, respecte les mostres control.

Tant en les clares procedents dels ous recollits abans com després del període de retirada no es van observar diferències significatives en la concentració de proteïnes, si es compara amb les mostres control.

- En el cas de les gallines ponedores tractades amb **doxiciclina**:

Els rovells dels ous procedents del mostreig posterior al període de retirada van mostrar un increment significatiu de la concentració dels àcids grassos (SFA, MUFA, PUFA i àcids grassos n-6), excepte en el cas dels àcids grassos n-3, si es compara amb les mostres control. A més, les concentracions de colesterol, del triglicèrid POL i de la

cantaxantina també van patir un augment significatiu, comparat amb les mostres control.

Els rovells dels ous recollits tant abans com després del període de retirada van patir un increment significatiu de la concentració dels àcids grassos totals, de la relació entre els àcids grassos n-6 i n-3 i del valor de TBARS, si es compara amb les mostres control. A més, també van manifestar una disminució significativa en la concentració de l' α -tocoferol, fet que provoca un augment de la sensibilitat davant l'oxidació lipídica, comparat amb les mostres control. No obstant això, no es van observar diferències significatives en la concentració de l'àcid 5-metiltetrahidrofòlic, dels àcids grassos lliures, dels fosfolípids, del retinol, així com de la luteïna, en comparació amb les mostres control.

Tant les clares dels ous procedents del mostreig previ com del posterior al període de retirada no van patir canvis significatius en la concentració de proteïnes, respecte les mostres control.

- L'anàlisi de components principals va indicar que alguns constituents relacionats amb la fracció lipídica del rovell de l'ou podrien ser utilitzats com a potencials biomarcadors del tractament amb doxiciclina, tot i que caldria corroborar aquests resultats amb estudis més exhaustius.
- Aquest estudi ha evidenciat que l'administració de tilosina A i de doxiciclina, a les gallines ponedores, va modificar significativament paràmetres de composició dels ous que estan relacionats amb les propietats organolèptiques i tecnològiques (sensibilitat davant

l'oxidació) de l'ou. Aquestes variacions inclús es van observar en ous aptes pel consum humà (concentració de tilosina A inferior al LMR).

6. BIBLIOGRAFIA

Aarestrup, F. M., Wegener, H. C., & Collignon, P. (2008). Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6, 733-750.

Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide, 3r edition. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, 2008.

Ahn, J. H., Jeong, I. S., Kwak, B. M., Leem, D., Yoon, T., Yoon, C., et al. (2012). Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. *Food Chemistry*, 135, 2411-2417.

Alfredsson, G., Branzell, C., Granelli, K., & Lundstrom, A. (2005). Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 529, 47-51.

Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49-73.

Anderson, C. R., Rupp, H. S., & Wu, W. H. (2005). Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075, 23-32.

Arcot, J., & Shrestha, A. (2005). Folate: Methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 253-266.

Ashenafi, D., Hoogmartens, J., & Adams, E. (2011). An improved liquid chromatographic method for the analysis of tylosin and its impurities. *Journal of Separation Science*, 34, 2631-2638.

Aust, M. O., Godlinski, F., Travis, G. R., Hao, X. Y., McAllister, T. A., Leinweber, P., et al. (2008). Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environmental Pollution*, 156, 1243-1251.

Awade, A. C., & Efstathiou, T. (1999). Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis. *Journal of Chromatography B*, 723, 69-74.

Barriuso, B., Astiasaran, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 236, 1-15.

Barroeta, A. C. (2002). Formación del huevo. (Ed. A. Sastre; R. M. Sastre; F. Tortuero; G. Suárez; G. Vergara; C. López), *Lecciones sobre el huevo* (p. 45 - 56). Madrid: Instituto de Estudios del Huevo.

Barroeta, A. C. (2008). El huevo y sus componentes como alimento funcional. *Revista de Nutrición Práctica*, 12, 28-33.

Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13, 279-299.

Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychoudhuri, U., & Chakraborty, R. (2007). Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry*, 70, 375-379.

Berendsen, B. J. A., Pikkemaat, M. G., & Stolker, L. A. M. (2011). Are antibiotic screening approaches sufficiently adequate? A proficiency test. *Analytica Chimica Acta*, 685, 170-175.

Beyer, R. S., & Jensen, L. S. (1989). Overestimation of the cholesterol content of eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 917-920.

Beyer, J. D., Milani, F. X., Dutelle, M. J., & Bradley, R. L. (1989). Gas-chromatographic determination of cholesterol in egg products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 746-748.

Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Laboratories GmbH, Munchen, Germany, 2008.

Bitman, J., Wood, D. L., & Ruth, J. M. (1981). Two-stage, one-dimensional Thin Layer Chromatographic method for separation of lipid classes. *Journal of Liquid Chromatography*, 4, 1007-1021.

Blackwell, P. A., Kay, P., Ashauer, R., & Boxall, A. B. A. (2009). Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere*, 75, 13-19.

Bladek, T., Posyniak, A., Gajda, A., Gbylik, M., & Zmudzki, J. (2012). Multi-class procedure for analysis of antibacterial compounds in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56, 321-327.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

- Bocker, R., Estler, C. J., Maywald, M., & Weber, D. (1981). Comparative-evaluation of the effects of tetracycline and doxycycline on blood and liver lipids of male and female mice. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 31-2, 2118-2120.
- Bogialli, S., Ciampanella, C., Curini, R., Di Corcia, A., & Lagana, A. (2009). Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6810-6815.
- Bondia-Pons, I., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., & Lopez-Sabater, M. C. (2006). Determination of phospholipid fatty acids in biological samples by solid-phase extraction and fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1116, 204-208.
- Borras, S., Companyo, R., Granados, M., Guiteras, J., Perez-Vendrell, A. M., Brufau, J., et al. (2011). Analysis of antimicrobial agents in animal feed. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 30, 1042-1064.
- Botsoglou, N., Fletouris, D., Psomas, I., & Mantis, A. (1998). Rapid gas chromatographic method for simultaneous determination of cholesterol and alpha-tocopherol in eggs. *Journal of AOAC International*, 81, 1177-1183.
- Botsoglou, N. A., & Fletouris, D. J. (2001). Drug residues in food. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Botsoglou, N. A., Yannakopoulos, A. L., Fletouris, D. J., Tserveni-Goussi, A. S., & Fortomaris, P. D. (1997). Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3711-3716.
- Boxall, A. B. A., Johnson, P., Smith, E. J., Sinclair, C. J., Stutt, E., & Levy, L. S. (2006). Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2288-2297.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bragagnolo, N., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). Comparison of the cholesterol content of Brazilian chicken and quail eggs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 147-153.

Brown, D., Golub, L. M., Lee, H. M., Greenwald, R., Ryan, M., & Desal, K. (2005). *U.S. Patent No. 6841547 B2*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Bruno, F., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., & Pallagrosi, M. (2002). An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *16*, 1365-1376.

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*, 302-310.

Burrows, G. E. (1980). Pharmacotherapeutics of macrolides, lincosamides, and spectinomycin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *176*, 1072-1077.

Cacciatore, G., Eisenberg, S. W. F., Situ, C., Mooney, M. H., Delahaut, P., Klarenbeek, S., Huet, A. C., Bergwerff, A. A., & Elliot, C. T. (2009). Effect of growth-promoting 17 β -estradiol, 19-nortestosterone and dexamethasone on circulating levels of nine potential biomarker candidates in veal calves. *Analytica Chimica Acta*, *637*, 351-359.

Camara, J. E., Lowenthal, M. S., & Phinney, K. W. (2013). Determination of fortified and endogenous folates in food-based Standard Reference Materials by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*, 4561-4568.

Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., & Lagana, A. (2012). Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. *Journal of Chromatography A*, *1268*, 84-90.

Carletti, M., Gusson, F., Zaghini, A., Dacasto, M., Marvasi, L., & Nebbia, C. (2003). In vitro formation of metabolic-intermediate cytochrome P450 complexes in rabbit liver microsomes by tiamulin and various macrolides. *Veterinary Research*, *34*, 405-411.

Carreras, I., Castellari, M., Regueiro, J. A. G., Guerrero, L., Esteve-Garcia, E., & Sarraga, C. (2004). Influence of enrofloxacin administration and alpha-tocopherol acetate supplemented diets on oxidative stability of broiler tissues. *Poultry Science*, *83*, 796-802.

Castagnaro, M., & Poppi, L. (2006). Indirect biomarkers of illegal anabolic treatments: five years of activity under the microscope. *Veterinary Research Communications*, 30, (suppl. 1), 105-108.

Cayuela, J. M., Garrido, M. D., Banon, S. J., & Ros, J. M. (2003). Simultaneous HPLC analysis of alpha-tocopherol and cholesterol in fresh pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1120-1124.

Chafer-Pericas, C., Maquieira, A., & Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1038-1049.

Chandra-Hioe, M. V., Bucknall, M. P., & Arcot, J. (2011). Folate analysis in foods by UPLC-MS/MS: development and validation of a novel, high throughput quantitative assay; folate levels determined in Australian fortified breads. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1035-1042.

Charest, M. G., Lerner, C. D., Brubaker, J. D., Siegel, D. R., & Myers, A. G. (2005). A convergent enantioselective route to structurally diverse 6-deoxytetracycline antibiotics. *Science*, 308, 395-398.

Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Noziere, P., & Graulet, B. (2010). Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 777-790.

Chen, L., & Eitenmiller, R. R. (2007). Single laboratory method performance evaluation for the analysis of total food folate by trienzyme extraction and microplate assay. *Journal of Food Science*, 72, C243-C247.

Chen, J. Y., Latshaw, J. D., Lee, H. O., & Min, D. B. (1998). α -Tocopherol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary α -tocopherol. *Journal of Food Science*, 63, 919-922.

Cherian, G., Holsonbake, T. B., & Goeger, M. P. (2002). Fatty acid composition and egg components of specialty eggs. *Poultry Science*, 81, 30-33.

Cherian, G., Traber, M. G., Goeger, M. P., & Leonard, S. W. (2007). Conjugated linoleic acid and fish oil in laying hen diets: Effects on egg fatty acids, thiobarbituric acid reactive substances, and tocopherols during storage. *Poultry Science*, 86, 953-958.

Chopra, I. (1994). Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 637-640.

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260.

Chopra, S., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J., & Adams, E. (2013). Characterization of impurities in tylosin using dual liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 106, 29-38.

Chu, P., Donoghue, D. J., & Shaikh, B. (2000). Determination of total ¹⁴C residues of sarafloxacin in eggs of laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6409-6411.

Cogan, T. M. (1972). Susceptibility of cheese and yogurt starter bacteria to antibiotics. *Applied Microbiology*, 23, 960-965.

Comunicació de la Comissió referent a la llista dels additius autoritzats en els pinsos publicada conforme a la lletra b) de l'article 9 *unviciés* de la Directiva 70/524/CEE del Consell sobre els additius en l'alimentació animal. *Official Journal of the European Union* 2004/C 50/01, 1-144.

Cunha, S. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2006). Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD. *Food Chemistry*, 95, 518-524.

Czeizel, A. E., & Dudas, I. (1992). Prevention of the 1st occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *New England Journal of Medicine*, 327, 1832-1835.

D'Ambrosio, C., Arena, S., Scalonì, A., Guerrier, L., Boschetti, E., & Mendieta, M. E. (2008). Exploring the chicken egg white proteome with combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Proteome Research*, 7, 3461-3474.

Dacasto, M., Montesissa, C., & Nebbia, C. (2006). Illegal drug treatments and drug metabolism: biomarkers or not? *Veterinary Research Communications*, 30, (suppl. 1), 113-119.

Daneshfar, A., Khezeli, T., & Lotfi, H. J. (2009). Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. *Journal of Chromatography B*, 877, 456-460.

DANMAP. (2001). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://www.danmap.org/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2001.ashx

De Brouwer, V., Storozhenko, S., Stove, C. P., Van Daele, J., Van Der Straeten, D. & Lambert, W. E. (2010). Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice. *Journal of Chromatography B*, 878, 509-513.

Decisió de la Comissió 2002/657/CE, del 12 d'agost de 2002, on s'aplica la Directiva 96/23/CE en quan el funcionament dels mètodes analítics i la interpretació dels resultats. *Official Journal of the European Union* 2002, L 221, 8-36. (notified under document number C(2002) 3044)

Desert, C., Guerin-Dubiart, C., Nau, F., Jan, G., Val, F., & Mallard, J. (2001). Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4553-4561.

Devi, R., Arcot, J., Sotheeswaran, S., & Ali, S. (2008). Folate contents of some selected Fijian foods using tri-enzyme extraction method. *Food Chemistry*, 106, 1100-1104.

Diaz, I., Garcia Regueiro, J. A., Casillas, M., & De Pedro, E. (1996). Triglyceride composition of fresh ham fat from Iberian pugs produced with different systems of animal nutrition. *Food Chemistry*, 55, 383-387.

Dinh, T. T. N., Thompson, L. D., Galyean, M. L., Brooks, J. C., Patterson, K. Y., & Boylan, L. M. (2011). Cholesterol content and methods for cholesterol determination in meat and poultry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 269-289.

Directiva 96/23/CE del Consell, de 29 d'abril de 1996, relativa a les mesures de control aplicables respecte determinades substàncies i els seus residus en els animals vius i els seus productes i per la que es deroguen les Directives 85/358/CEE i 86/469/CEE i les Decisions 89/187/CEE i 91/664/CEE. *Official Journal of the European Union* 1996, L125, 1-28.

Directiva 2001/82/CE del Parlament Europeu i del Consell, del 6 novembre 2001, on s'estableix un codi comunitari sobre els medicaments veterinaris. *Official Journal of the European Union* 2001, L311, 1-110.

Directiva 2002/4/CE de la Comissió, del 30 de gener del 2002, relativa al registre d'establiments de gallines ponedores, coberts per la Directiva 1999/74/EC del Consell. *Official Journal of the European Union 2002*, L 30, 44-46.

Directiva 2002/32/CE del Parlament Europeu i del Consell, del 7 de maig de 2002, sobre substàncies indesitjables en l'alimentació animal. *Official Journal of the European Union 2002*, L40, 10-21.

Directiva 2003/99/CE del Parlament Europeu i del Consell, de 17 de novembre de 2003, sobre la vigilància de les zoonosis i els agents zoonòtics i per la que es modifica la Decisió 90/424/CEE del Consell i es deroga la Directiva 92/117/CEE. *Official Journal of the European Union 2003*, L325, 31-40.

Doherty, R. F., & Beecher, G. R. (2003). A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 354-361.

Dolliver, H., Gupta, S., & Noll, S. (2008). Antibiotic degradation during manure composting. *Journal of Environmental Quality*, 37, 1245-1253.

Donoghue, D. J., Hairston, H., Gaines, S. A., Bartholomew, M. J., & Donoghue, A. M. (1996). Modeling residue uptake by eggs. 1. Similar drug residue patterns in developing yolks following injection with ampicillin or oxytetracycline. *Poultry Science*, 75, 321-328.

Donoghue, D. J., Hairston, H., Henderson, M., McDonald, M., Gaines, S., & Donoghue, A. M. (1997). Modeling drug residue uptake by eggs: yolks contain ampicillin residues even after drug withdrawal and nondetectability in the plasma. *Poultry Science*, 76, 458-462.

Donoghue, D. J., & Myers, K. (2000). Imaging residue transfer into egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6428-6430.

Dugo, P., Kumm, T., Lo Presti, M., Chiofalo, B., Salimei, E., Fazio, A., et al. (2005). Determination of triacylglycerols in donkey milk by using high performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 28, 1023-1030.

EMEA/MRL/205/97-FINAL (1997). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Committee for veterinary medicinal products: Tylosin summary report 3.

EMEA/MRL/270/97-FINAL (1997). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Committee for veterinary medicinal products: Doxycycline summary report 2.

EMEA/MRL/732/00-FINAL (2000). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Committee for veterinary medicinal products: Tylosin summary report 4 (extension to eggs).

European Commission. (2008). Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2007, (Council Directive 96/23/EC). Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf

European Commission. (2010 a). Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2008, (Council Directive 96/23/EC). Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2008_en.pdf

European Commission. (2010 b). Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2009, (Council Directive 96/23/EC). Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2009_en.pdf

European Commission. (2011). Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2010, (Council Directive 96/23/EC). Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2010_en.pdf

European Commission. (2012). Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2011, (Council Directive 96/23/EC). Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/docs/workdoc_2011_en.pdf

European Commission. (2013). Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2012, (Council Directive 96/23/EC). Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/docs/workdoc_2012_en.pdf

European Food Safety Authority. (2010). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. *EFSA Journal*, 8, 1309.

FAOSTAT database. (2014). Food and Agriculture Organization Statistical Database. United Nations. Recuperat el 12 de juliol de 2015, a <http://faostat.fao.org>

Fenton, M. (1992). Chromatographic-separation of cholesterol in foods. *Journal of Chromatography*, 624, 369-388.

Fenton, M., & Sim, J. S. (1991). Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 540, 323-329.

Fernandez, J., Perez-Alvarez, J. A., & Fernandez-Lopez, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59, 345-353.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Fredriksson, S., Elwinger, K., & Pickova, J. (2006). Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. *Food Chemistry*., 99, 530-537.

Frenich, A. G., Aguilera-Luiz, M. D., Vidal, J. L. M., & Romero-Gonzalez, R. (2010). Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661, 150-160.

Fromenty, B., & Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 67, 101-154.

Fuchs, B., Schiller, J., Sub, R., Schurenberg, M., & Suckau, D. (2007). A direct and simple method of coupling matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of phospholipids from egg yolk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 827-834.

Furusawa, N. (2001). Simplified liquid-chromatographic determination of residues of tetracycline antibiotics in eggs. *Chromatographia*, 53, 47-50.

Galobart, J., Barroeta, A. C., Baucells, M. D., Cortinas, L., & Guardiola, F. (2001 a). α -tocopherol transfer efficiency and lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with ω 3-polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*, *80*, 1496-1505.

Galobart, J., Barroeta, A. C., Baucells, M. D., & Guardiola, F. (2001 b). Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. *Poultry Science*, *80*, 327-337.

Gasior, R., & Pietras, M. P. (2013). Validation of a method for determining cholesterol in egg yolks. *Annals of Animal Science*, *13*, 143-153.

Gaudin, V., Hedou, C., Rault, A., Sanders, P., & Verdon, E. (2009). Comparative study of three screening test, two microbiological tube tests, and a multi-sulphonamide ELISA kit for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs. *Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, *26*, 427-440.

Gautron, J., Rehault-Godbert, S., Jonchere, V., Herve-Grepinet, V., Mann, K., & Nys, Y. (2010). High-throughput technology (proteomics and transcriptomics) to identify and functionally characterise new egg proteins. *Productions animals*, *23*, 133-141.

Geis-Asteggiante, L., Lehotay, S. J., Lightfield, A. R., Dutko, T., Ng, C., & Bluhm, L. (2012). Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for > 100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1258*, 43-54.

Generalitat de Catalunya. (2014). Investigació de residus en aliments d'origen animal. Informe de resultats de 2013. Recuperat el 12 de juliol de 2015, a http://salutweb.gencat.cat/web/.content/home/ambits_tematics/per_perfiles/empreses_i_establiments/empreses_i_professionals_de_lambit_alimentari/documents_tecnics_salut_alimentaria/informes_tecnics/documents/arxiu/invest_residus_aliment_r13.pdf

Gentili, A., & Caretti, F. (2011). Evaluation of a method based on liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry for a rapid and comprehensive characterization of the fat-soluble vitamin and carotenoid profile of selected plant foods. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 684-697.

Gentili, A., Perret, D., & Marchese, S. (2005). Liquid chromatography - tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal - food products. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 24, 704-733.

Gładkowski, W., Kielbowicz, G., Chojnacka, A., Gil, M., Trziszka, T., Dobrzanski, Z., & Wawrzenczyk, C. (2011). Fatty acid composition of egg yolk phospholipid fractions following feed supplementation of Lohmann Brown hens with humic-fat preparations. *Food Chemistry*, 126, 1013-1018.

Gleize, B., Steib, M., Andre, M., & Reboul, E. (2012). Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q₁₀ and carotenoids in complex samples. *Food Chemistry*, 134, 2560-2564.

Goetting, V., Lee, K. A., & Tell, L. A. (2011). Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34, 521-556.

Goyer, A., & Navarre, D. A. (2007). Determination of folate concentrations in diverse potato germplasm using a trienzyme extraction and a microbiological assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3523-3528.

Gratacos-Cubarsi, M., Castellari, M., Hortos, M., Garcia-Regueiro, J. A., Lametsch, R., & Jessen, F. (2008). Effects of tetracycline administration on the proteomic profile of pig muscle samples (L. dorsi). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9312-9316.

Grau, A., Codony, R., Grimpa, S., Baucells, M. D., & Guardiola, F. (2001). Cholesterol oxidation in frozen dark chicken meat: influence of dietary fat source, and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Meat Science*, 57, 197-208.

Gray, J. I. (1978). Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 539-546.

Grune, T., Kramer, K., Hoppe, P. P., & Siems, W. (2001). Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: Effects of vitamin E supplementation. *Lipids*, 36, 833-838.

Grunwald, L., & Petz, M. (2003). Food processing effects on residues: Penicillins in milk and yoghurt. *Analytica Chimica Acta*, 483, 73-79.

Guerin-Dubiard, C., Pasco, M., Molle, D., Desert, C., Croguennec, T., & Nau, F. (2006). Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3901-3910.

Guillen-Sans, R., & Guzman-Chozas, M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 315-330.

Gujaska, E., & Kuncewicz, A. (2005). Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in Poland using trienzyme extraction and high-performance liquid chromatography methods. *European Food Research and Technology*, 221, 208-213.

Hammershoj, M., Kidmose, U., & Steenfeldt, S. (2010). Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material for egg-laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1163-1171.

Hargitai, R., Matus, Z., Hegyi, G., Michl, G., Toth, G., & Torok, J. (2006). Antioxidants in the egg yolk of a wild passerine: Differences between breeding seasons. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 143, 145-152.

Heaton, P. C., Fenwick, S. R., & Brewer, D. E. (2007). Association between tetracycline or doxycycline and hepatotoxicity: a population based case - control study. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 32, 483-487.

Hebert, K., House, J. D., & Guenter, W. (2005). Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens. *Poultry Science*, 84, 1533-1538.

Heller, D. N., & Nochetto, C. B. (2004). Development of multiclass methods for drugs residues in eggs: silica SPE cleanup and LC-MS/MS Analysis of ionophore and macrolide residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6848-6856.

Heller, D. N., Nochetto, C. B., Rummel, N. G., & Thomas, M. H. (2006). Development of multiclass methods for drug residues in eggs: Hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and beta-lactam residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5267-5278.

Hoang, P. T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Shimizu, A., Anh, D. H., et al. (2011). Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of the Total Environment*, 409, 2894-2901.

Holcapek, M., Lisa, M., Jandera, P., & Kabatova, N. (2005). Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection. *Journal of Separation Science*, 28, 1315-1333.

Hopf, G., Bocker, R., & Estler, C. J. (1985). Comparative effects of tetracycline and doxycycline on liver-function of young-adult and old mice. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 278, 157-168.

House, J. D., Braun, K., Ballance, D. M., O'Connor, C. P., & Guenter, W. (2002). The enrichment of eggs with folic acid through supplementation of the laying hen diet. *Poultry Science*, 81, 1332-1337.

Hu, D., & Coats, J. R. (2007). Aerobic degradation and photolysis of tylosin in water and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 884-889.

Hu, F. B., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Manson, J. E., Ascherio, A., Colditz, G. A., et al. (1999). A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 281, 1387-1394.

Huet, A. C., Charlier, C., Weigel, S., Godefroy, S. B., & Delahaut, P. (2009). Validation of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for screening (fluoro)quinolones in egg, fish and poultry. *Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 26, 1341-1347.

Huet, A. C., Fodey, T., Haughey, S. A., Weigel, S., Elliott, C., & Delahaut, P. (2010). Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1281-1294.

IDESCAT (2014). Anuari Estadístic de Catalunya. Recuperat el 10 de juliol de 2015, a <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=458>

Indyk, H. E., & Woollard, D. C. (2013). Single laboratory validation of an optical biosensor method for the determination of folate in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 87-93.

Instituto de Estudios del Huevo. (2009). *El gran libro del huevo*. León: Editorial Everest, S.A.

Iritani, Y., Hidaka, S., Kitabatake, T., & Sasaki, S. (1976). Tylosin levels in egg of laying hen given medicated drinking water. *Japanese Poultry Science*, 13, 248-249.

Iyer, R., & Tomar, S. K. (2013). Determination of folate/folic acid level in milk by microbiological assay, immuno assay and high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research*, 80, 233-239.

Ja, X. F., Shao, B., Wu, Y. N., Yang, Y., & Zhang, J. (2008). Simultaneous determination of tetracyclines and quinolones antibiotics in egg by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 91, 461-468.

Jagerstad, M., & Jastrebova, J. (2013). Occurrence, stability, and determination of formyl folates in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 9758-9768.

Jastrebova, J., Strandler, H. S., Patring, J., & Wiklund, T. (2011). Comparison of UPLC and HPLC for analysis of dietary folates. *Chromatographia*, 73, 219-225.

Jastrebova, J., Witthoft, C., Grahn, A., Svensson, U., & Jagerstad, M. (2003). HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chemistry*, 80, 579-588.

Jiang, Z., Fenton, M., & Sim, J. S. (1991). Comparison of four different methods for egg cholesterol determination. *Poultry Science*, 70, 1015-1019.

Jimenez, V., Rubies, A., Centrich, F., Companyo, R., & Guiteras, J. (2011). Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1443-1451.

Jones, P. J. H. (2009). Dietary cholesterol and the risk of cardiovascular disease in patients: A review of the harvard egg study and other data. *International Journal of Clinical Practice*, 63, 1-8.

Jung, S., Han, B. H., Nam, K., Ahn, D. U., Lee, J. N., & Jo, C. (2011). Effect of dietary supplementation of gallic acid and linoleic acid mixture or their synthetic salt on egg quality. *Food Chemistry*, 129, 822-829.

Kallio, H., Yli-Jokipii, K., Kurvinen, J. P., Sjoval, O., & Tahvonon, R. (2001). Regioisomerism of triacylglycerols in lard, tallow, yolk, chicken skin, palm oil, palm olein, palm stearin, and a transesterified blend of palm stearin and coconut oil analyzed by tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3363-3369.

Kaluzny, M. A., Duncan, L. A., Merritt, M. V., & Epps, D. E. (1985). Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, 26, 135-140.

Kan, C. A., & Petz, M. (2000). Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6397-6403.

Kang, K. R., Cherian, G., & Sim, J. S. (1998). Tocopherols, retinol and carotenes in chicken egg and tissues as influenced by dietary palm oil. *Journal of Food Science*, 63, 592-596.

Kanner, J., & Rosenthal, I. (1992). An assessment of lipid oxidation in foods (technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 64, 1959-1964.

Karadas, F., Grammenidis, E., Surai, P. F., Acamovic, T., & Sparks, C. (2006). Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*, 47, 561-566.

Karadas, F., Surai, P. F., Sparks, N. H. C., & Grammenidis, E. (2005). Effects of maternal dietary supplementation with three sources of carotenoids on the retinyl esters of egg yolk and developing quail liver. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 140, 430-35.

Karppi, J., Nurmi, T., Olmedilla-Alonso, B., Granado-Lorencio, F., & Nyyssonen, K. (2008). Simultaneous measurement of retinol, alpha-tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 867, 226-232

Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., & Widmer, M. (2008). Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1194, 66-79.

Kay, P., Blackwell, P. A., & Boxall, A. B. A. (2005). Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere*, 59, 951-959.

KEGG. (2015). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kyoto. Recuperat el 12 de juliol de 2015, a www.genome.jp/kegg/

Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8, 1-13.

Kennedy, D. G., Blanchflower, W. J., Hughes, P. J., & McCaughey, W. J. (1996). The incidence and cause of lasalocid residues in eggs in northern Ireland. *Food Additives and Contaminants*, 13, 787-794.

Keukens, H. J., Kan, C. A., Van Rhijn, J. A., & Tomassen, M. J. H. (2000). Doxycycline residues in eggs of laying hens and in muscle and liver of broilers after administration of feeds containing low levels of doxycycline. *Proceedings of the EuroResidue IV Conference, Veldhoven, The Netherlands*.

Kim, K. R., Owens, G., Kwon, S. I., So, K. H., Lee, D. B., & Ok, Y. S. (2011). Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water Air and Soil Pollution*, 214, 163-174.

Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D. B., & Godoy, H. T. (1990). Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. *Food Chemistry*, 35, 187-195.

Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., et al. (2009). Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7977-8015.

Kivini, H., Jarvenpaa, E. P., Aro, H., Huopalahti, R., & Ryhanen, E. (2004). Qualitative and quantitative liquid chromatography analysis methods for the determination of the effects of feed supplements on hen yolk phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4289-4295.

Kjeldgaard, J., Cohn, M. T., Casey, P. G., Hill, C., & Ingmer, H. (2012). Residual antibiotics disrupt meat fermentation and increase risk of infection. *mBio*, 3, e00190-12, doi:10.1128/mBio.00190-12.

Kolz, A. C., Moorman, T. B., Ong, S. K., Scoggin, K. D., & Douglass, E. A. (2005). Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons. *Water Environment Research*, 77, 49-56.

Kornbrust, D., & Mavis, R. (1980). Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: Correlation with vitamin E content. *Lipids*, 15, 315-322.

Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y., & Rosen, C. J. (2005 a). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality*, 34, 2082-2085.

Kumar, K., Gupta, S. C., Chander, Y., & Singh, A. K. (2005 b). Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in agronomy*, 87, 1-54.

La Nasa, J., Ghelardi, E., Degano, I., Modugno, F., & Colombini, M. P. (2013). Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer. *Journal of Chromatography A*, 1308, 114-124.

Le, T., He, H. Q., Niu, X. D., Chen, Y., & Xu, J. (2013). Development of an immunochromatographic assay for detection of tylosin and tilmicosin in muscle, liver, fish and eggs. *Food and Agricultural Immunology*, 24, 467-480.

Le, T., Zhao, Z., Wei, W., & Bi, D. (2012). Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based-enzyme-linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg. *Food Chemistry*, 134, 2442-2446.

Leeson, S., & Caston, L. (2004). Enrichment of eggs with lutein. *Poultry Science*, 83, 1709-1712.

Lei, L., Li, J., Hu, J. N., Liu, R., Fan, Y. W., Tang, L., et al. (2012). Separation of phospholipids from hen egg yolk by short packed silica gel column chromatography. *Journal of Food Science*, 77, C948-C953.

Leichter, J., Landymore, A. F., & Krumdieck, C. L. (1979). Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effect on the determination of free folate content. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32, 92-95.

Letteron, P., Sutton, A., Mansouri, A., Fromenty, B., & Pessayre, D. (2003). Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology*, 38, 133-140.

Lewicki, J. (2006). Tylosin. A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. Recuperat el 12 de juliol de 2015, a ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/tylosin_2006.pdf

Li-Chan, E. C. Y., & Kim, H. (2008). Structure and chemical composition of eggs. (Ed. Y. Mine), *Egg bioscience and biotechnology* (p.1-95). New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., Publication.

Li-Chan, E. C. Y., Powrie, W. D., & Nakai, S. (1995). The chemistry of Eggs and Egg Products. (Ed. W. J. Stadelman, & O. J. Cotterill), *Egg Science and Technology* (4rt ed., p. 105-176). New York: The Haworth Press, Inc.

Lin, Y. T., Wu, S. S., & Wu, H. L. (2007). Highly sensitive analysis of cholesterol and sitosterol in foods and human biosamples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1156, 280-287.

Lu, H. T., Jiang, Y., Li, H. B., Chen, F., & Wong, M. H. (2004). Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence detection. *Chromatographia*, 60, 259-264.

Lucock, M. (2000). Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71, 121-138.

Mach, N., Devant, M., Diaz, I., Font-Furnols, M., Oliver, M. A., Garcia, J. A., et al. (2006). Increasing the amount of n-3 fatty acid in meat from young holstein bulls through nutrition. *Journal of Animal Science*, 84, 3039-3048.

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

Mann, K., & Mann, M. (2008). The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics*, 8, 178-191.

Mann, K., & Mann, M. (2011). In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos. *Proteome Science*, 9, n°7.

Mann, K., Olsen, J. V., Macek, B., Gnad, F., & Mann, M. (2008). Identification of new chicken egg proteins by mass spectrometry-based proteomic analysis. *World's Poultry Science Journal*, 64, 209-218.

Maraschiello, C., Diaz, I., & Regueiro, J. A. G. (1996). Determination of cholesterol in fat and muscle of pig by HPLC and capillary gas chromatography with solvent venting injection. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography*, 19, 165-168.

Martin, J. I., Landen, W. O., Soliman, A. G. M., & Eitenmiller, R. R. (1990). Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73, 805-808.

Mazalli, M. R., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., & Bragagnolo, N. (2006). HPLC method for quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. *Lipids*, 41, 615-622.

McDermott, P. F., Zhao, S., Wagner, D. D., Simjee, S., Walker, R. D., & White, D. G. (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology*, 13, 71-84.

McFarland, J. W., Berger, C. M., Froshauer, S. A., Hayashi, S. F., Hecker, S. J., Jaynes, B. H., et al. (1997). Quantitative structure-activity relationships among macrolide antibacterial agents: in vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 1340-1346.

McGrath, T. F., Elliott, C. T., & Fodey, T. L. (2012). Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 403, 75-92.

McGuire, J. M., Boniece, W. S., Higgins, C. E., Hoehn, M. M., Stark, W. M., Westhead, J., et al. (1961). Tylosin, a new antibiotic, I. Microbiological studies. *Antibiotics & Chemotherapy*, 11, 320-327.

Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1146-1155.

Mielnik, M. B., Aaby, K., & Skrede, G. (2003). Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat Science*, 65, 1147-1155.

Miguel, M., Manso, M. A., Lopez-Fandiño, R., & Ramos, M. (2005). Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. *European Food Research and Technology*, 221, 542-546.

Milinsk, M. C., Murakami, A. E., Gomes, S. T. M., Matsushita, M., & De Souza, N. E. (2003). Fatty acid profile of egg yolk lipids from hens fed diets rich in n-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 83, 287-292.

Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 225-232.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2014 a). El sector de la avicultura de puesta en cifras. Principales indicadores económicos en 2013. Recuperat el 9 de juliol 2015, a http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosaviculturadepuesta2014_tcm7-379528.pdf

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2014 b). Informe del Plan Nacional de Investigación de Residuos, 2014. Recuperat el 12 de juliol de 2015, a <http://www.magrama.gob.es/app/pnir/Publico/Resultados/Resultados.asp>

Mohiti-Asli, M., Shariatmadari, F., Lotfollahian, H., & Mazuji, M. T. (2008). Effects of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. *Canadian Journal of Animal Science*, 88, 475-483.

Mooney, M. H., Le Bizec, B., & Elliott, C. T. (2009). Combining biomarker screening and mass-spectrometric analysis to detect hormone abuse in cattle. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 665-675.

Mori, A. V., Mendonça, C. X., Almeida, C. R. M., & Pita, M. C. G. (2003). Supplementing hen diets with vitamins A and E affects egg yolk retinol and alpha-tocopherol levels. *Journal of Applied Poultry Research*, 12, 106-114.

Motoyama, M., Nakagawa, S., Tanoue, R., Sato, Y., Nomiya, K., & Shinohara, R. (2011). Residues of pharmaceutical products in recycled organic manure produced from sewage sludge and solid waste from livestock and relationship to their fermentation level. *Chemosphere*, 84, 432-438.

Mukherje, D., Ghosh, H. N., & Mukherje. S. (1971). Effect of tetracycline on synthesis of fatty acid and cholesterol in liver of control and experimental rats. *Journal of Antibiotics*, 24, 263-265.

Myers, A. G., Charest, M. G., Lerner, C. D., Brubaker, J. D., & Siegel, D. R. (2010). *U.S. Patent No. 7807842 B2*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademrk Office.

Nagaoka, T., Tokonami, S., Shiigi, H., Matsumoto, H., Takagi, Y., & Takahashi, Y. (2012). Development of an electrochemical cholesterol sensor system for food analysis. *Analytical Sciences*, 28, 187-191.

Naviglio, D., Gallo, M., LeGrottaglie, L., Scala, C., Ferrara, L., & Santini, A. (2012). Determination of cholesterol in Italian chicken eggs. *Food Chemistry*, 132, 701-708.

Ndaw, S., Bergaentzle, M., Aoude-Werner, D., Lahely, S., & Hasselmann, C. (2001). Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. *Journal of Chromatography A*, 928, 77-90.

Nierenberg, D.W., & Nann, S.L. (1992). A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56, 417-426.

Nilsson, C., Johansson, M., Yazynina, E., Stralsjo, L., & Jastrebova, J. (2004). Solid-phase extraction for HPLC analysis of dietary folates. *European Food Research and Technology*, 219, 199-204.

Nimalaratne, C., Lopes-Lutz, D., Schieber, A., & Wu, J. (2012). Effect of domestic cooking methods on egg yolk xanthophylls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12547-12552.

Nogueira, G. C., & Bragagnolo, N. (2002). Assessment of methodology for the enzymatic assay of cholesterol in egg noodles. *Food Chemistry*, 79, 267-270.

Nunnery, J., Angulo, F. J., & Tollefson, L. (2006). Public health and policy. *Preventive Veterinary Medicine*, 73, 191-195.

Oka, H., Ito, Y., & Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882, 109-133.

Ortega, R. M. (2002). El huevo en la alimentación. Importancia nutricional y sanitaria. *Instituto de Estudios del Huevo*.

Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P., & Edder, P. (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 2363-2374.

Otles, S., & Hisil, Y. (1991). Analysis of vitamin-A in eggs by High-Pressure Liquid-Chromatography. *Nahrung-Food*, 35, 391-394.

Pacetti, D., Hulan, H. W., Schreiner, M., Boselli, E., & Frega, N. G. (2005). Positional analysis of egg triacylglycerols and phospholipids from hens fed diets enriched with refined seal blubber oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1703-1714.

Paesen, J., Claeys, P., Cypers, W., Roets, E., & Hoogmartens, J. (1995 a). Liquid chromatography of tylosin A and related substances on poly(styrene-divinylbenzene). *Journal of Chromatography A*, 699, 93-97.

Paesen, J., Cypers, W., Pauwels, K., Roets, E., & Hoogmartens, J. (1995 b). Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 1153-1159.

Paglia, G., Ifa, D. R., Wu, C., Corso, G., & Cooks, R. G. (2010). Desorption Electro spray Ionization Mass Spectrometry analysis of lipids after two-dimensional High-Performance Thin-Layer Chromatography partial separation. *Analytical Chemistry*, 82, 1744-1750.

Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., & De Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9589-9594.

Pasin, G., Smith, G. M., & O'Mahony, M. (1998). Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent. *Food Chemistry*, 61, 255-259.

Passantino, A., & Russo, C. (2008). Maximum residue levels of veterinary medicines in relation to food safety: European community legislation and ethical aspects. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 3, 351-358.

Patring, J. D. M., & Jastrebova, J. A. (2007). Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity. *Jornal of Chromatography A*, 1143, 72-82.

Patring, J. D. M., Jastrebova, J. A., Hjortmo, S. B., Andlid, T. A., & Jagerstad, I. M. (2005 a). Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2406-2411.

Patring, J. D. M., Johansson, M. S., Yazynina, E., & Jastrebova, J. A. (2005 b). Evaluation of impact of different antioxidants on stability of dietary folates during food sample preparation and storage of extracts prior to analysis. *Analytica Chimica Acta*, 553, 36-42.

Peng, D., Ye, S., Wang, Y., Chen, D., Tao, Y., Huang, L., et al. (2012). Development and validation of an indirect competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the screening of tylosin and tilmicosin in muscle, liver, milk, honey and eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 44-51.

Perry, M. M., & Gilbert, A. B. (1985). The structure of yellow yolk in the domestic-fowl. *Journal of Ultrastructure Research*, 90, 313-322.

Peters, R. J. B., Bolck, Y. J. C., Rutgers, P., Stolker, A. A. M., & Nielen, M. W. F. (2009). Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8206-8216.

Piatkowska, M., Jedziniak, P., & Zmudzki, J. (2014). Comparison of different sample preparation procedures for multiclass determination of selected veterinary drug, coccidiostat and insecticide residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 6, 3034-3044.

Piironen, V., Toivo, J., & Lampi, A. M. (2002). New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 705-713.

Pikkemaat, M. G. (2009). Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 395, 893-905.

Pikkemaat, M. G., Mulder, P. P. J., Elferink, J. W. A., De Cocq, A., Nielen, M. W. F., & Van Egmond, H. J. (2007). Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. *Food Additives and Contaminants*, 24, 842-850.

Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Guinazi, M., Oliveira, D. D., Della Lucia, C. M., Reis, B. D., & Brandao, S. C. C. (2011). Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1218, 8496-8502.

Pinkart, H. C., Devereux, R., & Chapman, P. J. (1998). Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *Journal of Microbiological Methods*, 34, 9-15.

Poehlsgaard, J., & Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 870-881.

Poo-Prieto, R., Haytowitz, D. B., Holden, J. M., Rogers, G., Choumenkovitch, S. F., Jacques, P. F., & Selhub, J. (2006). Use of the Affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products. *The Journal of Nutrition*, 136, 3079-3083.

Poulsen, S. M., Kofoed, C., & Vester, B. (2000). Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *Journal of Molecular Biology*, 304, 471-481.

Prieto, J. A., Ebri, A., & Collar, C. (1992). Optimized separation of nonpolar and polar lipid classes from wheat-flour by solid-phase extraction. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69, 387-391.

Pulgarin, J. A. M., Molina, A. A., Ferreras, F. M., & Lopez, P. F. (2013). Rapid and simple determination of sarafloxacin in egg by Time-Resolved Chemiluminescence. *Food Analytical Methods*, 6, 1153-1161.

Raes, K., Huyghebaert, G., De Smet, S., Nollet, L., Arnouts, S., & Demeyer, D. (2002). The deposition of conjugated linoleic acid in eggs of laying hens fed diets varying in fat level and fatty acid profile. *The Journal of Nutrition*, 132, 182-189.

Raikos, V., Hansen, R., Campbell, L., & Euston, S. R. (2006). Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry*, 99, 702-710.

Ramasamy, K., Abdullah, N., Jalaludin, S., Wong, M., & Ho, Y. W. (2009). Effects of *Lactobacillus* cultures on performance of laying hens, and total cholesterol, lipid and fatty acid composition of egg yolk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 482-486.

Reglament (CEE) núm. 2377/90 del Consell, del 26 de junio de 1990, on s'estableix un procediment comunitari de fixació dels límits màxims de residus de medicaments veterinaris en els aliments d'origen animal. *Official Journal of the European Union 1990*, L224, 1-140.

Reglament (CE) núm. 1831/2003 del Parlament Europeu i del Consell, del 22 de setembre de 2003, sobre els additius en alimentació animal. *Official Journal of the European Union 2003*, L268, 29-43.

Reglament (CE) núm. 726/2004 del Parlament Europeu i del Consell, del 31 de març del 2004, on s'estableixen procediments comunitaris per l'autorització i el control dels medicaments d'ús humà i veterinari i pel que es crea l'Agència Europea de Medicaments. *Official Journal of the European Union 2004*, L 136, 1-33.

Reglament (CE) núm. 1234/2007 del Consell, del 22 d'octubre de 2007, on es crea una organització comú de mercats agrícoles i s'estableixen unes disposicions específiques per a determinats productes agrícoles (Reglament únic per a les OCM). *Official Journal of the European Union 2007*, L299, 1-242.

Reglament (CE) núm. 589/2008 de la Comissió, del 23 juny del 2008, on s'estableixen unes disposicions d'aplicació del Reglament (UE) No. 1234/2007 del Consell respecte a les normes de comercialització dels ous. *Official Journal of the European Union* 2008, L 163, 6-23.

Reglament (CE) núm. 124/2009 de la Comissió, del 10 de febrer de 2009, on s'estableixen els continguts màxims de coccidiostàtics i histomonòstats presents en els aliments com a resultat de la transferència inevitable d'aquestes substàncies en els pinsos als quals estan destinats. *Official Journal of the European Union* 2009, L40, 7-11.

Reglament (UE) núm. 37/2010 de la Comissió, del 22 de desembre de 2009, referent a les substàncies farmacològicament actives i la seva classificació pel que es refereix als límits màxims de residus en els productes alimentaris d'origen animal. *Official Journal of the European Union* 2010, L 15, 1-72.

Ren, Y., Perez, T. I., Zuidhof, M. J., Renema, R. A., & Wu, J. (2013). Oxidative stability of omega-3 polyunsaturated fatty acids enriched eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11595-11602.

Richter, M. K., Focks, A., Siegfried, B., Rentsch, D., Krauss, M., Schwarzenbach, R. P., et al. (2013). Identification and dynamic modeling of biomarkers for bacterial uptake and effect of sulfonamide antimicrobials. *Environmental Pollution*, 172, 208-215.

Robert, C., Gillard, N., Brasseur, P. Y., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., et al. (2013). Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 30, 443-457.

Robinson, K. (2000). Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease. *Heart*, 83, 127-130.

Roland, S., Ferone, R., Harvey, R. J., Styles, V. L., & Morrison, R. W. (1979). The characteristics and significance of sulfonamides as substrates for Escherichia coli Dihydropteroate Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 10337-10345.

Sanches-Silva, A., Albuquerque, T. G., Finglas, P., Ribeiro, T., Valente, A., Vasilopoulou, E., et al. (2013). Carotenoids, vitamins (A, B₂, C and E) and total folate of traditional foods from Black Sea Area countries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3545-3557.

Sanli, S., Sanli, N., & Alsancak, G. (2009). Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and LC methods in water and acetonitrile-water binary mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 939-946.

Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65, 725-759.

Sauveur, B. (1993 a). Generalidades sobre la formación del huevo. (Ed. B. Sauveur), *El huevo para consumo: bases productivas* (p. 83-114). Barcelona: AEDOS

Sauveur, B. (1993 b). Estructura y composición del huevo. (Ed. B. Sauveur), *El huevo para consumo: bases productivas* (p. 263-278). Barcelona: AEDOS

Sauveur, B. (1993 c). Valor nutritivo del huevo y factores que les afectan. (Ed. B. Sauveur), *El huevo para consumo: bases productivas* (p. 279-302). Barcelona: AEDOS

Seyoum, E., & Selhub, J. (1998). Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *The Journal of Nutrition*, 128, 1956-1960.

Shinn, S., Liyanage, R., Lay, J., & Proctor, A. (2014). Improved fatty acid analysis of conjugated linoleic acid rich egg yolk triacylglycerols and phospholipid species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6608-6615.

Sigma-Aldrich (2015). Recuperat el 12 de juliol de 2015, a <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>

Simcic, M., Stibilj, V., & Holcman, A. (2011). Fatty acid composition of eggs produced by the Slovenian autochthonous Styrian hen. *Food Chemistry*, 125, 873-877.

Sowell, A.L., Huff, D.L., Yeager, P.R., Caudill, S.P., & Gunter, E.W. (1994). Retinol, alpha-tocopherol, lutein/zeaxanthin, beta-cryptoxanthin, lycopene, alpha-carotene, trans-beta-carotene, and four retinyl esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. *Clinical Chemistry*, 40, 411-416.

Spisso, B. F., Ferreira, R. G., Pereira, M. U., Monteiro, M. A., Cruz, T. A., da Costa, R. P., et al. (2010). Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. *Analytica Chimica Acta*, 682, 82-92.

Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, 100, 1-9.

Sun, C., Wang, Q., Brubaker, J. D., Wright, P. M., Lerner, C. D., Noson, K., et al. (2008). A robust platform for the synthesis of new tetracycline antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 17913-17927.

Surai, P. F., Ionov, I. A., Kuklenko, T. V., Kostjuk, I. A., MacPherson, A., Speake, B. K., et al. (1998). Effect of supplementing the hen's diet with vitamin A on the accumulation of vitamins A and E, ascorbic acid and carotenoids in the egg yolk and in the embryonic liver. *British Poultry Science*, 39, 257-263.

Swann, M. M. (1969). Use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. *UK Joint Committee Report*. London: H.M. Stationery Office.

Sweeney, J. P., & WeBirauch, J. L. (1976). Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8, 131-159.

Szatmari, I., Laczay, P., & Borbely, Z. (2011). Degradation of doxycycline in aged pig manure. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59, 1-10.

Szymczyk, B., & Pisulewski, P. M. (2003). Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition and cholesterol content of hen egg yolks. *British Journal of Nutrition*, 90, 93-99.

Teeter, J. S., & Meyerhoff, R. D. (2003). Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research*, 93, 45-51.

Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 166, 145-167.

Toldra, F., & Reig, M. (2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 482-489.

Tonks, D. B. (2006). The estimation of cholesterol in serum: A classification and critical review of methods (reprinted from *Clinical Biochemistry* (1967), 1, 12 - 29). *Clinical Biochemistry*, 39, 446-463.

Tortuero, F. (2002). El huevo en la nutrición y la salud. (Ed. A. Sastre; R. M. Sastre; F. Tortuero; G. Suárez; G. Vergara; C. López), *Lecciones sobre el huevo* (p. 145-154). Madrid: Instituto de Estudios del Huevo.

TOXNET database. (2014). Tylosin CASRN: 1401-69-0. Toxicology Data Network database. U. S. Department of Health & Human Services. Recuperat el 12 de juliol de 2015, a <http://toxnet.nlm.nih.gov>

USDA Nutrient Database for Standard Reference, release 23. (2010). Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture. Recuperat el 12 de julio de 2015, a <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>

Vahteristo, L. T., Ollilainen, V., Koivistoinen, P. E., & Varo, P. (1996). Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 477-482.

Vahteristo, L. T., Ollilainen, V., & Varo, P. (1997). Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg, and dairy products consumed in Finland. *Journal of AOAC International*, 80, 373-378.

Van Elswyk, M. E., Schake, L. S., & Hargis, P. S. (1991). Research note: Evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol. *Poultry Science*, 70, 1258-1260.

Van Ruth, S., Alewijn, M., Rogers, K., Newton-Smith, E., Tena, N., Bollen, M., et al. (2011). Authentication of organic and conventional eggs by carotenoid profiling. *Food Chemistry*, 126, 1299-1305.

Vandenberge, V., Delezie, E., Delahaut, P., Pierret, G., De Backer, P., Daeseleire, E., et al. (2012 a). Transfer of flubendazole and tylosin at cross contamination levels in the feed to egg matrices and distribution between egg yolk and egg white. *Poultry Science*, 91, 1248-1255.

Vandenberge, V., Delezie, E., Huyghebaert, G., Delahaut, P., De Backer, P., Daeseleire, E., et al. (2012 b). Residues of sulfadiazine and doxycycline in egg matrices due to cross-contamination in the feed of laying hens and the possible correlation with physicochemical, pharmacokinetic and physiological parameters. *Food Additives and Contaminants Part A - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 29, 908-917.

Vishnumohan, S., Arcot, J., & Pickford, R. (2011). Naturally-occurring folates in foods: Method development and analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Chemistry*, 125, 736-742.

Wang, J., & Leung D. (2012). The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 4, 103-111.

Wang, J., Liang, Y., Omana, D. A., Kav, N. N. V., & Wu, J. (2012). Proteomics analysis of egg white proteins from different egg varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 272-282.

Wang, T. T. Y., Reisenauer, A. M. & Halsted, C. H. (1985). Comparison of folate conjugase activities in human, pig, rat and monkey intestine. *Journal of Nutrition*, 115, 814-819.

Watkins, B. A. (1995). The Nutritive Value of the Egg. (Ed. W. J. Stadelman, & O. J. Cotterill), *Egg Science and Technology (4th ed., p. 177-194)*. New York: The Haworth Press, Inc.

Wenzel, M., Seuss-Baum, I., & Schlich, E. (2011). Influences of storage time and temperature on the xanthophyll content of freeze-dried egg yolk. *Food Chemistry*, 124, 1343-1348.

Weston, P. G. (1914). Estimates of cholesterol in serum by gravimetric and colorimetric methods. *The Journal of Medical Research*, 29, 457-464.

Yamamoto, T., Kikkawa, R., Yamada, H., & Horii, I. (2006). Investigation of proteomic biomarkers in *in vivo* hepatotoxicity study of rat liver: Toxicity differentiation in hepatotoxicants. *The Journal of Toxicological Sciences*, 31, 49-60.

Yang, G., Dong, A., Zeng, Z., Huang, X., & Chen, Z. (2006). Study of danofloxacin depletion in eggs of laying hens after oral administration. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28, 128-131.

Yin, H. Q., Kim, M., Kim, J. H., Kong, G., Lee, M. O., Kang, K. S., et al. (2006). Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicological Sciences*, 94, 206-216.

Yon, M., & Hyun, T. H. (2003). Folate content of foods commonly consumed in Korea measured after trienzyme extraction. *Nutrition Research*, 23, 735-746.

Yoshimura, H., Osawa, N., Rasa, F. S. C., Hermawati, D., Werdiningsih, S., Isriyanthi, N. M. R., et al. (1991). Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking-water to laying hens. *Food Additives and Contaminants*, 8, 65-69.

Yue, Y., Li, Y., Liang, Y., Dong, L., Dong, Q., & Zhong, H. (2010). Effects of co-existed proteins on measurement of pesticide residues in blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878, 3089-3094.

Zeisel, S. H., & Da Costa, K. A. (2009). Choline: An essential nutrient for public health. *Nutrition Reviews*, 67, 615-623.

Zeisel, S. H., Mar, M. H., Zhou, Z. W., & Da Costa, K. A. (1995). Pregnancy and lactation are associated with diminished concentrations of choline and its metabolites in rat-liver. *Journal of Nutrition*, 125, 3049-3054.

Zhou, Y., Xue, Y., Chen, G. C., Zhang, A. J., Chen, Z. F., Liao, X., et al. (2013). Rapid separation and characterisation of triacylglycerols in ostrich oil by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry* 141, 2098-2102.

Zweers-Zeilmaker, W.M., Van Miert, A.S.J.P.A.M., Horbach, G.J., & Witkamp, R.F. (1999). In vitro complex formation and inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by different macrolides and tiamulin in goats and cattle. *Research in Veterinary Science*, 66, 51-55.