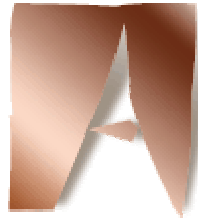


**NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS
Y α -TOCOFEROL EN EL PIENSO DE BROILERS:
EQUILIBRIO ENTRE COMPOSICIÓN LIPÍDICA Y
ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA CARNE**

Lucía Cortinas Hernández

2004



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

Ana Cristina Barroeta Lajusticia, Profesora Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **"Niveles de ácidos grasos poliinsaturados y α -tocoferol en el pienso de broilers: Equilibrio entre composición lipídica y estabilidad oxidativa de la carne"** presentada por Lucía Cortinas Hernández para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección y, considerándola acabada, autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Bellaterra a 22 de Marzo de 2004.

Dra. Ana C. Barroeta Lajusticia

AGRADECIMIENTOS

Mientras los ríos corran hacia el mar,
hagan sombra las montañas a los valles y,
haya estrellas en el cielo,
tiene que durar la memoria del beneficio recibido
en la mente del hombre agradecido.

(Publio Virgilio Marón)

La realización de la presente memoria de Tesis ha sido posible gracias a la colaboración que el grupo de Nutrició Animal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona ha mantenido con el Departament de Nutrició i Bromatologia-CeRTA de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona y el Department of Animal Nutrition and Physiology del Research Centre Foulum en Tjele, Dinamarca. La presente Tesis ha sido realizada gracias a una beca de formación de personal de investigación del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

*A mi padre por creer en mí,
a mi madre por su comprensión,
y a Jose A. por su infinita paciencia.*

RESUMEN

La presente memoria de Tesis doctoral tiene como objetivo principal valorar la interacción entre el grado de poliinsaturación y el nivel de α -tocoferol dietéticos sobre el valor nutritivo (ácidos grasos y α -tocoferol) y la estabilidad oxidativa de la carne de pollo. Así mismo, también se pretende estudiar la responsabilidad de la síntesis endógena sobre el depósito de ácidos grasos en la carne de pollo. Para la consecución de estos objetivos, se diseñaron dos experimentos.

Ambos experimentos se basaron en niveles crecientes de acetato de α -tocoferol (0, 100, 200 y 400 mg/kg) y de ácidos grasos poliinsaturados dietéticos. En el primer estudio el gradiente de poliinsaturación dietético se consiguió reemplazando una grasa saturada (sebo) por una mezcla de aceites poliinsaturados (linaza y pescado) suplementados a un nivel constante de 9%. En el segundo estudio este gradiente se consiguió mediante la adición de niveles crecientes de la fuente de grasa poliinsaturada (2, 4, 6 y 8%).

Para la realización de cada estudio experimental se utilizaron 192 broilers hembras. Al final de la pruebas (44 días en la primera, 40 días en la segunda) la mitad de estos animales fueron sacrificados en un matadero comercial. Una vez sacrificados se procedió a la recogida de muestras de diferentes tejidos (muslo con piel y pechuga) para cuantificar el contenido de ácidos grasos y α -tocoferol, así como la susceptibilidad a la oxidación (medida en términos de TBA). Algunas de las muestras de muslo se sometieron a un proceso térmico y/o de conservación en refrigeración para estudiar la persistencia del enriquecimiento en ácidos grasos poliinsaturados y α -tocoferol, y su implicación en la oxidación.

Depósito de ácidos grasos en la carne de pollo

A medida que aumentó el grado de poliinsaturación dietético en base de variaciones en el tipo de grasa (primer estudio), el depósito de ácidos grasos totales en el muslo (músculo con tejido subcutáneo) disminuyó, mientras que esto no se observó en los tejidos con mayor contenido de grasa intramuscular como la pechuga. Por contra, al aumentar el grado de poliinsaturación a través de incrementos del nivel de grasa añadida (segundo estudio), el depósito de ácidos grasos totales en el muslo no se modificó, mientras que en la pechuga se incrementó.

En relación a la composición de ácidos grasos poliinsaturados, el ave es incapaz de sintetizarlos y por lo tanto, su procedencia es exclusiva de la dieta. En este sentido, a medida que aumentó el grado de poliinsaturación dietético, el contenido y proporción de los mismos en muslo y pechuga aumentó exponencialmente. Además, el consumo de una

dieta con elevados niveles de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (primer estudio) dio lugar a que la proporción de ácidos grasos poliinsaturados se deposite a un ritmo fraccional 3 veces superior que al consumir de raciones con un mínimo contenido de estos ácidos grasos (segundo estudio).

Por otro lado, la concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en los tejidos de las aves dependió de la aportación de la dieta y de la síntesis endógena. Así, al aumentar el nivel de grasa añadida al pienso, de 0 a 10%, el depósito de ácidos grasos saturados procedentes de la síntesis endógena disminuyó de 37,8 a 17,8% en el muslo y de 39,2 a 23,3% en la pechuga. De forma similar el depósito de ácidos grasos monoinsaturados procedentes de la síntesis endógena disminuyó de 48,5 a 8,0% en el muslo y de 42,6 a 9,8% en la pechuga.

Las muestras de pechuga en la presente memoria de tesis contenían principalmente grasa intramuscular, la cual se encuentra formando parte de las membranas celulares, mientras que las muestras de muslos contenían una parte importante de tejido subcutáneo, con una mayor función de depósito graso. Esta diferencia nos permitió observar que el depósito de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en la pechuga tiene menor capacidad de modificación a través de la dieta que el del muslo.

Por otro lado, la suplementación con acetato de α -tocoferol a dosis inferiores o iguales a 400 mg/kg, no afectó al contenido de ácidos grasos del muslo y de la pechuga.

Al someter la carne de pollo a 80°C durante 30 minutos hubo pérdidas de ácidos grasos que afectaron de igual forma a los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Además, en aquella carne con una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados (segundo estudio), se observaron mayores pérdidas de ácidos grasos insaturados. Por otro lado, el efecto de la suplementación con acetato de α -tocoferol se puso de evidencia al cocinar la carne de pollo con una elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados (segundo estudio).

Depósito de α -tocoferol en la carne de pollo

La concentración tisular de α -tocoferol en el muslo fue 1,8-2,3 veces superior a la pechuga. En ambos tejidos dicha concentración fue directamente proporcional al consumo del mismo, e inversamente proporcional al consumo de ácidos grasos poliinsaturados. La reducción del depósito de α -tocoferol en los tejidos de las aves por un aumento del grado de poliinsaturación fue más elevada en aquellos tejidos de los pollos alimentados con elevadas dosis de acetato de α -tocoferol.

Además, a consumos de ácidos grasos poliinsaturados similares, el depósito de α -tocoferol en ambos tejidos de pollos que consumieron diferentes niveles de grasa añadida (segundo estudio) presentaron niveles de α -tocoferol superiores a los obtenidos en animales cuya dieta difería en el tipo de grasa añadida (primer estudio).

La cantidad de α -tocoferol necesaria para conseguir un nivel de enriquecimiento en la carne de pollo de 40 mg/kg varía en función del grado de poliinsaturación dietético, por cada unidad de aumento de ácidos grasos poliinsaturados en la ración se necesita incrementar 3-4 mg α -tocoferol para contenidos dietéticos de ácidos grasos poliinsaturados bajos (15-20 g/kg) y 12-23 mg α -tocoferol para contenidos altos (superior a 55-60 g de ácidos grasos poliinsaturados/kg).

Oxidación lipídica en la carne de pollo

En general, los procesos de cocción y posterior conservación en refrigeración del muslo de pollo favorecieron los procesos de oxidación de la fracción lipídica. En este sentido los valores de TBA en la carne cocida y cocida-refrigerada durante 2 meses fueron 12 y 24 veces superiores, respectivamente, que en la carne de pollo cruda. Además, la valoración de TBA en la carne de pollo cocida con un elevado estado oxidativo no fue un buen método para valorar la oxidación lipídica en la carne refrigerada durante un periodo prolongado.

La susceptibilidad a la oxidación de la carne de pollo aumenta proporcionalmente a su contenido en ácidos grasos poliinsaturados y se reduce a medida que aumenta su concentración en α -tocoferol. Además, el efecto antioxidante del α -tocoferol presentó una saturación, dado que llegó un punto que por más que aumentó la concentración de α -tocoferol en la carne, no se consiguió evitar la aparición de la oxidación lipídica. En este sentido, la estabilidad oxidativa de la carne de pollo no se vio afectada por un aumento en el nivel de α -tocoferol dietético de 200 a 400 mg/kg.

ÍNDICE

Lista de figuras	xvii
Lista de tablas	xix
Abreviaciones	xxiii
Introducción	25
1. Revisión bibliográfica	29
1.1. Modificación de la composición lipídica de la carne de pollo	31
1.1.1. Composición lipídica de la carne de pollo	32
1.1.2. Modificación del depósito lipídico	33
1.1.2.1. Modificación del perfil lipídico a través de la dieta	35
1.1.2.1.1. Enriquecimiento en AGPI	37
1.1.2.1.2. Alteraciones asociadas al grado de poliinsaturación	40
1.1.2.2. Modificación de la cantidad de grasa depositada a través de la dieta	42
1.2. Oxidación lipídica	47
1.2.1. Mecanismos de oxidación	47
1.2.1.1. Oxidación primaria clásica	48
1.2.1.2. Fotooxidación	50
1.2.1.3. Oxidación secundaria	50
1.2.2. Evaluación de la oxidación lipídica de la carne	51
1.2.3. Factores que influyen en la oxidación de la carne	54
1.2.3.1. Perfil lipídico de la carne	56
1.2.3.2. Presencia de antioxidantes	57
1.2.3.3. Conservación y procesado de la carne	62
1.3. Vitamina E	67
1.3.1. Estructura química y actividad	67
1.3.2. Acción antioxidante de la vitamina E	69
1.3.3. Absorción y metabolismo de la vitamina E	71
1.3.4. Modificación del contenido de α -tocoferol de los tejidos	74
1.3.4.1. Suplementación dietética con α -tocoferol	75
1.3.4.1.1. Nivel de inclusión	75
1.3.4.1.2. Tiempo de administración	76
1.3.4.2. Composición lipídica de la dieta	78
1.3.4.3. Procesado de la carne de pollo	79
2. Objetivos y planteamiento experimental	81
3. Material y métodos	85

3.1. Animales e instalaciones	87
3.2. Dietas	87
3.2.1. Estudio experimental 1.....	87
3.2.2. Estudio experimental 2.....	89
3.3. Controles de producción	92
3.4. Control de rendimientos.....	92
3.5. Recogida de muestras	93
3.5.1. Muestras crudas	93
3.5.2. Muslos cocidos	93
3.5.3. Conservación de las muestras	94
3.6. Determinaciones analíticas	94
3.6.1. Determinaciones analíticas de los aceites	95
3.6.2. Contenido de Ácidos Grasos	95
3.6.3. Contenido de α -tocoferol.....	97
3.6.4. Perfil de estereoisómeros del α -tocoferol.....	99
3.6.5. Test del Ácido Tiobarbitúrico (TBA)	100
3.7. Análisis estadístico	100
3.7.1. Análisis de la varianza.....	100
3.7.2. U de Mann-Whitney	101
3.7.3. Regresiones lineales.....	101
3.7.4. Regresiones no lineales con dos variables	102
3.7.5. Regresiones no lineales con tres variables.....	102
4. Influence of dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Fatty acid content	105
4.1. Summary.....	107
4.2. Results and Discussion.....	109
4.2.1. Diet composition.....	109
4.2.2. Productive parameters	110
4.2.3. Effect of dietary α -tocopheryl acetate	110
4.2.4. Effect of dietary polyunsaturation	111
4.2.5. Effect of cooking.....	116
5. Influence of dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: α -tocopherol content	119
5.1. Summary.....	121
5.2. Results and Discussion.....	123
5.2.1. Diet composition.....	123
5.2.2. Recovery of α -tocopherol determination.....	123
5.2.3. α -Tocopherol content of thigh and breast meat.....	124
6. Distribution of α -tocopherol stereoisomers in liver and thigh of chickens.....	129

6.1. Summary.....	131
6.2. Results and Discussion.....	133
6.2.1. Diet composition.....	133
6.2.2. Stereoisomers in liver and thigh.....	134
7. Influence of dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid oxidation.....	139
7.1. Summary.....	141
7.2. Results and Discussion.....	143
7.2.1. Diet composition.....	143
7.2.2. Lipid oxidation in thigh meat.....	143
8. Fatty acid content in chicken meat as affected by dietary polyunsaturated oils and vitamin E levels.....	151
8.1. Summary.....	153
8.2. Results.....	155
8.2.1. Diet composition.....	155
8.2.2. Effect of oil level.....	156
8.2.3. Effect of dietary α -tocopheryl acetate.....	158
8.2.4. Effect of cooking process.....	158
8.3. Discussion.....	160
8.3.1. Effect of oil level.....	160
8.3.2. Effect of dietary α -tocopheryl acetate.....	162
8.3.3. Effect of cooking process.....	162
9. α -Tocopherol content and lipid oxidation in chicken meat as affected by dietary polyunsaturated oils and vitamin E levels.....	165
9.1. Summary.....	167
9.2. Results and Discussion.....	169
9.2.1. Diet composition.....	169
9.2.2. α -Tocopherol content of thigh and breast meat.....	169
9.2.3. Lipid oxidation in cooked thigh meat.....	173
10. Discusión Global.....	177
10.1. Depósito de ácidos grasos en la carne de pollo.....	179
10.1.1. Efecto del tipo y nivel de grasa añadida.....	179
10.1.1.1. Depósito total de ácidos grasos.....	179
10.1.1.2. Composición de ácidos grasos.....	181
10.1.2. Efecto del nivel de suplementación con acetato de α -tocoferol.....	185
10.2. Depósito de α -tocoferol en la carne de pollo.....	187
10.3. Oxidación lipídica en la carne de pollo.....	190
11. Conclusiones.....	193
12. Bibliografía.....	197

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1. Variación del porcentaje de ácidos grasos del muslo de pollo en función de las variaciones en la dieta.....	35
Figura 1.1.2. Variación del porcentaje de LNA, EPA, DPA y DHA del muslo de pollo en función del tipo de grasa suplementada en un 8% aprox. al pienso.....	38
Figura 1.2.1. Reacciones que se producen en la autooxidación.....	48
Figura 1.2.2. Esquema de la reacción de oxidación primaria clásica de un ácido graso con 3 dobles enlaces.....	49
Figura 1.2.3. Estructura de Malondialdehído.....	52
Figura 1.2.4. Esquema de la formación de radicales libres y de los sistemas intrínsecos de las células para evitar el inicio de la oxidación lipídica.....	58
Figura 1.2.5. Influencia del periodo de administración de piensos suplementados con diferentes dosis de vitamina E sobre el grado de oxidación en diferentes tejidos.....	61
Figura 1.2.6. Influencia del periodo de administración de piensos suplementados con diferentes dosis de vitamina E sobre el grado de oxidación en el muslo cocido de pollo.....	62
Figura 1.3.1. Estructura del α -tocoferol.....	68
Figura 1.3.2. Absorción y transporte de la vitamina E.....	73
Figura 1.3.3. Depósito de α -tocoferol en el hígado y muslo de pollos en función de la suplementación dietética con acetato de α -tocoferol.....	76
Figura 1.3.4. Influencia del periodo de administración de piensos suplementados con diferentes dosis de acetato de α -tocoferol sobre el depósito de α -tocoferol en el muslo de pollo, estudiada por diferentes autores.....	78
Figura 3.1. Curva de la temperatura de cocción de las muestras de muslo en función del tiempo.....	93
Figura 3.2. Diseño y recogida de muestras y determinaciones analíticas realizadas.....	94
Figura 5.1. Estimated response surface for α -tocopherol content in thigh and breast meat to variation in dietary content of α -tocopherol and polyunsaturated fatty acids.....	128
Figure 7.1. Influence of processing on TBA values in thigh meat from dietary treatments with 61 g PUFA/kg of feed and non-supplemented with α -tocopherol acetate.....	145
Figure 7.2. Relationship between α -tocopherol content in raw thigh meat and TBA values in cooked thigh meat from chickens fed diets containing 61 g polyunsaturated fatty acids per kg of feed.....	147
Figure 7.3. Estimated response surface for TBA values in cooked thigh to variation in dietary content of α -tocopherol and polyunsaturated fatty acids.....	148
Figure 9.1. Estimated response surface for α -tocopherol content in thigh and breast meat to variation in dietary content of α -tocopherol and oil level.....	172
Figure 9.2. Estimated response surface for TBA values in cooked thigh meat to variation in dietary content of α -tocopherol and oil level.....	176
Figura 10.1. Contenido de grasa abdominal y de ácidos grasos totales en muslo y pechuga en función del grado de poliinsaturación de la dieta, en base a variaciones del tipo o nivel de grasa añadida.....	180
Figura 10.2. Concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el muslo y la pechuga del pollo en función del consumo de los mismos y la estrategia dietética para conseguir un gradiente de poliinsaturación.....	182

Figura 10.3. Porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGMI) al administrar una dieta con 0% de grasa añadida ó 10% pero sin presencia de AGS y AGMI, respectivamente	183
Figura 10.4. Concentración de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el muslo y la pechuga del pollo en función del consumo de ácidos grasos poliinsaturados y la estrategia dietética para conseguir un gradiente de poliinsaturación	184
Figura 10.5. Concentración de ácidos grasos poliinsaturados en el muslo y la pechuga del pollo en función del consumo de los mismos y la estrategia dietética para conseguir un gradiente de poliinsaturación	185
Figura 10.6. Superficie de respuesta estimada para el contenido de α -tocoferol de el muslo de pollos en función del consumo de α -tocoferol, y ácidos grasos poliinsaturados conseguidos variando el tipo y el nivel de grasa añadida	188
Figura 10.7. Superficie de respuesta estimada para el contenido de α -tocoferol de la pechuga de pollos en función del consumo de α -tocoferol, y ácidos grasos poliinsaturados conseguidos variando el tipo y el nivel de grasa añadida	188
Figura 10.8. Superficie de respuesta estimada para los valores de TBA del muslo cocido en función del consumo de ácidos grasos poliinsaturados y de α -tocoferol, en el primer y segundo estudio	191

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1.1. Composición del muslo y la pechuga de pollo sin piel.....	31
Tabla 1.1.2. Valor nutritivo de la carne de pollo, comparado con carnes de otras especies animales.....	32
Tabla 1.1.3. Contenido y clases de lípidos en pechuga, muslo y piel de pollo	33
Tabla 1.1.4. Composición en ácidos grasos de la pechuga, muslo y la piel de pollos alimentados con una dieta estándar	34
Tabla 1.1.5. Composición corporal en ácidos grasos de pollos alimentados con una dieta sin grasa añadida	35
Tabla 1.1.6. Modificación de la composición lipídica del muslo de pollo al modificarse el tipo de grasa suplementado al pienso en un 8,2%.....	37
Tabla 1.1.7. Valores de energía metabolizable para broilers y proporción de AGPI de diferentes fuentes grasas	42
Tabla 1.1.8. Depósito de grasa corporal y abdominal en pollos en función del nivel o tipo de grasa añadida al pienso	43
Tabla 1.2.1. Radicales libres implicados en las reacciones de oxidación	49
Tabla 1.2.2. Compuestos volátiles y valores umbral de detección de la grasa de ternera.....	51
Tabla 1.2.3. Valores de oxidación lipídica obtenidos por diferentes métodos analíticos para 4 muestras de muslo cocido de pollos alimentados con 4 fuentes diferentes de grasa	53
Tabla 1.2.4. Trabajos que han estudiado el efecto de la inclusión de fuentes grasas poliinsaturadas en la dieta sobre la estabilidad oxidativa de los tejidos de pollo.....	55
Tabla 1.2.5. Trabajos que han estudiado el efecto de la suplementación dietética con vitamina E sobre la estabilidad oxidativa del muslo de pollo.....	60
Tabla 1.2.6. Trabajos que han estudiado el efecto del tratamiento sobre la estabilidad oxidativa de la carne de pollo	63
Tabla 1.2.7. Trabajos que han estudiado el efecto de la conservación en refrigeración sobre la estabilidad oxidativa de la carne de pollo cruda y cocida	65
Tabla 1.3.1. Actividad de los estereoisómeros del α -tocoferol.....	69
Tabla 1.3.2. Niveles de α -tocoferol en muslo conseguidos con diferentes niveles de suplementación dietética con acetato de α -tocoferol y con inclusión de diferentes tipos de aceites y grasas	77
Tabla 3.1. Composición y análisis químico de las dietas del primer estudio	88
Tabla 3.2. Niveles de inclusión de las diferentes fuentes de grasa añadida y grado de insaturación de las dietas de la primera prueba experimental.....	88
Tabla 3.3. Tratamientos experimentales del primer estudio	89
Tabla 3.4. Composición y análisis químico de las dietas del segundo estudio	90

Tabla 3.5. Composición química de la cáscara de almendra	90
Tabla 3.6. Niveles de inclusión de las diferentes fuentes de grasa añadida y grado de insaturación de las dietas de la segunda prueba experimental	91
Tabla 3.7. Tratamientos experimentales del segundo estudio	92
Tabla 3.8. Determinaciones analíticas de las grasas y aceites utilizados en las pruebas experimentales.....	95
Tabla 3.9. Composición en ácidos grasos y α -tocoferol de los aceites utilizados.....	96
Table 4.1. Fatty acid composition of the experimental diets	109
Table 4.2. Effect of dietary polyunsaturation and α -tocopheryl acetate supplementation on the fatty acid content of thighs with skin.....	112
Table 4.3. Effect of dietary polyunsaturation and α -tocopheryl acetate supplementation on the fatty acid content of breasts without skin	113
Table 4.4. Multiple regression equations: y =fatty acid content of thigh with skin; x =polyunsaturated fatty acid content of feeds	115
Table 4.5. Multiple regression equations: y =fatty acid content of breast without skin; x =polyunsaturated fatty acid content of feeds	116
Table 4.6. Effect of cooking process, dietary polyunsaturation level and α -tocopheryl acetate supplementation on the fatty acid content of thigh with skin	117
Table 5.1. α -Tocopherol content of experimental diets.....	123
Table 5.2. Recovery of the method for α -tocopherol determination in chicken meat from broilers fed diets with different degree of polyunsaturation	124
Table 5.3. Effect of dietary polyunsaturation and α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol content in thigh and breast meat.....	125
Table 5.4. Regression equations: y = α -tocopherol content in thigh and breast; x_1 = α -tocopherol content of feed; x_2 =polyunsaturated fatty acid content of feed	126
Table 6.1. α -Tocopherol content of the experimental diets	133
Table 6.2. α -Tocopherol stereoisomer profile of the experimental diets.....	133
Table 6.3. α -Tocopherol content and fatty acid content of liver and thigh.....	134
Table 6.4. Effect of supplementation with <i>all-rac</i> - α -tocopheryl acetate and dietary polyunsaturation on α -tocopherol stereoisomer profile in liver.....	135
Table 6.5. Effect of supplementation with <i>all-rac</i> - α -tocopheryl acetate and dietary polyunsaturation on α -tocopherol stereoisomer profile in thigh	136
Table 7.1. Effect of dietary polyunsaturation, α -tocopheryl acetate supplementation and processing on TBA values in thigh meat	144
Table 7.2. Equations: y =TBA values of cooked thigh meat; x_1 =PUFA content of raw thigh meat; x_2 = α -tocopherol content of raw thigh meat	146
Table 8.1. Fatty acid composition of the experimental diets	155
Table 8.2. Effect of the level of added oil and α -tocopheryl acetate supplementation on	

the fatty acid content of thighs meat with skin.....	157
Table 8.3. Effect of level of added oil and α -tocopheryl acetate supplementation on the fatty acid content of breasts meat without skin.....	159
Table 8.4. Regression equations: y = Fatty acid content in skinless breast meat or thigh meat with skin; x = level of added oil.....	160
Table 8.5. Effect of processing, α -tocopheryl acetate supplementation and dietary added oil level on the fatty acid content of raw and cooked thigh meat with skin	163
Table 9.1. α -Tocopherol content of experimental diets.....	169
Table 9.2. Effect of dietary polyunsaturation and α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol content in thigh and breast meat.....	170
Table 9.3. Regression equations: y = α -Tocopherol content in thigh and breast and x = α -tocopherol content of feed	171
Table 9.4. Regression equations: y = α -Tocopherol content in thigh and breast meat; x_1 =dietary added oil level.....	172
Table 9.5. Effect of dietary fat level and α -tocopheryl acetate supplementation on TBA values in cooked thighs.....	173
Table 9.6. Multiple regression equations: y =TBA values; x_1 =PUFA content of raw thighs; x_2 = α -tocopherol content of raw thigh.....	174
Tabla 10.1. Digestibilidad del α -tocoferol en función del gradiente de poliinsaturación conseguido variando el tipo (primer estudio) y el nivel (segundo estudio) de grasa añadida al pienso.....	189
Tabla 10.2. Efecto del grado de poliinsaturación en función del tipo y nivel de grasa añadida y de la suplementación con acetato de α -tocoferol sobre el valor de TBA en el muslo de pollo cocido.....	190
Tabla 10.3. Consumo de α -tocoferol necesario en función del consumo de AGPI, conseguido variando el tipo (primer estudio) y nivel (segundo estudio) de grasa añadida, para garantizar valores de TBA en la carne cocida de pollo inferiores a 800 μ g MDA/kg.....	192

ABREVIACIONES

AG	Ácidos grasos
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AGT	Ácidos grasos totales
α -TA	Acetato de α -tocoferol
α -Toc	α -Tocoferol
α -TTP	Proteína transferidora de α -tocoferol
BHA	Butilato hidroxil anisol
BHT	Butilato hidroxil tolueno
C	Carne de pollo cocida
CLA	Ácido linoleico conjugado
CNR	Compuestos no radicalarios
CR	Carne de pollo cocida y refrigerada
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
EDTA	Ácido etilenediaminetetracético
EM	Energía metabolizable
EPA	Ácido eicosapentaenoico
E0	Sin suplementación con acetato de α -tocoferol
E1	Suplementación con 100 mg/kg de α -TA
E2	Suplementación con 200 mg/kg de α -TA
E4	Suplementación con 400 mg/kg de α -TA
ES	Suplementación con α -tocoferol sintético (α -TA)
FA	Ácidos grasos
GSH	Glutathion reducido
LA	Ácido linoleico
LH	Molécula lipídica
LNA	Ácido linolénico
LOOH	Hidroperóxido
LPL	Lipoprotein lipasa
L•	Radical lipídico
LOO•	Radical lipídico peróxido
MDA	Malondialdehído
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
ND	No detectado
NS	No significativo
O2	Inclusión de 2% de aceite añadido en la ración
O4	Inclusión de 4% de aceite añadido en la ración
O6	Inclusión de 6% de aceite añadido en la ración
O8	Inclusión de 8% de aceite añadido en la ración

PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PU15	Nivel de poliinsaturacion dietético de 15 g AGPI/kg
PU34	Nivel de poliinsaturacion dietético de 34 g AGPI/kg
PU45	Nivel de poliinsaturacion dietético de 45 g AGPI/kg
PU61	Nivel de poliinsaturacion dietético de 61 g AGPI/kg
R	Carne de pollo cruda
RR	Carne de pollo cruda refrigerada
R•	Radical libre
SE	Error estándar
SFA	Ácidos grasos saturados
ST	Estereoisómeros
TBA	Test del ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TocOH	α -Tocoferol
Toc•	Radical tocoferil
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singuleto

Introducción

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés de los consumidores por conocer la relación que existe entre los alimentos y la salud. Hoy en día, la gente reconoce que llevar un estilo de vida sano, incluida la dieta, puede contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias, y a mantener el estado de salud y bienestar. En este sentido los objetivos en el ámbito de la nutrición han cambiado. Inicialmente la función de la dieta era básicamente aportar los nutrientes en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas. No obstante, existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos, es decir, algunos de sus componentes, influyen de manera clara en el estado de salud, e incluso pueden mejorar el bienestar y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades.

Es por ello que diversos organismos oficiales han establecido recomendaciones de consumo para la población. Estos organismos han hecho especial énfasis en las recomendaciones referentes a la fracción lipídica de los alimentos. Dentro de los diferentes constituyentes de la fracción lipídica destacan los ácidos grasos poliinsaturados y la vitamina E. En muchas ocasiones estos dos componentes han sido amplia y conjuntamente estudiados, dado el efecto antioxidante que posee la vitamina E para evitar la elevada susceptibilidad a la oxidación lipídica que presentan los ácidos grasos poliinsaturados.

Desde del área de la Producción Animal se hacen esfuerzos para modificar los productos de origen animal de acuerdo a las necesidades de los consumidores. La carne constituye una parte importante de la dieta, representando el 11% del total de consumo de alimentos. Concretamente, la carne de pollo es uno de los productos de origen animal de mayor consumo y aceptación. Tanto es así, que mientras que en los últimos 30 años la producción mundial de la carne en total se ha doblado, la de la carne de ave se ha cuadruplicado. Por todo ello, en las últimas décadas una parte importante de la investigación en el ámbito de la Nutrición Animal se ha dirigido a mejorar el valor nutritivo de los alimentos de origen animal, para ofrecer al consumidor un producto de acuerdo a su demanda y necesidades, con valor añadido y una mayor vida útil. En concreto, la carne de los animales monogástricos, especialmente la de las aves, tiene una composición lipídica que es rica en ácidos grasos poliinsaturados y, además, es fácilmente modificable a través de diversas estrategias nutricionales.

En la presente memoria de Tesis Doctoral profundizaremos en distintos procedimientos nutricionales para modificar el perfil lipídico de la carne de pollo, buscando un equilibrio entre su grado de poliinsaturación y su estabilidad a la oxidación. Paralelamente, este trabajo nos permitirá avanzar en el conocimiento de aspectos

relacionados con el metabolismo lipídico en las aves.

Capítulo 1

Revisión Bibliográfica

La ciencia será siempre una
búsqueda, nunca un
descubrimiento real. Es un
viaje, nunca un destino.

Karl Popper

1.1. MODIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA CARNE DE POLLO

En los últimos años el consumidor está cada vez más concienciado sobre la importancia que tiene la alimentación en su salud. Esto se ha reflejado en un cambio en los hábitos alimentarios, sobre todo en lo referente a la cantidad y composición de la grasa de la dieta. Así, las recomendaciones dietéticas van dirigidas a reducir el consumo de grasas saturadas y paralelamente aumentar el de grasas poliinsaturadas, ya que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) han demostrado tener un efecto positivo en la prevención de la aparición y desarrollo de patologías cardiovasculares y carcinogénicas (Kinsella et al., 1990; Knapp et al., 1991). Algunos organismos como la American Heart Association de EEUU recomiendan dietas en las que los AGPI y ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) aporten más de un 30% de las calorías totales de la dieta, mientras que los ácidos grasos saturados (AGS) aporten un máximo de un 10% (Krauss et al., 2001).

El consumidor considera la carne de pollo un alimento saludable debido, entre otras razones, a que contiene poca cantidad de grasa. La **Tabla 1.1.1** muestra la composición nutricional del muslo y pechuga de pollo, siendo éstas las partes comestibles de mayor valor comercial.

Tabla 1.1.1. Composición del muslo y la pechuga de pollo sin piel (USDA, 1998).

Nutriente	Muslo de pollo	Pechuga de pollo
	Composición por 100 g de porción comestible	
Agua (g)	75,81	74,76
Energía (kcal)	119	110
Proteína (g)	19,65	23,09
Lípidos (g)	3,91	1,24
Ácidos grasos saturados (g)	1,00	0,33
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	1,21	0,30
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	0,97	0,28
Colesterol (mg)	83	58
Cenizas (g)	0,96	1,02
Calcio (mg)	10	11
Hierro (mg)	1,04	0,72
Magnesio (mg)	24	28
Fósforo (mg)	268	196
Potasio (mg)	231	255
Sodio (mg)	86	65
Zinc (mg)	1,91	0,80
Vitamina C o ácido ascórbico (mg)	3,1	1,2
Tiamina (mg)	0,08	0,07
Riboflavina (mg)	0,19	0,09
Niacina (mg)	6,33	11,19
Ácido pantoténico (mg)	1,23	0,82
Vitamina B6 (mg)	0,33	0,55
Vitamina B12 (µg)	0,35	0,38
Vitamina A (µg)	20	6
Vitamina E (mg)	0,32	0,13

La carne de pollo, al igual que otras carnes, es un alimento nutritivo que contiene gran cantidad de proteína de alto valor biológico, vitaminas y minerales. Sus proteínas son fácilmente asimilables por nuestro organismo y nos aportan todos los aminoácidos esenciales. También destaca por su contenido en vitaminas del grupo B, especialmente la B₁₂ y B₆, además de tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y niacina. La carne y los derivados cárnicos constituyen un excelente aporte de hierro, mucho más fácilmente asimilable que el proporcionado por otros alimentos, además de fósforo y de otros minerales como el zinc, magnesio y calcio.

Si comparamos la carne de pollo con carnes de otras especies animales, se observa como la carne de pollo destaca por su menor aporte energético y su bajo contenido en lípidos (**Tabla 1.1.2**). Al expresar el valor nutritivo en términos de densidad nutricional (g o mg de nutriente por 1000 kcal de alimento), se observa como la composición grasa de la carne de pollo en comparación con otros alimentos proteicos es rica en AGPI y con una baja proporción de AGS.

Tabla 1.1.2. Valor nutritivo de la carne de pollo (expresado en valor absoluto: por 100 g de porción comestible y en densidad nutricional: por 1000 kcal de alimento), comparado con carnes de otras especies animales (SENBA, 2003).

	Carne de pollo		Carne de cerdo		Carne de ternera	
	Cantidad	Densidad	Cantidad	Densidad	Cantidad	Densidad
Energía (kcal)	109		142		133	
Proteína (g)	20,6	189,0	21,5	151,4	21	157,9
Lípidos (g)	2,4	22,0	6,3	44,4	4,8	36,1
AGPI (g)	0,8	7,3	0,7	4,9	0,4	3,0
AGS (g)	0,7	6,4	2,2	15,5	2,2	16,5
AGMI (g)	0,6	5,5	2,8	19,7	2	15,0

Debido a que los lípidos de la carne de pollo son el principal objeto de estudio de esta memoria, a continuación describiremos brevemente las principales características de la composición en ácidos grasos (AG) de la carne de pollo, centrándonos sobre todo en su modificación a través de la dieta. En un capítulo posterior trataremos otro componente lipídico, la vitamina E, el cual tiene una gran importancia tanto desde el punto de vista del valor nutritivo como de la vida útil de la carne de pollo.

1.1.1. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA CARNE DE POLLO

El contenido de lípidos de la carne de pollo varía según el tejido. Así, la **Tabla 1.1.3**

muestra el contenido total y la composición de los lípidos del muslo, pechuga y piel. Se puede observar como la piel contiene la mayor proporción de grasa compuesta principalmente por triglicéridos. El contenido de lípidos de la pechuga es aproximadamente la mitad que el muslo. Además, estos lípidos en la pechuga están constituidos en más de un 50% por fosfolípidos, mientras que en el muslo están compuestos mayoritariamente por triglicéridos.

Tabla 1.1.3. Contenido y clases de lípidos en pechuga, muslo y piel de pollo (Pikul et al., 1984; Ang, 1988; Ratnayake et al., 1989).

	Lípidos totales (g/100g tejido crudo)	Clases de Lípidos (g/100 g lípidos totales)				
		Triacilglicerol	Fosfolípidos	Ácidos grasos libres	Colesterol	Diacilglicerol
Pechuga	0,9-1,5	32-43	55-66	Tr.	2-5	Tr.
Muslo	2,2-2,3	63-83	16-33	Tr.	1-5	Tr.
Piel	30,3-31,5	100	0,36	Tr.	-	Tr.

La **Tabla 1.1.4** muestra la composición en AG de la fracción lipídica de la pechuga, muslo y piel de pollos alimentados con una dieta estándar (Ratnayake et al., 1989). En todos estos tejidos, los AG mayoritarios son el oleico, seguido por el palmítico y el linoleico (LA). La pechuga presenta menos AGMI que el muslo y más AGPI, sobre todo AGPI de cadena muy larga (≥ 20 carbonos), siendo el ácido araquidónico (C 20:4 ω 6) el más abundante. En comparación con los tejidos musculares, la piel contiene niveles más elevados de oleico y palmitoleico.

La composición y el contenido lipídicos de la carne de pollo pueden presentar variaciones debidas a la genética, edad, sexo, condiciones ambientales y factores nutricionales, entre otros. Dentro de los factores nutricionales destacan el contenido energético y la composición lipídica y proteica de la dieta. De todos ellos, la cantidad y tipo de grasa utilizada en la dieta tienen una gran influencia y son el objetivo principal de este estudio.

1.1.2. MODIFICACIÓN DEL DEPÓSITO LIPÍDICO

El depósito lipídico en los tejidos animales puede tener 2 orígenes: exógeno, es decir, procedente de la dieta y endógeno, sintetizado *de novo* por el animal. El tipo de depósito lipídico dependerá del balance entre la porción lipídica de origen endógeno y exógeno. Así, al administrar a las aves dietas bajas en grasa, la mayoría de los AG de los tejidos proceden de la síntesis *de novo* a partir de los hidratos de carbono. En la **Tabla 1.1.5** se muestran los principales AG depositados en el animal tras alimentarlo durante 20 días

con una dieta sin grasa. Se puede observar como los AG mayoritarios, resultantes de la síntesis endógena, son los AGS, principalmente palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), y los AGMI, principalmente el oleico (C18:1 ω 9) y palmitoleico (C16:1 ω 7) (Bartov, 1979; Ajayah et al., 1991; Crespo y Esteve-García, 2002b).

Tabla 1.1.4. Composición en ácidos grasos de la pechuga, el muslo y la piel de pollos alimentados con una dieta estándar (Ratnayake et al., 1989).

Ácidos grasos	Pechuga	Muslo	Piel
Saturados	33,5	32,2	30,7
C 16:0 (Palmítico)	23,8	22,6	24,0
C 18:0 (Esteárico)	7,5	7,6	5,1
Monoinsaturados	34,5	39,4	47,8
C 16:1 ω 7 (Palmitoleico)	4,5	6,3	7,8
C 18:1 ω 9 (Oleico)	29,1	32,0	39,4
C 20:1 ω 9 (Gondoico)	0,5	0,5	0,6
C 22:1 ω 9 (Erúcico)	0,4	0,6	0,4
Poliinsaturados	32,0	28,5	21,4
ω 6	27,4	25,1	19,7
ω 3	4,5	3,4	1,8
C 18:2 ω 6 (Linoleico)	17,8	18,3	18,2
C 18:3 ω 3 (Linolénico)	0,5	0,7	1,0
C 20:4 ω 6 (Araquidónico)	5,0	3,7	0,6
C 20:5 ω 3 (Eicosapentaenoico)	0,7	0,6	0,4
C 22:5 ω 3 (Docosapentaenoico)	0,9	0,5	0,1
C 22:6 ω 3 (Docosahexaenoico)	1,8	1,0	0,1

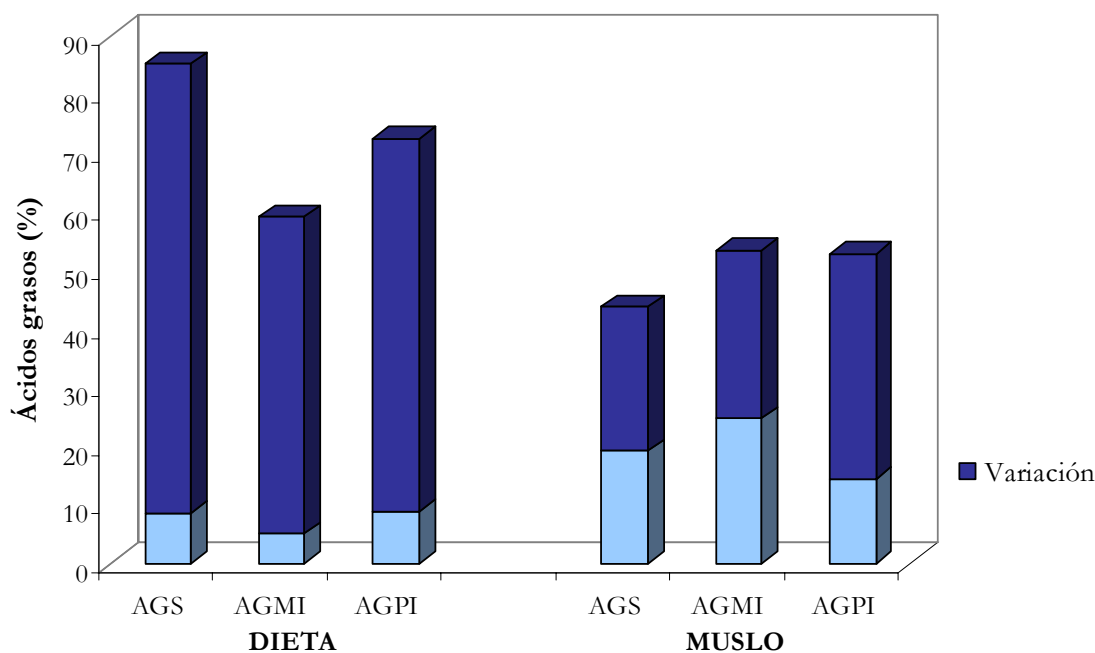
La inclusión de grasa en la dieta produce una reducción de la actividad lipogénica hepática. Así, se establece un balance entre la contribución exógena y la síntesis endógena de lípidos, permaneciendo el contenido total de lípidos del animal más o menos constante (Saadoun y Leclercq, 1987). La reducción en la lipogénesis endógena es el resultado, por un lado, de un menor contenido de almidón en la dieta como consecuencia de la inclusión de materia grasa, el cual produce una carencia de sustrato para la síntesis de AG; y por otro lado, de una inhibición directa de los enzimas lipogénicos por parte de los lípidos dietéticos (Mourot y Hermier, 2001). De manera que, la lipogénesis hepática aumenta cuando la energía de la dieta es aportada por la inclusión de carbohidratos y la síntesis se reduce al adicionar fuentes lipídicas (Tanaka et al., 1983a,b).

Tabla 1.1.5. Composición corporal en ácidos grasos (expresado en g por 100 g de grasa) de pollos alimentados con una dieta sin grasa añadida (Crespo y Esteve-García, 2002b).

Ácidos grasos saturados		Ácidos grasos monoinsaturados		Ácidos grasos poliinsaturados			
C 14:0	0,8	C 16:1 ω7	7,5	C 18:2 ω6	18,6	C 20:4 ω6	0,9
C 15:0	0,1	C 18:1 ω9	35,1	C 18:3 ω6	0,4	C 20:5 ω3	0,1
C 16:0	24,3	C 18:1 ω9t	0,0	C 18:3 ω3	1,3	C 22:4 ω6	0,5
C 18:0	6,5	C 18:1 ω7	2,5	C 20:2 ω6	0,2	C 22:5 ω3	0,4
C 20:0	0,1	C 20:1 ω9	0,4	C 20:3 ω3	0,0	C 22:6 ω3	0,1

Podemos afirmar, que la modificación del depósito lipídico se realiza a través de cambios en el nivel y tipo de grasa añadida. Por lo tanto a continuación nos centraremos en el efecto de la grasa añadida sobre el perfil y la cantidad de lípidos de los tejidos.

Figura 1.1.1. Variación del porcentaje de ácidos grasos del muslo de pollo en función de las variaciones en la dieta (basado en López-Ferrer et al., 1999a,b, 2001).



AGS: Ácidos grasos saturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

1.1.2.1. MODIFICACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO TRAVÉS DE LA DIETA

Ya en la década de los años 60 y 70 se comprobó que la composición en AG de los tejidos del pollo podía ser modificada mediante modificaciones de la dieta de los animales (Marion y Woodroof, 1963; Miller y Robisch, 1969; Atkinson et al., 1972). Tal y como se ha comentado anteriormente, alimentando a las aves con dietas suplementadas con grasa, los

depósitos de grasa del animal proceden en mayor grado de la dieta, y el perfil de AG de estos tejidos es el reflejo del perfil de AG de la dieta. Es por ello que al aumentar el nivel dietético de grasa añadida conseguimos aumentar la cantidad y proporción de los AG presentes en la fuente grasa, quedando diluidos los AG presentes en la dieta base (AG procedentes de los ingredientes de las fuentes no grasas). Así, algunos autores han conseguido aumentar la proporción de ciertos AG aumentando el nivel de inclusión de una fuente grasa determinada en la dieta (Hulan et al., 1989; Chanmugan et al., 1992; Brue y Latshaw, 1985; López-Ferrer et al., 2001). No obstante, no todos los AG son manipulados de igual forma. Tal y como se observa en la **Figura 1.1.1**, las variaciones en el perfil lipídico del muslo de pollo son inferiores a las variaciones en la dieta. La manipulación del contenido en AGS es más limitado que en los AG insaturados. Además, la fracción poliinsaturada varía de forma inversa a la monoinsaturada.

El hecho que la carne de pollo sea un producto de una elevada aceptabilidad por parte del consumidor, ha favorecido la experimentación con el objetivo de modificarlo y mejorarlo nutritivamente. Muchos trabajos han estudiado la utilización de diferentes fuentes ricas en AG concretos para incorporarlos en la dieta de los animales y obtener así, carne de pollo con un elevado contenido en dichos AG. Así, se ha visto que el contenido de AGS de la carne de pollo se puede aumentar proporcionándoles aceite de coco (Lin et al., 1989a; Asghar et al., 1990; Yau et al., 1991) o aceite de palma (Cherian et al., 1996); el contenido de ácido oleico con aceite de oliva (Lin et al., 1989a; Asghar et al., 1990; Yau et al., 1991; Lauridsen et al., 1997; O'Neill et al., 1998a; Crespo y Esteve-García, 2002a,b); el contenido de ácido linoleico con aceite de colza (Miller y Robisch, 1969; Scaife et al., 1994; Hrdinka et al., 1996; Zollitsch et al., 1997; López-Ferrer et al., 1999a), de girasol (Cherian et al., 1996; López-Ferrer et al., 1999a; Crespo y Esteve-García, 2002a,b,c), de maíz (Marion y Woodroof, 1963), de soja (Scaife et al., 1994; Hrdinka et al., 1996; Zollitsch et al., 1997; López-Ferrer et al., 1999a); el contenido de ácido linolénico con aceite de linaza (Lin et al., 1989a; Asghar et al., 1990; Chanmugan et al., 1992; Ajuyah et al., 1993a,b; Ahn et al., 1995; Cherian et al., 1996; Nam et al., 1997; López-Ferrer et al., 1999a,b; Crespo y Esteve-García, 2002a,b,c); y el contenido en ácidos eicosapentaenoico (EPA; C20:5 ω 3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 ω 3) con aceites de pescado (Miller y Robisch, 1969; Atkinson et al., 1972; Hulan et al., 1988, 1989; Chanmugan et al., 1992; Hargis y van Elswyk, 1993; Scaife et al., 1994; Cherian et al., 1996; López-Ferrer et al., 1999b, 2001; Surai and Sparks, 2000). La **Tabla 1.1.6** muestra un ejemplo de la modificación de la carne de pollo según el aceite añadido a la dieta.

Tabla 1.1.6. Modificación de la composición lipídica del muslo de pollo al modificar el tipo de grasa suplementada al pienso en un 8,2% (López-Ferrer et al., 1999a).

Ácido Graso (%)	Aceite de Soja	Aceite de Colza	Aceite de Girasol
AGS	25,67	26,58	24,67
C 14:0	1,20	1,29	1,06
C 15:0	0,29	0,16	0,22
C 16:0	20,18	20,62	18,25
C 17:0	0,12	0,07	0,11
C 18:0	3,38	3,97	4,28
C 20:0	0,05	0,00	0,00
AGMI	29,35	36,76	24,79
C 14:1 ω7	0,39	0,36	0,27
C 16:1 ω7	4,82	5,31	3,51
C 18:1 ω9	18,00	27,18	16,96
C 18:1 ω7	0,28	1,46	0,28
C 20:1 ω9	1,21	0,64	0,19
C 22:1 ω9	2,43	0,19	0,13
AGPI	45,35	36,66	50,51
C 18:2 ω6	25,96	26,47	42,03
C 18:3 ω3	15,23	7,13	4,19
C 20:2 ω6	0,13	0,13	0,18
C 20:3 ω3	0,12	0,02	0,04
C 20:4 ω6	0,97	1,81	2,80
C 20:5 ω3	0,34	0,23	0,08
C 22:4 ω6	0,05	0,06	0,25
C 22:5 ω3	0,33	0,19	0,13
C 22:6 ω3	0,33	0,15	0,17

AGS: Ácidos grasos saturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

1.1.2.1.1. ENRIQUECIMIENTO EN AGPI

Una vez establecida la posibilidad de modificar la composición en AG de la carne de pollo a través de cambios dietéticos, en las últimas décadas han aparecido múltiples estudios encaminados a incrementar el contenido de algunos AGPI en estos alimentos. De manera que el enriquecimiento de la carne de pollo en estos AG mejorase su valor nutritivo. En este sentido, numerosos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de enriquecer la carne de pollo, por un lado, en AGPI ω3 y, por otro lado, en el ácido linoleico conjugado (CLA).

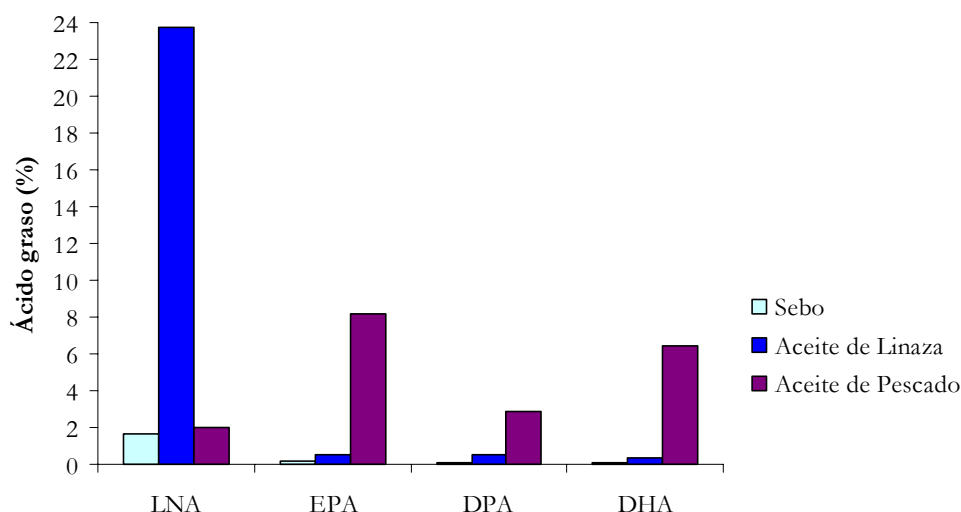
La inclusión de AGPI ω3 y, en concreto de EPA y DHA en la dieta se considera saludable para el organismo humano dado que se ha demostrado como su consumo

presenta efectos beneficiosos para la salud. Es por este motivo que numerosos autores han trabajado en la modificación del contenido en AGPI $\omega 3$ de la carne de pollo y para ello han utilizado diferentes fuentes de enriquecimiento:

- Fuentes vegetales: La linaza, tanto entera, molida, como en forma de aceite, es la principal fuente vegetal de AGPI $\omega 3$. El ácido linolénico (LNA) es el AG principal, existiendo tan sólo trazas de DHA, ácido docosapentaenoico (DPA) y EPA. Si bien a partir del LNA el pollo es capaz de sintetizar sus derivados de cadena muy larga (EPA, DPA y DHA), esta transformación es muy limitada, debido a la competencia por los enzimas de elongación y desaturación entre las familias $\omega 3$ y $\omega 6$. De manera, que para enriquecer con AGPI $\omega 3$ de cadena muy larga tenemos que recurrir a otras fuentes que incluyan estos AG directamente en la dieta (Olomu and Baracos, 1991; Chanmugan et al., 1992; Ajuyah et al., 1993a,b; Hargis y van Elswyk, 1993; Ahn et al., 1995; Nam et al., 1997; López-Ferrer et al., 1999a,b; Gonzalez-Esquerra y Leeson, 2000 entre otros).

- Fuentes marinas: El aceite de pescado es la fuente más utilizada para incorporar AGPI $\omega 3$ de cadena muy larga, como el EPA, DPA y DHA. En la **Figura 1.1.2** se observa como al incorporar aceite de pescado se obtiene una elevada proporción de AGPI $\omega 3$ de cadena muy larga, mientras que con la incorporación de una fuente vegetal, como el aceite de linaza, se consigue una mayor proporción de LNA (López-Ferrer et al., 1999b, 2001). Por otro lado, la proporción de los AGPI $\omega 3$ de cadena muy larga varía notablemente en función del origen de la fuente marina (Miller and Robisch, 1969; Hulan et al, 1988, 1989; Chanmugan et al., 1992; Hargis y van Elswyk, 1993; Scaife et al., 1994; López-Ferrer et al., 1999b, 2001; Gonzalez-Esquerra y Leeson, 2000 entre otros).

Figura 1.1.2. Variación del porcentaje de LNA, EPA, DPA y DHA del muslo de pollo en función del tipo de grasa suplementada en un 8% aprox. al pienso (Adaptado de López-Ferrer et al., 1999b, 2001).



Además del aceite de pescado, se han utilizado, aunque en menor medida, algas y zooplancton (Sirri et al., 2002,2003b). Estos organismos son los productores primarios de $\omega 3$, ya que son los únicos capaces de sintetizar AGPI $\omega 3$ de cadena muy larga como el EPA y el DHA.

El ácido linoleico conjugado (CLA) es una mezcla de isómeros del ácido octadecadienoico (C18:2), con dobles enlaces conjugados. El cis-9-trans-11 C18:2 es el más importante debido a su actividad biológica. En los últimos años el CLA ha recibido especial atención por parte de diferentes grupos de investigación, debido a sus efectos potencialmente beneficiosos para la salud humana, entre los que destacan la prevención de ciertos tipos de cáncer (Corl et al., 2003) y de la aterosclerosis (Rudel, 1999), potencia de la respuesta inmunitaria (Takahashi et al., 2002) y reducción del contenido de grasa corporal.

El CLA se origina, por un lado, en el rumen por biohidrogenación parcial de los AGPI, y por otro lado de forma endógena en el tejido adiposo de diferentes especies animales, a partir de su precursor el ácido vaccénico (trans-11 C18:1) (Corl et al., 2003). Los productos procedentes de rumiantes presentan la mayor fuente de CLA. Así, la carne vacuna presenta un 0,26% de CLA, mientras que la pechuga de pollo únicamente contiene 0,07% (Rule et al., 2002). El origen del CLA en la carne de pollo puede ser de la grasa animal usada en la fabricación del pienso de las aves o proceder de la síntesis endógena. No obstante, los mecanismos de síntesis endógena de CLA en pollos todavía no han sido descritos.

La suplementación dietética con CLA se ha utilizado eficazmente para enriquecer la carne de pollo en este grupo de AG, debido a la relación lineal existente entre la concentración de CLA en pienso y tejidos de las aves. Además, la inclusión de CLA en la dieta aumenta la proporción de AGS y reduce la de AGMI y AGPI (Du et al., 2001; Szymczyk et al., 2001; Du y Ahn, 2002; Badinga et al., 2003; Sirri et al., 2003a).

En relación al tipo de tejido, la modificación del perfil lipídico a través de la dieta es más evidente en los tejidos de depósito, como la grasa abdominal y subcutánea, que en el tejido muscular (Marion y Woodroof, 1963; Bartov et al., 1974; Scaife et al., 1994; Hrdinka et al., 1996; López-Ferrer et al., 1999a). Además, existe un depósito preferencial de AGPI en los tejidos musculares, principalmente en la pechuga (Marion y Woodroof, 1963; Scaife et al., 1994; Crespo y Esteve-García, 2001). Las diferencias en el comportamiento del depósito lipídico entre el tejido muscular y el tejido de depósito se han atribuido a la función que los AG realizan en cada tejido. Así, la función del tejido adiposo es

almacenamiento de grasa. En cambio, los AG incorporados a los fosfolípidos de las membranas celulares del tejido muscular mantienen las características físicas de estas membranas, permitiendo que se puedan llevar a cabo diferentes actividades metabólicas (Gurr, 1984). Así, es lógico que su modificación a través de la manipulación de la dieta sea más limitada (López-Bote et al., 1997).

1.1.2.1.2. ALTERACIONES ASOCIADAS AL GRADO DE POLIINSATURACIÓN

La utilización de fuentes ricas en AGPI lleva asociado una serie de problemas de los que destacan la aparición de canales oleosas y la presencia de olores y sabores desagradables, pero sobre todo y lo más importante es la destrucción de los AG a través del proceso de oxidación.

Al aumentar el grado de poliinsaturación de los depósitos lipídicos se produce una disminución de su punto de fusión, aspecto que implica la aparición de canales blandos u oleosas que son rechazadas desde el punto de vista comercial (Bartov et al., 1974; Hrdinka et al., 1996; Sanz et al., 1999b). Para evitar este problema es necesario controlar el tipo de grasa añadida al pienso, dado que tiene una influencia directa sobre la composición en AG, es decir, sobre el punto de fusión de los tejidos adiposos. Una estrategia para evitar estos problemas es la sustitución de estos aceites por grasas saturadas en los piensos de las últimas fases de producción. En concreto, para evitar canales oleosas limitando el engrasamiento excesivo de las aves, se recomienda sustituir los aceites poliinsaturados por grasas saturadas 8 días antes del sacrificio (Sanz et al., 2000c).

Sin duda, y como se ha indicado anteriormente, el principal problema asociado al incremento de AGPI de la carne de pollo es la oxidación lipídica. Ésta provoca alteraciones en las moléculas de AGPI y afecta negativamente a la calidad organoléptica y nutricional del alimento. Además, supone un serio riesgo para la salud del consumidor, dado que se ha relacionado el consumo de productos de la oxidación con la aparición de determinadas patologías cardiovasculares y carcinogénicas. Por todo ello, en el siguiente capítulo de la revisión se procederá a la descripción general de los mecanismos de oxidación de los alimentos, y de aquellos factores que pueden modificarla.

En relación a las alteraciones organolépticas, no existe unanimidad en los trabajos que han utilizado harinas o aceites de pescado en la dieta de los pollos con el objetivo de enriquecer la carne con AGPI ω 3. En algunos casos, han observado la aparición de olores y sabores desagradables en la carne de pollo (Miller y Robisch, 1969; Atkinson et al., 1972; Gonzalez-Esquerra y Leeson, 2000; López-Ferrer et al., 1999b). Otros autores sin embargo, utilizando ingredientes de procedencia similar, no encontraron efectos en la valoración

sensorial de la carne de pollo (Bou et al., 2004). Además, la presencia de olores y sabores desagradables se aprecia de forma más marcada en el muslo que en la pechuga (Gonzalez-Esquerria y Leeson, 2000; López-Ferrer et al., 1999b). Tal y como revisan Leskanich y Noble (1997) estos olores y sabores pueden proceder por un lado, del olor a pescado en sí mismo, ligado a la presencia de compuestos nitrogenados como amonio y aminas, concretamente trimetilamina, que se forman durante el deterioro del pescado. Por otro lado, estos problemas organolépticos pueden ser debidos a los productos resultantes de la oxidación de los AG que dan lugar a sustancias volátiles responsables del aroma desagradable. Por todo ello se recomienda limitar a 1,5% el nivel de aceite de pescado en la dieta (Fry et al., 1965).

Esta limitación ha llevado a realizar programas de sustitución del aceite de pescado por otras fuentes de grasa en los piensos utilizados durante el ciclo de producción. En concreto, la sustitución de un 8.2% de aceite de pescado por aceite de linaza o colza una o dos semanas previas al sacrificio mejora el análisis sensorial de la carne de pollo, a la vez que no supone importantes modificaciones en el perfil lipídico de la carne (López-Ferrer et al., 1999b).

También existen trabajos que han estudiado la utilización de algas marinas (Sirri et al., 2003b) y de mezclas con diferentes fuentes vegetales y marinas (Gonzalez-Esquerria y Leeson, 2000) con el objetivo de optimizar los efectos positivos de este enriquecimiento minimizando los problemas organolépticos asociados al mismo.

Por otra parte, el procesado térmico de la carne de pollo puede agravar de manera notable los problemas organolépticos, provocando la aparición de olores y sabores desagradables derivados de la propia oxidación (De Winne y Dirinck, 1996; Bou et al., 2001). El tratamiento a elevadas temperaturas de carne con un elevado grado de insaturación, favorece la formación de compuestos volátiles, responsables de la aparición de aromas desagradables.

El procesado térmico no sólo afecta las características organolépticas sino que puede afectar a la composición lipídica de la carne de pollo. De los trabajos existentes en la bibliografía es difícil sacar conclusiones, dado que muchas veces comparan el contenido de grasa o AG de la carne de pollo cruda y cocida expresada en materia fresca. Hay que tener en consideración que al cocinar la carne se pueden dar pérdidas de agua, concentrándose todos los constituyentes de la carne. Es por ello, que muchos trabajos observan como los tratamientos térmicos aumentan el contenido de grasa o AG de la carne de pollo (Myers y Harris, 1975; Dawson et al., 1990; Sheard et al., 1998). No obstante, la mayoría de los

trabajos parecen coincidir en que no se aprecian modificaciones significativas en el perfil de AG al cocinar la carne de pollo (Myers y Harris, 1975; Dawson et al., 1990; Grau et al., 2001a,b).

1.1.2.2. MODIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE GRASA DEPOSITADA A TRAVÉS DE LA DIETA

El depósito de grasa de los animales se produce cuando la energía consumida excede de la requerida para mantenimiento y crecimiento. Además, éste puede verse alterado por diferentes factores. A grandes rasgos podemos decir que el depósito lipídico de las aves, en general, aumenta con la edad (Deaton y Lott, 1985; Legrand et al., 1987a), es mayor en hembras que en machos (Pan et al., 1979; Deaton et al., 1981; Cahaner et al., 1986; Mateos y Méndez, 1991) y varía en función de la estirpe (Leclerq y Saadoun, 1982; Calabotta et al., 1985; Leclerq y Escartin, 1987; Legrand et al., 1987a,b) y de la relación energía:proteína de la ración. Este último factor es importante, dado que un aumento de esta proporción, bien sea por un aumento de la concentración energética o bien por una reducción de la proteína, provoca un aumento del estado de engrasamiento de las aves (Donaldson , 1985; Deaton y Lott, 1985; Keren-Zvi et al., 1990, Aletor et al., 2000). No obstante, al no ser estos factores objeto del presente trabajo, nos centraremos en el efecto de la suplementación de grasa en la dieta sobre el depósito lipídico de las aves.

La inclusión de grasa en la dieta de las aves mejora la utilización de la energía metabolizable (EM) (Jensen et al., 1970). Este efecto "extra-calórico" más allá del que señalan las tablas de composición de alimentos se refleja en un menor incremento térmico y una mayor utilización de otros nutrientes. Además, la mejora de la EM depende del tipo de AG que contengan el aceite o grasa añadidos, siendo más elevada a medida que su grado de poliinsaturación aumenta (Blanch et al., 1996). En la **Tabla 1.1.7** se muestran los valores de EM para diferentes tipos de grasas y aceites.

Tabla 1.1.7. Valores de energía metabolizable (EM) para broilers y proporción de AGPI de diferentes fuentes grasas (Blanch et al., 1996).

Fuente grasa	EM (kcal/kg)	AGPI (g/100 g)
Sebo	10134	2,53
Manteca	10277	9,37
Aceite de Palma	10420	7,93
Aceite de Soja	10540	61,82
Aceite de Linaza	11902	68,71

Tabla 1.1.8. Depósito de grasa corporal y abdominal en pollos en función del nivel o tipo de grasa añadida a las dietas.

Autor	Fuente grasa	Nivel de inclusión grasa (%)	EMA dieta (kcal/kg)	PB dieta (%)	Tejido de depósito graso ¹	Contenido o graso ¹
Griffith et al., 1977	Grasa animal + vegetal	0,0	2963 ^E	22,0	Corporal ²	28,4
		3,0	2963	22,0		28,2
		6,0	2963	22,0		31,4
		9,0	2963	22,0		30,7
Deaton et al., 1981	Grasa animal	4,0	3185 ^E	21,0	Corporal	12,89 ^a
		7,0	3185	21,0		13,12 ^{ab}
		10,0	3185	21,0		13,69 ^b
	Abdominal	4,0	3185	21,0	1,72 ^a	
		7,0	3185	21,0	1,93 ^b	
		10,0	3185	21,0	2,05 ^b	
Donaldson, 1985	Aceite de algodón	2,0	2838 ^A	20,4	Corporal ²	39
		4,1	2906	20,9		38
		6,3	2977	21,4		40
		8,6	3052	22,0		40
Ajuyah et al., 1991	Aceite + Harina de	10,0	3052 ^E	21,5	Corporal	11,5
		20,0	3052	21,5		12,7
	Aceite canola + Harina	10,0	3052	21,5	Corporal	12,7 ^a
		20,0	3052	21,5		8,5 ^b
Keren-Zvi et al., 1990	Aceite de soja	0,0	2940 ^E	19,3	Abdominal	1,9 ^a
		4,4	2940	19,3		1,1 ^b
		4,9	3203	21,0	Abdominal	1,8 ^a
		9,1	3203	21,0		1,3 ^b
Roth et al., 1993	Aceite de colza	0,5	2988 ^E	20,9	Abdominal	1,8 ^a
		4,1	2940	21,8		1,8 ^a
		7,7	2920	22,3		1,4 ^b
Nitsan et al., 1997	Aceite de soja	0,0	2892 ^E	17,2	Corporal ²	41,9
		3,0	2892	17,2		46,1
		3,4	3107	18,4	Corporal ²	43,8
		6,0	3107	18,4		45,8
Sanz et al., 2000a	Sebo	8,0	3011 ^A	19,7	Corporal	15,2 ^a
	Manteca	8,0	3179	19,2		15,0 ^a
	Aceite de	8,0	3227	20,3		12,9 ^b
Crespo y Esteve-García, 2001	Sebo	10,0	3894 ^B	21,7	Abdominal	3,22 ^a
	Aceite de	10,0	3914	21,8		3,20 ^a
	Aceite de	10,0	3917	21,6		2,67 ^b
	Aceite de	10,0	3931	21,8		2,63 ^b
Crespo y Esteve-García, 2002b	Sebo	10,0	3300 ^E	21,6	Abdominal	2,1 ^a
	Aceite de	10,0	3300	21,9		1,9 ^{ab}
	Aceite de	10,0	3300	21,8		1,8 ^{abc}
	Aceite de	10,0	3300	21,7		1,6 ^{bc}

¹ Grasa corporal y abdominal expresada en g/100 g peso vivo.

² Grasa corporal expresada en base a materia seca.

^E Valores de energía metabolizable estimados; ^A Valores de energía metabolizable analizados; ^B Valores de energía bruta.

^{a,b,c} Diferentes superíndices indican diferencias significativas para cada tejido.

En la bibliografía encontramos diferentes trabajos que utilizan niveles crecientes de grasa en la dieta sin aumentar la energía bruta de la misma (**Tabla 1.1.8**). En general,

aquellos trabajos que determinan experimentalmente la EM suelen tener en cuenta el efecto extracalórico, mientras que los que expresan la EM teórica estimada no lo tienen en consideración.

Si tenemos en cuenta, por una lado la existencia del efecto extracalórico de la grasa, y por otro lado que los aceites vegetales tienen mayor EM que las grasas animales, parece lógico pensar que a medida que la inclusión de grasa en la dieta aumenta (sobre todo si ésta es poliinsaturada), sin aumentar la energía bruta de la misma, el engrasamiento corporal de las aves se incrementa. No obstante, los estudios en este sentido son controvertidos, tal y como se observa en la parte superior de la Tabla 1.1.8. Así, la inclusión de grasa animal (como fuente de grasa saturada) en la dieta, manteniendo constante su concentración energética, provoca un aumento de la cantidad de grasa abdominal y del engrasamiento corporal de las aves (Deaton et al., 1981). Por otro lado, en general la inclusión de niveles crecientes de fuentes grasas con un mayor grado de poliinsaturación (semilla de linaza y aceite de soja y colza) reduce el contenido lipídico de las aves (Keren-Zvi et al., 1990; Ajuyah et al., 1991; Roth et al., 1993). Sin embargo, la suplementación con fuentes grasas con niveles intermedios de poliinsaturación no parece afectar significativamente el estado de engrasamiento de las aves (Donaldson, 1985; Ajuyah et al., 1991; Griffiths et al., 1977).

Parece que el depósito lipídico en las aves no depende tanto de su nivel de inclusión en la dieta como del tipo de grasa o aceite añadidos a las dietas. En este sentido, y tal y como muestra la parte inferior de la Tabla 1.1.8, algunos autores han observado mayores niveles de engrasamiento en pollos que consumieron una fuente grasa animal que una vegetal, a pesar de que la fuente de grasa animal tiene menor EM que los aceites vegetales (Vilà y Esteve-García, 1996; Sanz et al., 1999a,2000a,b; Crespo y Esteve-García, 2001, 2002a). De forma similar algunos investigadores que utilizaron diferentes gradientes de sustitución de grasas animales por aceites vegetales observaron este mismo efecto (Pan et al., 1979; Pinchasov y Nir, 1992).

Dentro de este efecto que se observa en el nivel de engrasamiento al administrar fuentes ricas en AGPI, un nivel de inclusión de CLA en la dieta superior al 1-2% reduce de manera notable el contenido de grasa en diferentes tejidos de las aves (Szymczyk et al., 2001; Du y Ahn, 2002; Badinga et al., 2003).

La falta de coherencia en el estado de engrasamiento de los animales debido a la fuente grasa, a pesar de existir diferencias en su EM ha llevado a elaborar diferentes hipótesis. Ya en 1971, De Groote et al., sugirieron que las grasas vegetales presentaban mayores pérdidas de EM durante su metabolismo dando lugar a valores de energía neta

inferiores que las grasas animales. En este sentido, se ha demostrado que los AGS son un sustrato más eficiente que los AGPI (Leyton et al., 1987). Recientemente otros autores han explicado este hecho argumentando que las grasas poliinsaturadas provocan un aumento del catabolismo de las grasas y una inhibición de la síntesis endógena (Sanz et al., 2000b). Por otro lado, otros autores han hipotetizado que el consumo de fuentes ricas en AGPI de cadena larga presentes en los aceites vegetales podría inhibir alguna vía metabólica responsable de la regulación del estado de engrasamiento de las aves (Pesti et al., 2002)

En relación al tipo de tejido, el aumento del nivel de poliinsaturación de las dietas provoca una reducción en el nivel de engrasamiento de los tejidos de depósito (Crespo y Esteve-García, 2002a). Sin embargo, el efecto que causa sobre el contenido lipídico del tejido muscular es controvertido y depende no sólo del nivel y tipo de grasa, sino también del tejido muscular estudiado (Olomu y Baracos, 1991; Scaife et al., 1994). Las diferencias en el depósito lipídico entre el tejido muscular y el tejido adiposo, al igual que para la comentada para el perfil lipídico de estos tejidos se atribuye a la diferente función que desarrolla cada tejido.

En conclusión, el depósito lipídico de los pollos depende en gran medida del tipo de fuente grasa que se utilice para suplementar las dietas, sobre todo de su grado de poliinsaturación, y en menor medida de la cantidad de grasa añadida a la dieta. El balance entre ambos factores determinará el grado de engrasamiento de los animales. No obstante, hay que señalar que la revisión bibliográfica realizada no ha encontrado trabajos diseñados para valorar la interacción entre el nivel y tipo de grasa añadidos a las dietas sobre el depósito de grasa de los pollos.

1.2. OXIDACIÓN LIPÍDICA

En los últimos años se han producido una serie de cambios en los hábitos alimentarios, observándose un aumento del consumo de productos precocinados con mayor riesgo a presentar elevados niveles de oxidación. Además, los resultados de las investigaciones en el ámbito de la nutrición, han derivado en nuevos hábitos nutricionales, para evitar patologías, como los procesos cardiovasculares. En concreto, han recomendado el consumo de alimentos con mayores niveles de AGPI en detrimento de los AGS, productos de mayor susceptibilidad a la oxidación. Por ello las investigaciones se han centrado en el estudio de la oxidación y de su prevención, con el objetivo de mejorar la calidad final de los productos que llegan al consumidor.

La oxidación lipídica de los alimentos provoca una reducción de su valor nutritivo, debido a la destrucción de AGPI, vitaminas liposolubles y aminoácidos. Además, altera las características organolépticas, dando lugar a la aparición de sabores y olores desagradables que reducen la aceptabilidad del alimento por el consumidor (Patterson, 1981; Frankel, 1991; Robey y Shermer, 1994). Aunque quizás, el efecto más peligroso sea el derivado de la formación de compuestos de la oxidación, los cuales una vez ingeridos pueden depositarse en los tejidos y ser los responsables de la aparición de diversas patologías (Addis et al., 1989; Halliwell y Gutteridge, 1990; Emanuel et al., 1991).

De las revisiones generales sobre la oxidación lipídica podemos destacar las de Labuza (1971), Kanner et al. (1987), Kagan y Quinn (1988), Halliwell y Gutteridge (1990); Frankel (1991), Halliwell y Chirico (1993), Halliwell et al. (1995), Addis et al. (1996), Guardiola et al. (1996) y Min y Lee (1996), St Angelo (1996) entre otros.

1.2.1. MECANISMOS DE OXIDACIÓN

Los lípidos pueden oxidarse por vía enzimática dando lugar a diversos compuestos con diferente actividad en el organismo. No obstante, los procesos oxidativos que se producen en los alimentos y que afectan a sus características nutricionales y organolépticas son, principalmente, los derivados de una vía no enzimática, y son los que se describirán a continuación.

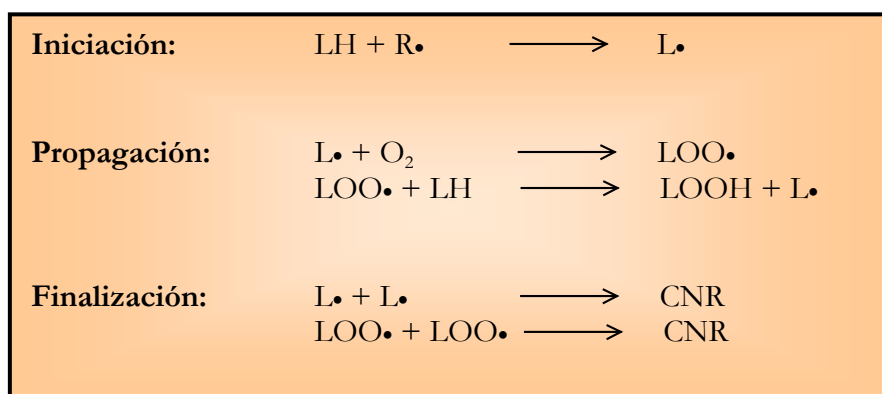
La oxidación se puede dividir en dos fases, la primaria en la que los lípidos se transforman en hidroperóxidos y la secundaria en la que estos hidroperóxidos se descomponen en productos secundarios de la oxidación. La oxidación primaria se puede llevar a cabo por la ruta clásica de formación de radicales libres o por procesos de fotooxidación que se inician por exposición a la luz.

1.2.1.1. OXIDACIÓN PRIMARIA CLÁSICA.

La oxidación lipídica clásica, o también llamada autooxidación, es una reacción en cadena mediada por radicales libres. Un radical libre es un átomo o molécula que posee un electrón desapareado, que le otorga una mayor reactividad. Estos radicales se producen en el organismo en los procesos en los que interviene el oxígeno. Si estos radicales no son “neutralizados” por un antioxidante, atacan principalmente a los AG insaturados de los fosfolípidos de las membranas celulares.

La oxidación de los lípidos por radicales libres consta de tres fases diferentes: iniciación, propagación y terminación (**Figura 1.2.1**). Para que se inicie la reacción de oxidación se necesita la presencia de un agente iniciador o radical libre ($R\bullet$) que arranca un hidrógeno de una molécula lipídica (LH). Esto provoca la reorganización electrónica de la molécula de AG que dará lugar a un radical lipídico ($L\bullet$).

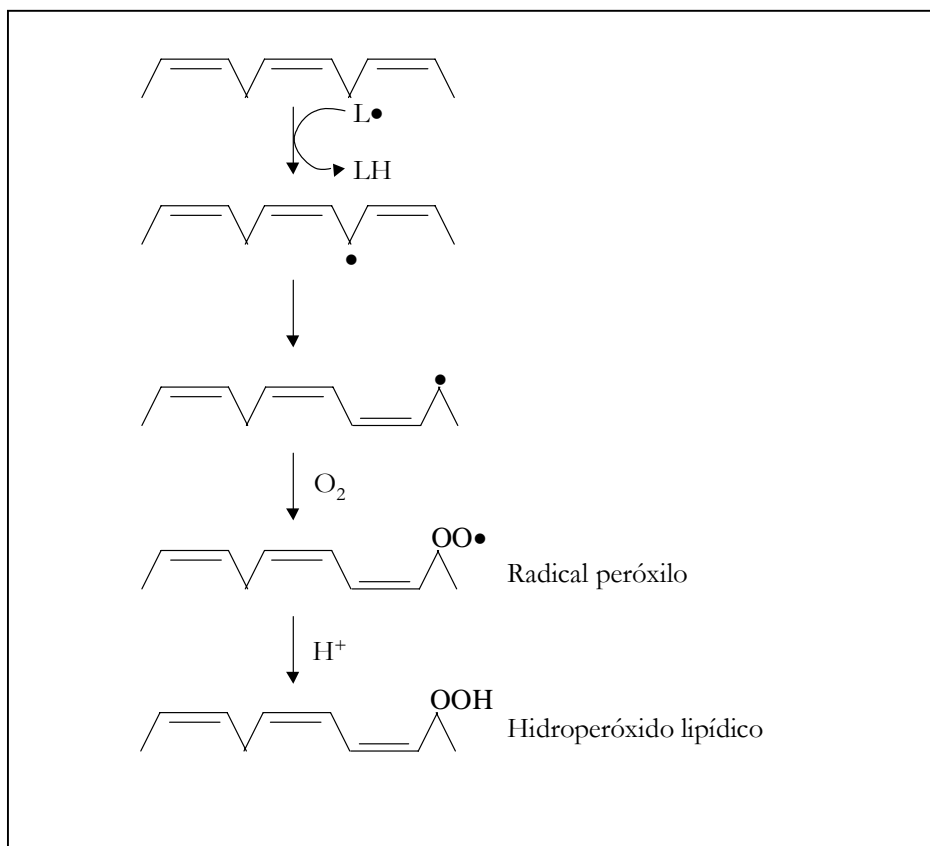
Figura 1.2.1. Reacciones que se producen en la autooxidación.



La fase de propagación normalmente comienza con la adición de una molécula de oxígeno al radical $L\bullet$ para dar lugar a un radical lipídico peróxido ($LOO\bullet$), que podrá reaccionar con otro lípido para generar un hidroperóxido ($LOOH$) y otro radical lipídico ($L\bullet$). Finalmente la reacción concluye cuando diferentes radicales reaccionan entre sí y dan lugar a compuestos no radicalarios (CNR), o cuando el substrato de la reacción se agota.

En la **Figura 1.2.2** se puede ver esquematizada la reacción entre los radicales libres y un ácido graso con tres dobles enlaces.

Figura 1.2.2. Esquema de la reacción de oxidación primaria clásica de un ácido graso con 3 dobles enlaces (Frankel, 1991).



Los agentes iniciadores más importantes implicados en el inicio de la reacción en cadena son los radicales de oxígeno y los radicales lipídicos, y se detallan en la **Tabla 1.2.1**.

Tabla 1.2.1. Radicales libres implicados en las reacciones de oxidación.

Radical	Nombre
$O_2\cdot$	Radical superóxido
$HO_2\cdot$	Radical perhidroxilo
$HO\cdot$	Radical hidroxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$LOO\cdot$	Radical peróxilo
$LOOH$	Hidroperóxido

Además hay que destacar que la presencia de metales de transición como el hierro y el cobre son capaces de promover reacciones de oxidación de los lípidos (Kanner et al., 1987). Los metales libres no sólo son capaces de generar radicales libres mediante la

reacción directa con la molécula lipídica, sino que son capaces de producir peróxido de hidrógeno y radicales superóxido e hidróxilo en presencia de oxígeno (Kanner y Harel, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1990).

1.2.1.2. FOTOOXIDACIÓN

La fotooxidación es una reacción de oxidación iniciada por el oxígeno singuleto ($^1\text{O}_2$). El $^1\text{O}_2$ es un estado excitado del oxígeno molecular y es extremadamente reactivo. Esta molécula tan reactiva necesita la presencia de compuestos fotosensibilizadores. Estos compuestos poseen un número elevado de dobles enlaces con capacidad de absorber la luz (clorofila, porfirina, riboflavina, bilirrubina, tetraciclinas entre otros) y pasar a un estado de excitación, transfiriendo el exceso de energía al O_2 y convirtiéndolo en $^1\text{O}_2$ (Halliwell y Chirico, 1993).

La forma de actuar del oxígeno singuleto no es arrancando un protón a la cadena hidrocarbonada de los AGPI como hacen los radicales de oxígeno o lipídicos, sino que actúa combinándose directamente con los dobles enlaces en una reacción llamada "ene" (Frankel, 1991; Halliwell y Chirico, 1993; Min y Lee, 1996), formando peróxidos que pueden actuar como agentes iniciadores de la oxidación lipídica por los procesos descritos en la oxidación primaria clásica. La reacción del oxígeno singuleto con el ácido linoleico es unas 1500 veces más rápida que la del oxígeno normal (Labuza, 1971). Además, a elevadas temperaturas la fotooxidación aumenta debido a que la formación del oxígeno singuleto se incrementa.

1.2.1.3. OXIDACIÓN SECUNDARIA

Los compuestos derivados de la oxidación primaria pueden descomponerse por una serie de reacciones secundarias para formar una gran variedad de compuestos de bajo peso molecular, tales como hidrocarburos, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres, los cuales contribuyen en gran medida a la aparición de malos olores y al enranciamiento de los lípidos de los alimentos (Frankel, 1991). De los más de 40 compuestos detectados (Kondjoyan et al., 1993), los aldehídos se encuentran en mayor proporción. Los diferentes compuestos volátiles se clasifican en función de su valor umbral, el cual indica la concentración necesaria del compuesto para ser detectado por los consumidores. De esta forma el hexanal, nonanal y 2,4-decadienal son los más importantes, debido a su elevada concentración y su bajo umbral de detección (De Winne and Dirinck, 1996). El hexanal ha sido recomendado como el mejor componente volátil indicador de la presencia de olores y sabores desagradables en la carne de ave cocida (Ahn et al., 1998). Dado que estos compuestos aparecen durante la conservación y los procesos térmicos de los alimentos, su valoración tiene especial interés en alimentos procesados (Kondjoyan et al., 1993; Sheldon

et al., 1997; Ahn et al., 1998; Du et al., 2001a,b).

En la **Tabla 1.2.2** se pueden observar los valores umbral de algunos compuestos volátiles presentes en la grasa de ternera. Los compuestos identificados en la carne cocida de pollo son similares a los presentes en la ternera, pero con contenido más elevado de compuestos derivados de lípidos insaturados (2,4,-decadienal) (Frankel, 1998).

Tabla 1.2.2. Compuestos volátiles (ordenados según su concentración) y valores umbral de detección de la grasa de ternera (Frankel, 1998).

Compuestos volátiles	Valor umbral
2-decenal	5,5
2-undecenal	4,2
2-nonenal	0,1
2-octenal	1
hexanal	0,15
2-heptenal	0,63
heptanal	0,042
nonanal	0,32
octanal	0,068
2,4-decadienal	0,28
<i>cis</i> -4-heptenal	0,001
<i>trans</i> -4-heptenal	0,32
<i>trans,trans</i> -2,6-nonadienal	0,001
<i>trans,cis</i> -2,6-nonadienal	0,002

1.2.2. EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN LÍPIDICA DE LA CARNE

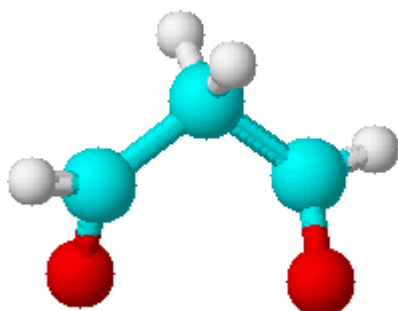
Existe un amplio abanico de técnicas analíticas para determinar la oxidación lipídica de la carne. Entre ellas las más utilizadas son aquellas que valoran los compuestos de oxidación primaria como son los hidroperóxidos, y aquellas que determinan los compuestos de oxidación secundaria como el malondialdehído (MDA), los óxidos de colesterol y los compuestos volátiles. Los inconvenientes de estas técnicas son la elevada heterogeneidad de las mismas, la imposibilidad de comparación de las determinaciones de oxidación lipídica entre diferentes estudios, y la dificultad para cuantificar de manera precisa la oxidación lipídica real.

Dado que la oxidación lipídica es un proceso dinámico, en función del momento en que se lleva a cabo la determinación de la oxidación y del método utilizado, los resultados pueden ser muy variables. Por ejemplo, consideremos dos muestras de carne refrigerada 1 y 20 días, las cuales se analizan por los diferentes métodos analíticos. El valor más elevado de oxidación lipídica de la muestra refrigerada 1 día sería el índice de peróxidos, dado que la muestra comienza a oxidarse. Mientras, en aquella muestra refrigerada 20 días los valores

más elevados los encontraríamos en las determinaciones de los compuestos secundarios derivados de la descomposición de los peróxidos. Es por ello que algunos investigadores opinen que ningún método es ideal para medir la oxidación (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Las técnicas para la valoración de peróxidos son técnicas de baja sensibilidad y difíciles de adaptar al análisis de rutina de cantidades importantes de muestras (Grau, 2000). Es por ello que un gran número de técnicas estudian el nivel de oxidación de los alimentos y tejidos a través del TBA (Test del ácido tiobarbitúrico). El TBA es una de las formas de medir la oxidación más antigua y más frecuentemente usada. Es un método simple y rápido de usar que valora el MDA (**Figura 1.2.3**), un dialdehído que se forma durante la oxidación secundaria. No obstante, esta técnica tiene sus limitaciones en algunos tipos de muestras como las liofilizadas. En estos casos se ha propuesto valorar este compuesto mediante técnicas de fluorescencia (Wilkinson et al., 2001). Además en muestras conservadas durante largos periodos de tiempo se ha descrito una reducción del contenido de MDA y en consecuencia de los valores de TBA (King et al., 1995; Wen et al., 1996). Inicialmente se pensó que esta reducción podía ser debida a la degradación del MDA por enzimas lipolíticos secretados por microorganismos presentes en el alimento. Posteriormente se demostró que los microorganismos no afectan al MDA (Ang et al., 1989), y que dicha reducción en los valores de TBA era el resultado de la polimerización de los productos de oxidación secundaria. Así, el MDA reacciona con un amplio rango de compuestos e incluso entre sí formando dímeros y trímeros de MDA, los cuales presentan una reducida reactividad frente al TBA (Gutteridge, 1975; Esterbauer et al., 1991; Aubourg, 1993). Una variante del TBA es el TBA inducido, el cual en vez de aportar un valor puntual de TBA, valora el potencial oxidativo de la muestra a lo largo del tiempo.

Figura 1.2.3. Estructura del Malondialdehído.



Otros compuestos de oxidación secundaria son los derivados del colesterol, tales como el 7α -hidroxicolesterol, 7β -hidroxicolesterol, 7-ketocolesterol, 25-hidroxicolesterol y colestán-triol entre otros. Estos óxidos de colesterol son importantes debido a sus efectos biológicos, lo que ha provocado la aparición de diferentes métodos para su aislamiento e

identificación de los alimentos (Chen et al., 1993; Gray et al., 1996; Ahn et al., 1999).

Pero las determinaciones que cada día cobran más importancia son aquellas que determinan los compuestos volátiles. En este sentido, algunos autores han sugerido que la medida de la oxidación lipídica aportada por el hexanal es más precisa que la aportada por el TBA (López-Bote et al., 2003).

Tabla 1.2.3. Valores de oxidación lipídica obtenidos por diferentes métodos analíticos para 4 muestras de muslo cocido de pollos alimentados con 4 fuentes diferentes de grasa (Grau et al., 2001a,b).

Determinación analítica (mg/kg)	Fuente grasa dietética (6%)			
	Sebo	Aceite de Girasol	Aceite de Girasol oxidado	Aceite de Linaza
Hidroperóxidos lipídicos	154,7c	162,2bc	153,8b	181,0a
TBA	2,554c	3,186bc	3,562b	6,574a
Productos totales oxidación colesterol	3,70a	3,59a	3,31a	2,45b
colesterol-5 β ,6 β -epoxido	0,61a	0,58a	0,56ab	0,38b
7 β -hidrocolesterol	1,48a	1,49a	1,27ab	0,94b
colesterol-5 α ,6 α -epoxido	0,53	0,37	0,46	0,36
colestetriol	0,09	0,12	0,12	0,09
7-ketocolesterol	0,90a	0,91a	0,79ab	0,55b
25-hidroxicolesterol	0,10	0,11	0,11	0,12

Se puede observar como la existencia de tantas técnicas analíticas dificulta la cuantificación precisa de la oxidación lipídica real (**Tabla 1.2.3**). Esto provoca que sea difícil recomendar rangos o niveles máximos de oxidación lipídica en los alimentos. Es por ello por lo que las determinaciones de los compuestos volátiles son cada vez más importantes, dado que su contenido está directamente relacionado con la presencia de olores y sabores rancios que son detectados por el consumidor. Además existe una elevada correlación entre los valores de TBA y los compuestos volátiles en la carne de pollo (O'Neill et al., 1998a, Bou et al., 2001) y pavo (Ahn et al., 1998; Higgins et al., 1999). Diversos trabajos basándose en esta correlación positiva han asignado un valor límite de TBA en la carne de las aves. Así, el umbral para la detección de olores y sabores en muslo

de pollo cocido se sitúa a partir de valores de TBA superiores a 800 μg MDA/kg (O'Neill et al., 1998a; Bou et al., 2001).

1.2.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA OXIDACIÓN DE LA CARNE

La estabilidad de las membranas celulares del tejido muscular está influida por varios factores, de los que discutiremos los más importantes. Posteriormente, nos centraremos por un lado, en aquellos relacionados con la composición de la carne y, por otro lado en los relacionados con su conservación y procesado.

Los tejidos del pollo presentan diferencias en cuanto a su susceptibilidad a la oxidación lipídica. Las fibras blancas de metabolismo glucolítico presentes en la pechuga son utilizadas durante actividades vigorosas en un corto periodo, mientras que las fibras rojas de tipo I y IIa de metabolismo oxidativo presentes en el muslo se utilizan en actividades sostenidas. Las fibras rojas tienden a ser más pequeñas, contienen más mitocondrias, mioglobina y lípidos, y tienen un sistema vascular más desarrollado que las fibras blancas. Todas estas diferencias provocan diferencias en la estabilidad oxidativa de los tejidos (Erickson, 1998). En este sentido, el potencial oxidativo de los diferentes tejidos de las aves sigue el siguiente orden: hígado > muslo > pechuga > piel.

En general, tanto la concentración de fosfolípidos, triglicéridos como de prooxidantes, hierro y AGPI entre otros, juegan un papel muy importante en el potencial oxidativo de los diferentes tejidos (Higgins et al., 1999). No obstante, los fosfolípidos son los que presentan una mayor influencia en la oxidación lipídica. Así, un orden similar al potencial oxidativo sigue la concentración de fosfolípidos en estos tejidos: hígado > muslo > pechuga > piel (Ang, 1988). Pese a que el rol de los triglicéridos en la oxidación de la carne es menor al de los fosfolípidos, algunos autores han mostrado que la composición en AG de los triglicéridos es importante para determinar el desarrollo de la oxidación (Ahn et al., 1996). Además, la oxidación lipídica en la carne ha sido correlacionada positivamente con el contenido en hierro, humedad, y proteína de la misma (Ang, 1988). El agua únicamente actúa como solvente para disolver el oxígeno y los metales catalíticos (Ang, 1988), mientras que el hierro tanto libre como unido al grupo hemo es considerado un fuerte prooxidante en la carne (Ahn et al., 1992). En relación al contenido de AGPI de la carne, Rhee et al. (1996) compararon el potencial de la oxidación lipídica de la carne de ternera, pollo y cerdo y concluyeron que éste era el principal determinante de las diferencias interespecie en la tasa de oxidación lipídica en la carne cocida.

Tabla 1.2.4. Trabajos que han estudiado el efecto de la inclusión de fuentes grasas poliinsaturadas en la dieta sobre la estabilidad oxidativa de los tejidos del pollo.

Autores	Tejido	Fuente grasa	Nivel de inclusión	Valores de TBA (mg)
Lin et al., 1989a	Muslo de pollo refrigerado 2 días	Aceite de Coco	5,5	0,2 ^b
		Aceite de Oliva		0,2 ^b
		Aceite de Linaza		1,4 ^a
		Aceite Soja		0,2 ^b
Lin et al., 1989b	Muslo crudo refrigerado 1	Aceite de Girasol	5,5	0,3*
		Aceite de Girasol		0,5
Ahn et al., 1995	Muslo crudo	Ácido linolénico	0,0	0,2 ^a
			2,6	0,7 ^b
Cherian et al., 1996	Muslo crudo	Aceite de Palma	3,5	1,6 ^b
		Aceite de Girasol		1,6 ^b
		Aceite de Linaza		1,6 ^b
		Aceite de Pescado		2,0 ^a
O'Neill et al., 1998a	Muslo crudo refrigerado 3	Sebo	6,0	4,0 ^a
		Aceite de Oliva		3,2 ^b
Maraschiello et al., 1999	Muslo crudo	Manteca	6,0	1,0
		Aceite de Girasol		1,1
		Aceite de Oliva		1,2
Ruiz et al., 1999	Muslo crudo con piel	Manteca	6,0	0,06
		Aceite de Girasol		0,10
		Aceite de Oliva		0,06
Surai y Sparks, 2000	Hígado	Aceite de Maíz	3,0	9,3 ^b
		Aceite de Atún	3,0	17,3 ^a
Grau et al., 2001a,b	Muslo crudo con piel	Sebo	6,0	0,2 ^b
		Aceite de Girasol		0,4 ^b
		Aceite de Linaza		1,4 ^a
Jeun-Horng et al.,	Carne de pollo refrigerada 10 días		0,0	0,2 ^b
		Aceite de Pescado	2,0	0,2 ^b
			4,0	0,3 ^a
Bou et al., 2004	Muslo + Pechuga	Aceite de Pescado	1,25	0,2
			2,50	0,3

^{a,b,c} Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas en cada trabajo.

* No se especifican las diferencias estadísticamente significativas.

Como ya hemos comentado, el procesado y conservación de la carne puede alterar la susceptibilidad oxidativa de la misma. Así, pese a las diferencias explicadas entre los tejidos de las aves, algunos autores no han observado diferencias en la oxidación lipídica de muslo y pechuga conservados en refrigeración. Estos autores sugiriendo que la tasa de desarrollo de la rancidez oxidativa en la carne de pollo cocida refrigerada depende de su contenido en antioxidantes, principalmente vitamina E (Yamauchi et al., 1982; Lin et al., 1989b). En este sentido, la relación entre AGPI y vitamina E en la carne de pollo parece ser un buen indicador de la estabilidad oxidativa de la carne (Jensen et al., 1998a).

Dada la importancia que el contenido en AG, principalmente AGPI, y antioxidantes tienen sobre la estabilidad oxidativa de la carne de pollo, a continuación desarrollaremos más extensamente estos factores relacionados con la composición de la carne. Posteriormente, nos centraremos en los efectos de la conservación y procesado de la carne sobre su estabilidad oxidativa.

1.2.3.1. Perfil lipídico de la carne

Tal y como ya se ha comentado en el capítulo anterior, el perfil lipídico de la carne puede ser modificado mediante modificaciones de la dieta de las aves. En este sentido, y tal y como se puede observar en la **Tabla 1.2.4**, la inclusión en la dieta de fuentes grasas con un elevado contenido en AGPI, como el aceite de linaza o pescado, provoca un aumento de la susceptibilidad de la carne de pollo a la oxidación.

Los AGPI son más fácilmente atacables por los radicales libres que los AGMI o los AGS. De hecho, la oxidación de los AGS a 100°C es 100 veces menor que la del ácido linoleico (Labuza, 1971). Paralelamente, la susceptibilidad de los AGPI no es igual para todos ellos, sino que aumenta con el nivel de insaturación, o lo que es lo mismo, con el número de dobles enlaces. Así, se ha establecido que la susceptibilidad de los tres AG insaturados mayoritarios en las dietas es: Oleico < Linoleico << LNA con una relación 1:10:30 (Kanner et al., 1987; St. Angelo, 1996).

Como ya se ha comentado el consumo de alimentos ricos en AGPI se ha asociado con la prevención de la aparición y desarrollo de diferentes patologías, entre las que destacan las patologías cardiovasculares (Krauss et al., 2001). Por contrapartida, la presencia de estos AGPI en los alimentos conlleva un aumento de la susceptibilidad a la oxidación, y los compuestos derivados de los procesos oxidativos pueden promover la aparición de problemas cardiovasculares (Addis, 1986; Addis et al., 1996). Tal y como se ha señalado, existe una dificultad para asignar un nivel máximo de oxidación lipídica en los alimentos para evitar repercusiones sobre la salud. Por todo ello, para beneficiarnos del

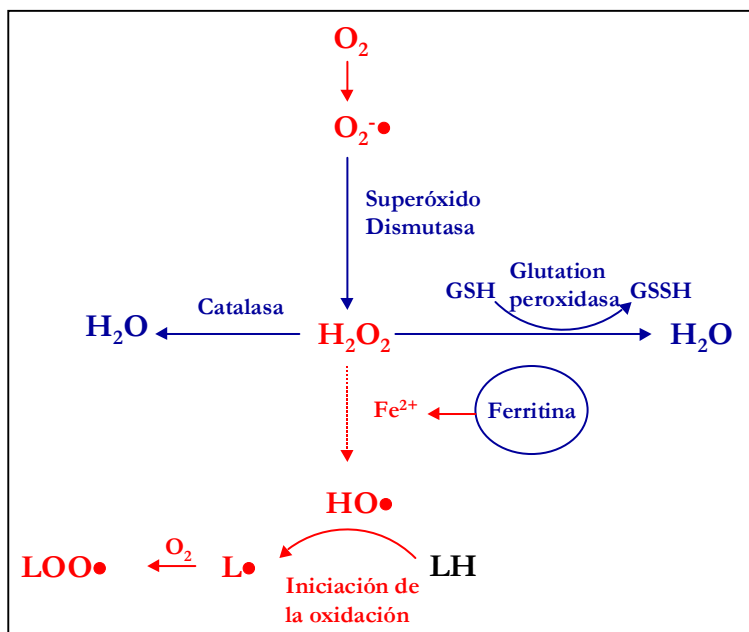
enriquecimiento de la carne de pollo en AGPI debemos evitar la aparición de compuestos derivados de la oxidación lipídica, y para ello es necesario aumentar el nivel de antioxidantes en este alimento.

1.2.3.2. Presencia de antioxidantes

Las células del músculo esquelético poseen una serie de componentes que de forma natural evitan los procesos oxidativos. Estos sistemas antioxidantes intrínsecos evitan la formación de radicales libres e inhiben su actividad oxidante una vez formados (Halliwell et al., 1995). Así la **superóxido dismutasa** acelera la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , el cual posee una menor reactividad. Las **catalasas** presentes en los peroxisomas convierten el H_2O_2 en agua y oxígeno. Además, las células poseen un sistema enzimático muy importante, la **glutation peroxidasa**. Este complejo enzimático elimina el H_2O_2 oxidando el glutatión reducido (GSH). Otro sistema antioxidante importante es el relativo a los metales de transición (hierro y cobre) presentes en el músculo esquelético. Como ya se ha comentado, estos metales son capaces de generar radicales libres, y esta actividad está controlada mediante la formación de complejos estables con proteínas. La **ferritina** es la principal proteína que almacena hierro en la célula, mientras que el cobre se encuentra unido principalmente a dipéptidos con histidina, como la **carosina**. En la **Figura 1.2.4** se esquematiza la formación de radicales libre, mostrando la función de los sistemas intrínsecos que poseen las células para evitar la acción de los mismos.

Estos sistemas intrínsecos de la célula dejan de ser eficaces cuando ésta muere. Así, una vez sacrificado el animal, se inactivan la mayor parte de los mecanismos que permiten controlar los procesos oxidativos, produciéndose reacciones de oxidación que en pocos días llegan a provocar marcadas alteraciones en las propiedades de la carne. En este sentido, la oxidación avanza rápidamente cuando se rompe su estructura, ya que todos los componentes de la célula se ponen en contacto, quedando los fosfolípidos expuestos al oxígeno, enzimas e iones metálicos (Frankel, 1998).

Figura 1.2.4. Esquema de la formación de radicales libres (en color rojo) y de los sistemas intrínsecos de las células para evitar el inicio de la oxidación lipídica (en color azul).



GSH: Glutacion reducido; GSSH: Glutacion oxidado; LH: Ácido graso; L^{\bullet} : Radical lipídico; LOO^{\bullet} : Radical lipídico peróxido; $O_2^{\bullet-}$: Radical superóxido; HO^{\bullet} : Radical hidróxilo.

Para proteger los lípidos de la carne de la oxidación se han utilizado diferentes estrategias. Una de ellas ha sido la adición experimental de antioxidantes tanto sintéticos (butilato hidroxil tolueno (BHT), butilato hidroxil anisol (BHA), ácido etilenediaminetetracético (EDTA) y nitrato sódico) como naturales (ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína, histidina, clara de huevo y extractos de plantas como el romero y el pimentón) directamente sobre la carne (Ahn et al., 1993b; Chang y Chen, 1998; Kanatt et al., 1998). No obstante, la inclusión de un antioxidante *in vitro* no permite que éste sea embebido en la estructura de membrana. Por lo tanto, la incorporación *in vivo* del antioxidante a las membranas celulares es más efectiva para controlar la oxidación de los lípidos (Asghar et al., 1990). En los últimos años ha incrementado el interés por la utilización de antioxidantes naturales, los cuales añadidos al pienso de las aves protegen los lípidos de la carne frente a la oxidación. Se han estudiado diferentes alternativas como el ácido ascórbico (Bartov, 1977a; Bou et al., 2001; Grau et al., 2001a,b), el β -caroteno (Barroeta y King, 1991; King et al., 1995; Ruiz et al., 1999), la vitamina A (Sallman et al., 1998), la carnosina (O'Neill et al., 1998b,1999), el CLA (van de Berg et al., 1995), la avena (Lopez-Bote et al., 1998a), extractos de plantas como el romero, salvia (López-Bote et al., 1998b; Mielnik et al., 2003) y óregano (Botsoglou et al., 2002,2003), las catequinas del té (Tang et al., 2001) y minerales como el cobre y el selenio (Bartov, 1977b; Bou et al., 2004). Pero sin duda, la vitamina E es el antioxidante de origen natural que ha demostrado una mayor potencia como antioxidante biológico. En este sentido, la suplementación dietética

con vitamina E se ha utilizado en aves para prevenir la oxidación lipídica asociada al enriquecimiento de la carne con AGPI (**Tabla 1.2.5**), y en consecuencia reducir la formación de compuestos volátiles responsables de la rancidez (King et al., 1995; O'Neill et al., 1998a; Bou et al., 2001).

La vitamina E suplementada en el pienso tiene un elevado coste, y es preciso considerar no sólo la dosis óptima, sino el tiempo de administración. Sin embargo, existen pocos trabajos que ajusten la dosis y/o los periodos de suplementación con vitamina E para prevenir de forma efectiva la oxidación lipídica. En este sentido Bartov y Frigg (1992) aportaron vitamina E en los piensos de pollos y pudieron establecer ecuaciones lineales para la predicción de la estabilidad oxidativa del muslo en función de la vitamina E consumida:

$y = 7,91 - 0,0126x$, donde y es la estabilidad oxidativa de la carne de pollo (expresada en valores TBA) y x es la vitamina E consumida (mg *all-rac-α*-tocoferol/pollo).

De forma similar Bartov y Bornstein (1978) establecieron ecuaciones lineales para predecir la estabilidad oxidativa de la grasa abdominal en función del periodo de suplementación de la vitamina E:

$y = 32,8 - 1,74x$, donde y el incremento del valor peróxido de la grasa abdominal y x es la duración de la suplementación con vitamina E (expresada en semanas).

Además, en la **Figura 1.2.5** se muestran los niveles de oxidación relativos alcanzados en tejidos de pollos para diferentes tiempos de administración citados por diferentes autores. Podemos observar como Morrissey et al. (1997) y Bartov y Bornstein (1978) administrando 200 y 20 mg vitamina E/kg, respectivamente, coinciden en que la máxima estabilidad se obtiene a los 28 días de suplementación previa al sacrificio. En el caso de Grau et al. (2000b,c), la máxima estabilidad depende de la dosis de vitamina E suplementada. Así, con dosis de 75 mg/kg se debe administrar pienso toda la vida del animal (43 días), mientras que con dosis de 150 ó 225 mg vitamina E/kg son necesarios un mínimo de 21 ó 10 días de suplementación previa la sacrificio, respectivamente (Grau et al., 2000b,c). No obstante, los datos de la Figura 1.2.5 son de carne cruda, y dado que la carne de pollo se consume cocida, es necesario establecer el nivel y tiempo de suplementación con vitamina E a partir de los datos de muestras cocidas. En este caso, la suplementación dietética con 75 mg vitamina E/kg es insuficiente para asegurar una adecuada estabilidad de la carne cocida.

Tabla 1.2.5. Trabajos que han estudiado el efecto de la suplementación dietética con vitamina E sobre la estabilidad oxidativa del muslo de pollo.

Autores	Tejido	Suplemento dietético con Vitamina E (mg/kg) ¹	Reducción de la oxidación lipídica (%) ²		
Bartov y Bornstein, 1981	Muslo crudo	0			
		10	13		
		30	56		
Lin et al., 1989a	Muslo crudo refrigerado 2 días	0 100	58		
Lin et al., 1989b	Muslo crudo refrigerado 1 día	0 200	22		
	Muslo crudo refrigerado 9 días	0 200	67		
Bartov y Frigg, 1992	Muslo crudo	0 100	83		
		Ahn et al., 1995	Muslo crudo	0 200	44
King et al., 1995	Muslo crudo	0 150	36		
De Winne y Dirinck, 1996	Muslo crudo	0 200	93		
Galvin et al., 1997	Muslo crudo	30 200	57		
		Kanatt et al., 1998	Carne de pollo	0 100	55
López-Bote et al., 1998b	Muslo crudo	0 200	20		
O'Neill et al., 1998a	Muslo crudo refrigerado 3 días	30 200	71-74		
		O'Neill et al., 1998b	Muslo crudo	30 200	45
Maraschiello et al., 1999	Muslo crudo	0 200	62-83		
		Ruiz et al., 1999	Muslo crudo con piel	0 200	44-60
Grau et al., 2000a,c	Muslo crudo con piel	0 75 150 225	34 37 48		
		Grau et al., 2001a,b	Muslo crudo con piel	0 225	84
				Tang et al., 2001	Muslo crudo congelado 1 mes
		Botsoglou et al., 2002	Muslo crudo	0 200	87

¹ Expresado en mg de acetato de *all-rac-α*-tocoferol/kg alimento.

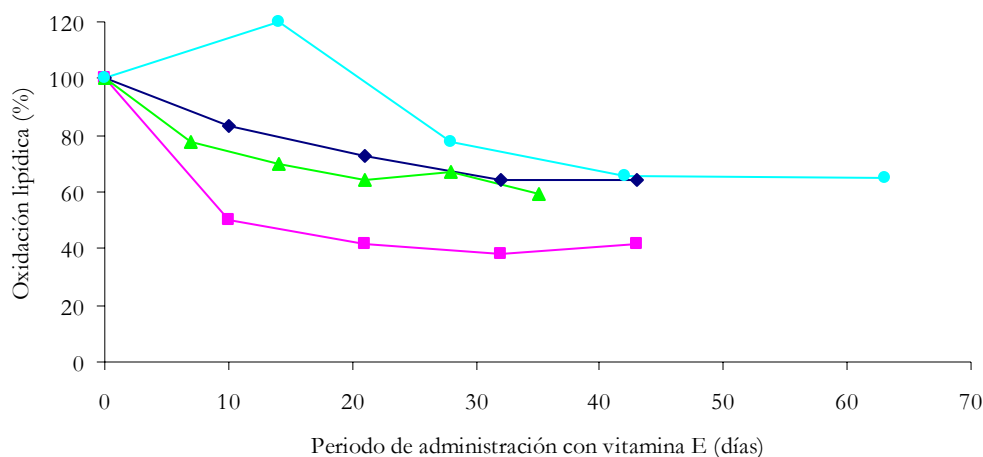
² Reducción de los valores de TBA en los animales suplementados respecto a los animales control.

Son necesarias dosis de 150 mg vitamina E/kg durante un mínimo de 32 días o de 225 mg vitamina E/kg durante los últimos 21 días para obtener una correcta estabilidad

oxidativa de la carne de pollo (**Figura 1.2.6**).

Por otro lado, la cantidad de vitamina E a suplementar viene determinada por el nivel de poliinsaturación dietético. De manera que los niveles de vitamina E deben adaptarse al tipo y nivel de grasa incorporada al pienso. Sin embargo, en la bibliografía no existen trabajos diseñados para determinar la cantidad de vitamina E que se debe añadir al pienso de las aves, en función del nivel y tipo de grasa dietéticos, para conseguir carne de pollo con un nivel máximo de estabilidad oxidativa.

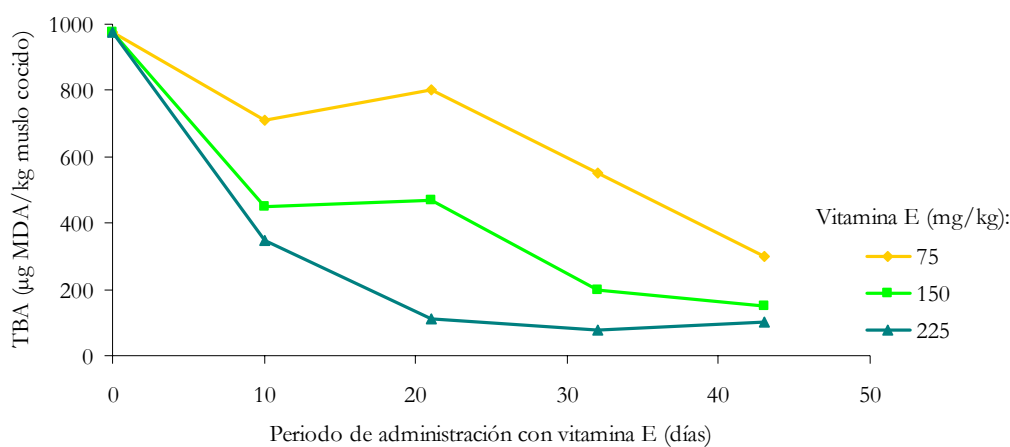
Figura 1.2.5. Influencia del periodo de administración de piensos suplementados con diferentes dosis de vitamina E sobre el grado de oxidación en diferentes tejidos (expresado como la proporción del valor obtenido en el caso de no suplementar con vitamina E durante todo el periodo).



	Dosis vitamina E ¹	Tejido	Determinación oxidación
◆ Grau et al. (2000c)	75	Muslo crudo con piel	TBA
■ Grau et al. (2000c)	225	Muslo crudo con piel	TBA
▲ Morrissey et al. (1997)	200	Muslo crudo sin piel	TBA inducido
● Bartov y Bornstein (1978)	20	Grasa abdominal	Índice de peróxidos

¹ Expresado en mg de acetato de *all-rac-α*-tocoferol/kg alimento.

Figura 1.2.6. Influencia del periodo de administración de piensos suplementados con diferentes dosis de vitamina E (expresado en mg de acetato de *all-rac- α* -tocoferol/kg alimento) sobre el grado de oxidación en el muslo cocido de pollo (Grau et al., 2000b,c).



Dada la importancia que los procesos oxidativos poseen sobre la calidad organoléptica y nutricional de la carne de pollo, y como estos procesos pueden ser prevenidos a través de la suplementación de las dietas con vitamina E, en el siguiente capítulo de la revisión se procederá a la descripción de las propiedades y funciones de la vitamina E.

1.2.3.3. Conservación y procesado de la carne

Existen diferentes factores tecnológicos que afectan a la oxidación lipídica de la carne de pollo, como son los tratamientos térmicos, el picado, el salado, el envasado y la conservación de la misma, entre otros. El simple troceado o picado de la carne favorece la oxidación lipídica, dado que la integridad celular se rompe favoreciendo el contacto entre los compuestos prooxidantes y los componentes lipídicos (Erickson, 1998).

La estabilidad oxidativa también se reduce si la carne se somete a un proceso térmico o a una conservación prolongada. En este sentido, el calor aplicado durante el procesamiento de alimentos cárnicos modifica, en cierta medida, la oxidación de los componentes lipídicos, desarrollando productos no deseables que alteran las características organolépticas y nutricionales del producto. La liberación de hierro desde los compuestos hémicos, la destrucción de la integridad celular, la ruptura de hidroperóxidos preexistentes y la inactivación de enzimas antioxidantes son consecuencia del calentamiento y generalmente conduce a la aceleración de la oxidación (Erickson, 1998). Tal y como se observa en la **Tabla 1.2.6**, la mayoría de los tratamientos térmicos aceleran la oxidación de los lípidos de la carne cocida. Además, durante los procesos térmicos y posterior almacenamiento refrigerado de la carne se desarrollan directamente sustancias volátiles

derivadas de los hidroperóxidos lipídicos, e indirectamente se reducen los niveles de compuestos volátiles asociados con aromas deseables en productos cárnicos (Frankel, 1998).

Tabla 1.2.6. Trabajos que han estudiado el efecto del tratamiento sobre la estabilidad oxidativa de la carne de pollo.

Autores	Tejido	Procesado	Valores de TBA (mg MDA/kg)
Yamauchi et al., 1982	Muslo	Crudo	0,30 ^b
		Cocido	0,42 ^a
	Pechuga	Cruda	0,26 ^b
		Cocida	0,55 ^a
Pikul et al., 1984	Muslo	Crudo	0,58
		Cocido	0,72
	Pechuga	Cruda	0,31
		Cocida	0,38
Ahn et al., 1995	Muslo	Crudo	0,19*
		Cocido	0,83
	Pechuga	Cruda	0,16
		Cocida	0,50
Jensen et al., 1997 ¹	Muslo	Crudo	0,30*
		Cocido	0,70
	Pechuga	Cruda	0,30
		Cocida	0,60
King et al., 1995	Muslo	Crudo	0,67 ^b
		Cocido	1,00 ^a
Ruiz et al., 1999	Muslo con piel	Crudo	0,08 ^b
		Cocido	0,30 ^a
Grau et al., 2001a,b	Muslo con piel	Crudo	0,68 ^b
		Cocido	3,47 ^a

¹ Valores de TBA estimados de la extrapolación de gráficas.

^{a,b,c} Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas en cada trabajo.

* No se especifican las diferencias estadísticamente significativas.

Además, en los productos cárnicos que son sometidos a cocción, durante el enfriamiento previo al envasado, el oxígeno tiene suficiente tiempo para iniciar la oxidación, afectándolos en el almacenamiento refrigerado (Ahn et al., 1992). La presencia de oxígeno es uno de los factores más críticos que influye en el desarrollo de la oxidación lipídica (Ahn et al., 1992,1993a,1998). Así, el proceso de cocción por sí mismo tiene poco efecto sobre el TBA de la carne, pero la exposición de aire durante el almacenamiento tiene un efecto significativo sobre el desarrollo de la oxidación en la carne cocida (Ahn et al.,

1996). Por ello, para controlar de manera efectiva la oxidación es esencial envasar al vacío inmediatamente después del cocinado (Ahn et al., 1992; Chang y Chen, 1998). El envasado en atmósfera modificada es también una medida efectiva para incrementar la estabilidad de los productos cárnicos (Frankel, 1998).

Como ya se ha comentado anteriormente, la conservación de la carne de pollo suele favorecer también los procesos de degradación de los lípidos. La refrigeración (4°C) es una de las formas de conservación de los productos cárnicos que ha sido más ampliamente estudiada. En este sentido, en la parte superior de la **Tabla 1.2.7** se puede observar como, en general, los valores de oxidación lipídica en la carne cruda aumentan durante la refrigeración de la misma. Además, los productos cárnicos sometidos a un proceso térmico se oxidan mucho más durante su conservación que los productos conservados crudos (parte inferior de la Tabla 1.2.7).

Para preservar la calidad de la carne durante un largo periodo de tiempo, se puede someter la carne a congelación (Erickson, 1998). La congelación de la carne se caracteriza por alargar su vida útil, debido a que a bajas temperaturas muchas reacciones de oxidación se reducen, pero no se anulan por completo. En este sentido, el riesgo de oxidación aumenta si la carne se somete a una congelación muy prolongada (Pikul et al., 1984; Lin et al., 1989a,b; Brandon et al., 1993; Galvin et al., 1993; Jensen et al., 1995,1998b; Rhee et al., 1996; López-Bote et al., 1998a; Grau et al., 2001a; Tang et al., 1993).

Dado que la carne de pollo presenta un elevado contenido de AG insaturados, la rancidez consecuencia de la oxidación lipídica es crítica en la determinación de su vida útil durante el almacenamiento y procesado térmico. En este sentido, para minimizar la oxidación lipídica en la carne, y aumentar su vida útil, existen diferentes estrategias, entre las que destacan las siguientes (Decker y Xu, 1998):

- 1.- Incrementar la estabilidad oxidativa de la carne a través de la manipulación de las dietas de las aves, con el objetivo de incrementar la concentración de antioxidantes y reducir la presencia de sustratos prooxidantes como son los AG insaturados.

- 2.- Escoger técnicas de procesado que no incrementen de forma marcada la actividad de los compuestos prooxidantes y, a la vez, no reduzcan drásticamente la actividad de los antioxidantes endógenos.

- 3.- Utilizar técnicas de empaquetado que mejoren la estabilidad oxidativa y/o añadir aditivos con actividad antioxidante directamente en la carne.

Tabla 1.2.7. Trabajos que han estudiado el efecto de la conservación en refrigeración sobre la estabilidad oxidativa de la carne de pollo cruda (parte superior) y cocida (parte inferior).

Autores	Tejido	Tiempo de refrigeración	Valores de TBA (mg MDA/kg)
Lin et al., 1989b	Muslo crudo	1	0,17 ^b
		9	1,12 ^a
Jensen et al., 1997 ¹	Muslo crudo	0	0,30*
		14	1,70
King et al., 1995	Muslo crudo	0	0,67 ^b
		5	1,00 ^a
Nam et al., 1997	Muslo crudo	0	0,40 ^b
		12	1,04 ^a
Kanatt et al., 1998	Carne cruda	0	0,67 ^b
		4	2,47 ^a
López-Bote et al., 1998a,b	Muslo crudo	0	0,10*
		9	0,51
O'Neill et al., 1998b	Muslo crudo	0	1,19*
		7	1,92
Jensen et al., 1998b	Muslo crudo	0	0,20 ^b
		14	0,30 ^a
Ruiz et al., 1999	Muslo crudo con piel	0	0,08 ^b
		7	0,42 ^a
Yamauchi et al., 1982	Muslo cocido	0	0,47 ^b
		3	4,41 ^a
Ang, 1988	Muslo cocido	0	4,13*
		5	17,33
Ang, 1992	Muslo cocido	0	0,36*
		3	8,18
Ahn et al., 1995	Muslo cocido	0	0,83*
		7	5,56
Jensen et al., 1997 ¹	Muslo cocido	0	0,70*
		7	12,60
O'Neill et al., 1998b	Muslo cocido	0	1,53*
		7	9,75

¹ Valores de TBA estimados de la extrapolación de gráficas.

^{a,b,c} Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas en cada trabajo.

* No se especifican las diferencias estadísticamente significativas.

1.3. VITAMINA E

La vitamina E fue descubierta en el año 1922 por Evans y Bishop, tras observar que una dieta semipurificada, pobre en grasas, producía incapacidad reproductiva en ratas. La sustancia que faltaba en esa dieta era liposoluble y estaba presente en el germen de trigo y las hojas de lechuga fresca y alfalfa. Desde entonces, ha aumentado su importancia ya que su actividad antioxidante se ha asociado con la prevención de determinadas patologías, como la arteriosclerosis, diabetes, cataratas y enfermedades nerviosas como el Parkinson o el Alzheimer (Traber y Sies, 1996). Todo ello ha derivado en un aumento de la investigación dado su importante actividad antioxidante en los alimentos de origen animal, y lo que es más importante su beneficio directo sobre la salud.

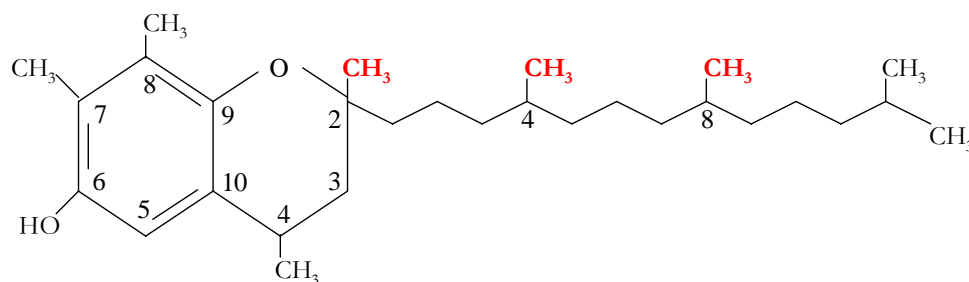
Entre las revisiones generales más importantes que tratan diferentes aspectos de la vitamina E, se pueden destacar las de Burton e Ingold (1989), Bjørneboe et al. (1990), Burton y Traber (1990), Buckley y Morrissey (1991), Burton et al. (1993), Drevon (1993), Niki (1993,1996), Dutta-Roy et al. (1994), Kamal-Eldin y Appelqvist (1996), Scherf et al. (1996), Traber y Sies (1996), Traber y Arai (1999), Bramley et al. (2000), Herrera (2000), Parks y Traber (2000), Herrera y Barbas (2001), Surai (2002), entre otros.

1.3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y ACTIVIDAD

En la definición de vitamina E se incluyen 8 compuestos activos muy afines entre sí, que se dividen en dos grupos, los denominados tocoferoles (α , β , δ , γ) y los tocotrienoles (α , β , δ , γ). Todas las formas comparten una estructura básica formada por un anillo 6-cromanol y una cadena lateral o cola fitol isoprenoide en la posición 2. En el caso de los tocoferoles la cadena isoprenoide es saturada mientras que los tocotrienoles presentan 3 insaturaciones en los carbonos 3, 7 y 11 de la cadena.

Los tocoferoles poseen 3 centros de asimetría, en el carbono 2 del anillo y en el carbono 4 y 8 de la cola fitol, de manera que según la posición de los grupos metilos en estos centros, se pueden formar 8 estereoisómeros diferentes (**Figura 1.3.1**). Cuando los grupos metilo se encuentran en el mismo plano, las formas se denominan R, mientras que si se encuentran en planos diferentes son denominadas formas S. Los tocoferoles de fuentes naturales tienen los grupos metilo en un mismo plano y se denominan 2R,4R,8R α -tocopherol o RRR α -tocopherol (2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4'R, 8'R, 12 trimethyltridecyl)-6-chromanol). Las fuentes sintéticas de vitamina E son mezclas equimolares de los 8 estereoisómeros posibles y se denominan *all-rac*-dl- α -tocopherol (2,5,7,8-tetramethyl-2RS-(4'RS, 8'RS, 12 trimethyltridecyl)-6-chromanol).

Figura 1.3.1. Estructura del α -tocoferol.



Los grupos metilos de color rojo señalan los centros de asimetría que dan lugar a los ocho estereoisómeros.

De todos los compuestos activos de que se compone la vitamina E, el RRR α -tocoferol (α -Toc) es el que tiene mayor actividad biológica, y tanto este compuesto como el acetato de *d*- α -tocoferol (α -TA) son utilizados como estándares para establecer la actividad biológica. La actividad biológica se mide en función de la eficacia para prevenir los síntomas de su deficiencia. En general, el orden de actividad de los tocoferoles es $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (Burton et al., 1993). No obstante, la actividad biológica relativa varía según la forma estereoisomérica de cada tocoferol. En general, la configuración R del C-2 del anillo cromanol es la responsable de su actividad biológica (Machlin et al., 1982). Así, la formas 2R del α -Toc (RRR + RRS + RSR + RSS) presentan una actividad biológica mayor que las formas 2S del α -Toc (SSS + SSR + SRS + SRR). En la **Tabla 1.3.1** se presenta la actividad relativa de las formas estereoisoméricas del α -TA en ensayos de resorción en ratas. En general, el orden de actividad es RRR < RRS < RSS < RSR < SSS < SRS < SRR < SSR (Weiser y Vecchi, 1982).

Debido a que la vitamina E ha despertado un especial interés debido a su importante acción antioxidante, es interesante destacar que las actividades biológicas y antioxidantes no siempre coinciden. La actividad antioxidante *in vivo* para los tocoferoles sigue el mismo orden que su actividad biológica: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$. De forma opuesta, el orden de la actividad antioxidante *in vitro* para los tocoferoles es $\delta > \gamma > \beta > \alpha$, de manera que, el isómero α -Toc que posee la mayor actividad biológica y actividad antioxidante *in vivo* es el isómero del grupo de los tocoferoles con menor actividad antioxidante *in vitro* (Kamal-Eldin y Appelquist, 1996). Aunque el orden de la actividad antioxidante *in vitro* de los tocoferoles, descrita anteriormente, es más o menos la inversa de su actividad biológica y actividad antioxidante *in vivo*, bajo ciertas condiciones físicas y químicas, este orden puede variar. Respecto a la actividad antioxidante de los diferentes estereoisómeros, parece que la configuración 2R del α -Toc proporciona la máxima actividad antioxidante *in vivo* (Ingold et al., 1990).

Tabla 1.3.1. Actividad relativa de los estereoisómeros del α -tocoferol (Weiser y Vecchi, 1982).

Estereoisómeros del α -tocoferol	Posición de los grupos metilo			Actividad relativa (%)
	C-2 anillo	C-4 cola fitol	C-8 cola fitol	
RRR α -tocoferol	R	R	R	100
RRS α -tocoferol	R	R	S	90
RSS α -tocoferol	R	S	S	73
RSR α -tocoferol	R	S	R	57
SSS α -tocoferol	S	S	S	60
SRS α -tocoferol	S	R	S	37
SRR α -tocoferol	S	R	R	31
SSR α -tocoferol	S	S	R	21

1.3.2. ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA E

Una de las principales funciones de la vitamina E, en concreto del α -Toc, es la de ser un antioxidante lipídico *in vivo*. La vitamina E bloquea la reacción en cadena de oxidación de los lípidos, y en concreto de los AGPI que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares. Para llevar a cabo esta acción es esencial su posición en las membranas celulares, así como su estructura química. El anillo cromanol es el encargado de la función antioxidante, mientras que la cola es la que aporta las características de liposolubilidad y es la responsable de su posición a nivel de las membranas celulares (Niki et al., 1985; Burton y Traber, 1990).

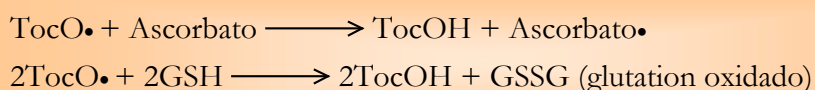
El α -Toc inhibe la oxidación lipídica por dos mecanismos. Por un lado elimina los radicales libres producidos durante la peroxidación, inhibiendo de esta manera la reacción en cadena de la oxidación, y por otro lado, actúa como quelante del oxígeno singuleto.

La oxidación lipídica es una cadena de reacción de radicales libres que se inicia cuando un AG, presente en los fosfolípidos de las membranas, pierde un hidrógeno al reaccionar con un radical libre, de manera que el propio ácido graso se transforma en un radical libre, el cual reacciona rápidamente con el oxígeno molecular dando lugar a un radical libre peroxilo (L-OO•). Este radical libre, a su vez, puede actuar sobre otro AGPI que iniciaría de nuevo todo el proceso, y que daría lugar a la cadena de peroxidación.

La cadena de reacción de radicales libres se rompe cuando el α -tocoferol (TocOH), presente en la membrana, transfiere un hidrógeno a un radical libre peroxilo transformándose en un hidroperóxido (L-OOH), y dando lugar a un radical tocoferil (TocO•).



El radical tocoferil puede reaccionar con diferentes compuestos donantes de electrones, entre los que destacan el ascorbato (vitamina C) o el GSH, para regenerar el tocoferol (Niki, 1993,1996; Kamal-Eldin y Appleqvist, 1996).



Además este radical tocoferil puede volver a reaccionar con otro radical peroxilo de AGPI, para dar lugar a un hidroperóxido más un producto oxidado que será transformado a un producto sin actividad de radical. No obstante, esta última reacción en condiciones fisiológicas es menos probable debido al rápido reciclaje del radical tocoferil explicado anteriormente (Surai, 2002).



El α -Toc es la forma de vitamina E más activa debido a que este isómero reacciona 10 veces más rápidamente con los radicales peróxilo que los AGPI (Niki, 1996). Además, el radical tocoferil del α -Toc posee una mayor estabilidad que impide que la reacción en cadena pueda continuar (Burton e Ingold, 1989). Así, aunque el α -Toc se encuentra en muy baja proporción en las membranas celulares (aproximadamente una molécula por cada 1000 de lípidos (Niki, 1993)), éste se considera el principal antioxidante liposoluble del organismo. Cada molécula de α -Toc puede reaccionar con dos radicales peróxilo. Gracias a esto y a la regeneración por parte de otros compuestos, como la vitamina C o el GSH, se calcula que cada molécula puede proteger 10^3 - 10^8 moléculas de AGPI.

El α -Toc también puede actuar como antioxidante previniendo la fotooxidación,

reaccionando con el oxígeno singuleto por una reacción de quelación física o química (Kamal- Eldin y Appelqvist, 1996). La quelación física del oxígeno singuleto por parte del tocoferol predomina sobre la quelación química.

En la quelación física, el oxígeno singuleto excitado es desactivado a oxígeno triplete a través de un mecanismo de transferencia de cargas que implica la donación de un electrón por parte del tocoferol. Aunque la actividad de la quelación física de los tocoferoles es menor que la de los carotenoides, cada molécula de tocoferol puede desactivar 40-120 moléculas de oxígeno singuleto (Kamal- Eldin y Appelqvist, 1996).

Por otro lado, en la quelación química los tocoferoles reaccionan con el oxígeno singuleto formando un hidroperóxido intermedio que acabará descomponiéndose en productos secundarios de la oxidación (Clough et al., 1979; Neely et al., 1988).

La presencia de componentes sinérgicos de los tocoferoles, como otros fenoles, la vitamina C, los carotenos, las aminas, los aminoácidos, etc., aumenta la potencia antioxidante de los tocoferoles (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

1.3.3. ABSORCIÓN, DIGESTIÓN Y METABOLISMO DE LA VITAMINA E

La absorción de la vitamina E, al ser una molécula liposoluble, está ligada a la absorción de la grasa de la dieta. Esta vitamina se absorbe principalmente en el intestino delgado, y para ello es imprescindible la secreción biliar y la solubilización micelar (Gallo-Torres, 1970). En este sentido, los ácidos biliares procedentes del hígado y segregados al intestino delgado favorecen la formación de micelas y facilitan la acción de las lipasas pancreáticas sobre los lípidos.

La absorción del tocoferol dentro del enterocito es un proceso pasivo, dado que no se han descrito proteínas transferidoras de tocoferoles a nivel intestinal en ninguna especie animal (Traber y Sies, 1996). Según estudios en ratas, se ha estimado que la absorción de la vitamina E oscila entre 40 y 93% (Tijburg et al., 1997; Bramley et al., 2000). En pollos y pavos la tasa de absorción ileal de α -Toc radioactivo, calculada como la diferencia entre la cantidad ingerida y la existente en el ileo, fue del 78-90% (Sklan et al., 1982), mientras que la absorción aparente fecal osciló entre 11% y 96% (Engberg et al., 1996; Liu et al., 1995; Jensen et al., 1999; Villaverde et al., 2004). Como se puede observar existe una elevada variabilidad en los valores de absorción del α -Toc. Esta variabilidad puede ser debida a la edad del ave (Liu et al., 1995), la metodología utilizada y factores nutricionales entre otros.

A continuación nos centraremos en los factores nutricionales, entre los que destacan la dosis de inclusión de vitamina E, su forma de administración y la composición

lipídica de la dieta.

La absorción del α -Toc es considerablemente elevada para concentraciones dietéticas bajas, mientras que disminuye a medida que aumenta el nivel de suplementación dietética con α -TA (Losowsky et al., 1972; Villaverde et al., 2004). Así, la transferencia de vitamina E de la dieta a los tejidos del pollo disminuye a dosis elevadas de vitamina E en la dieta (Flachowsky et al., 2002). Además la absorción aparente del α -Toc varía según el éster de α -TA que se utilice en la dieta, de esta forma cuando se añade acetato de α -Toc al pienso la absorción aparente es de 71% aproximadamente, mientras que con la forma succinato la absorción es 58%. Por otro lado, la absorción de γ -tocoferol oscila entre 87% y 85% para las formas acetato y succinato, respectivamente (Jensen et al., 1999). Parece ser que esto es debido a que la carboxil éster hidrolasa presenta una mayor capacidad para hidrolizar la forma acetato (Lauridsen et al., 2001).

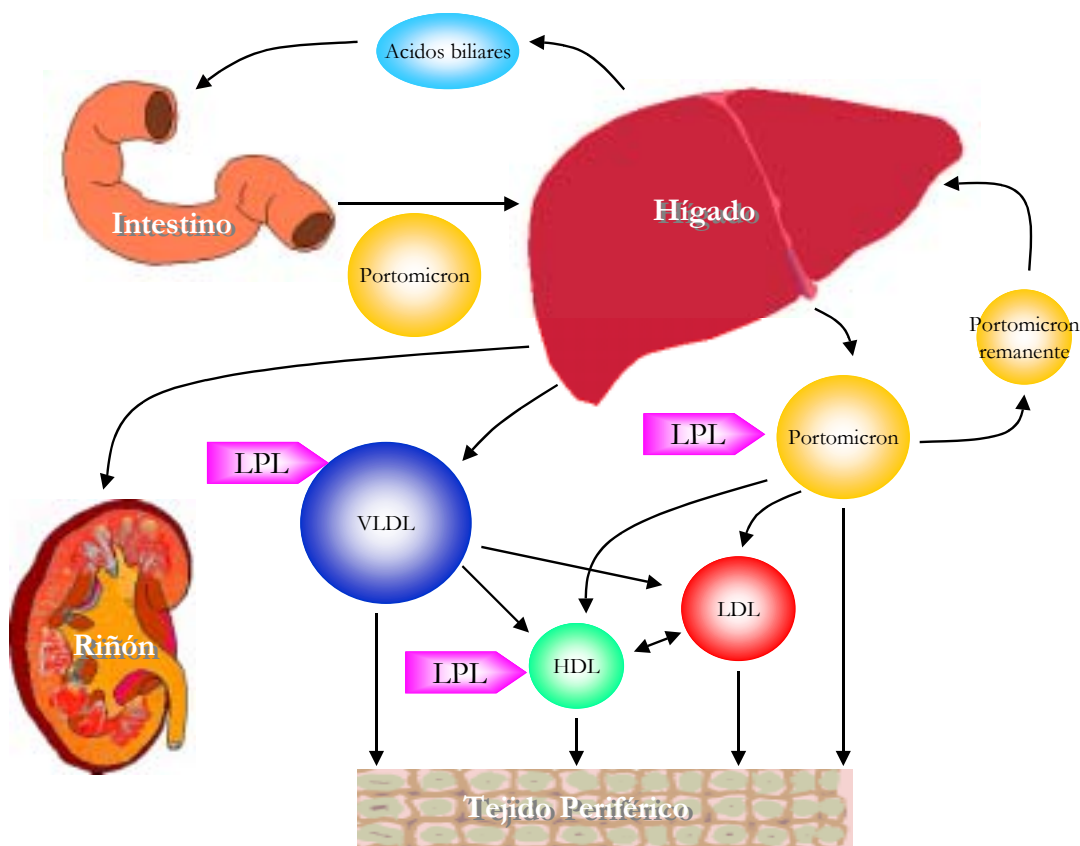
La digestión y absorción de la vitamina E está estrechamente ligada a otros compuestos lipídicos como los triglicéridos (Liu et al., 1995). Así, en general, la inclusión de grasa en la dieta mejora la absorción del α -Toc (Gallo-Torres et al., 1971). Respecto a la presencia de AGPI en la dieta, la información disponible es controvertida. En principio el hecho de aumentar los AGPI en la dieta mejora la absorción de los lípidos, y por lo tanto, la de la vitamina E. Estudios recientes coinciden en que la presencia de AGPI de cadena larga en la dieta incrementa la absorción fecal de vitamina E tanto en ratas (Tijburg et al., 1997) como en pollos (Villaverde et al., 2004). Sin embargo algunos autores (Gallo-Torres et al., 1971) han descrito que la presencia de AGPI reduce la absorción de vitamina E.

Una vez absorbida, la vitamina E pasa a formar parte de los quilomicrones para su secreción a la linfa en mamíferos, o de los portomicrones para su circulación portal en las aves (**Figura 1.3.2**). Debido a la hidrofobicidad que presenta la vitamina E, su transporte y distribución en medios acuosos se realiza en lipoproteínas de forma conjunta a otros lípidos.

Una vez en el hígado, la vitamina es secretada preferencialmente en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), pero también puede ser secretada directamente y sin ninguna modificación en portomicrones. Tanto las VLDL como los portomicrones pueden ser hidrolizados por la lipoprotein lipasa (LPL), que se encuentra anclada en el endotelio capilar. Del catabolismo de estas estructuras, una parte de la vitamina E es captada por el tejido subyacente, el resto puede regresar al hígado en forma de remanentes de portomicrones o puede ser transferida a las HDL y a las LDL. La LPL también puede actuar sobre las HDL y LDL para que la vitamina E pueda acceder a los

tejidos periféricos.

Figura 1.3.2. Absorción y transporte de la vitamina E.



A pesar de que no existen diferencias en la absorción intestinal entre los diferentes isómeros y estereoisómeros de los tocoferoles y los tocotrienoles, ni en su transporte por los quilomicrones, el isómero que predomina en sangre y tejidos es el α -Toc (Kiyose et al., 1997; Burton et al., 1993), y concretamente sus formas estereoisoméricas 2R (Traber et al., 1990). Este hecho se debe a la existencia de una proteína transferidora de α -Toc (α -TTP) situada en el hígado. Esta proteína discrimina entre los tocoferoles, reconociendo y captando las formas 2R del α -Toc para incorporarlas a las VLDL y evitando, de esta manera, su eliminación por vía biliar (Leonard et al., 2002). Por el momento esta proteína únicamente ha sido aislada del hígado de ratas (Sato et al., 1991; Yoshida et al., 1992) y de humanos (Kuhlenkamp et al., 1993). Algunos trabajos han demostrado una incorporación preferencial del isómero α -Toc a tejidos de pollos y pavos tras la administración de una dieta con una mezcla de isómeros de tocoferoles (Cherian et al., 1996; Surai et al., 1999). Por lo tanto, es posible que esta proteína se encuentre en las aves.

La excreción de vitamina E en aves ha sido poco estudiada. El producto primario de la oxidación del α -Toc es la tocoferil quinona, la cual puede ser parcialmente reducida a

tocofeíl hidrokuínona. Estos compuestos pueden ser conjugados con el ácidos glucorónico y secretados en la bilis para su eliminación por vía fecal (Drevon, 1993; Surai, 2002). No obstante, la formación de la tocoferil quinona *in vivo* es escasa debido, tal y como se ha comentado, al reciclaje del α -Toc una vez se ha formado el radical tocoferil. Los compuestos de la oxidación también pueden ser metabolizados a ácido α -tocoferónico y eliminados vía renal. No obstante, la vía principal de eliminación es la vía biliar, mientras que únicamente una pequeña parte es eliminada vía urinaria. Además, Schultz et al. (1995) describieron un metabolito excretado por orina, el 2,5,7,8-tetrametil-2-(carboxietil)-6-hidroxicroman α -tocoferol. Este metabolito no es derivado de la oxidación y es especialmente importante al administrar dosis elevadas de α -Toc, dado que un exceso de α -Toc satura la capacidad de mantener la vitamina E en el plasma y es eliminada directamente por orina.

El depósito de α -Toc en los tejidos de los pollos alimentadas con dietas suplementadas con α -Toc sigue el siguiente orden: corazón \geq pulmón $>$ hígado $>$ tejido adiposo $>$ muslo $>$ pechuga $>$ cerebro (Sheehy et al., 1991; Cherian et al., 1996; Morrissey et al., 1997). Se han observado marcadas diferencias en el depósito de α -Toc según la capacidad oxidativa de la fibra muscular. En este sentido, las fibras tipo I y IIa de metabolismo oxidativo, presentes en el muslo acumulan más α -Toc que aquellas del metabolismo glucolítico presentes en la pechuga (Jensen et al., 1998a; Malczyk et al., 1999).

1.3.4. MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE α -TOCOFEROL DE LOS TEJIDOS

En los últimos años ha aumentado la conciencia sobre la importancia de la dieta sobre la salud humana. En concreto, el contenido de α -Toc de los alimentos ha sido objeto de especial interés, dado que se considera el mejor antioxidante lipídico natural, y su consumo ha sido asociado con la prevención de diferentes tipos de patologías (Traber y Sies, 1996). Por lo tanto, es lógico que aumentar el contenido en vitamina E de los alimentos destinados a consumo humano sea un objetivo prioritario dentro del área de la Producción Animal.

El depósito tisular de α -Toc en los tejidos de las aves puede verse afectado por el tipo de tejido estudiado, por el estado fisiológico y por aspectos relacionados con la composición de la ración. El contenido en vitaminas (E, A y C), minerales (selenio, zinc, cobre, hierro), AG insaturados y la presencia de antioxidantes sintéticos tienen una influencia sobre el depósito de vitamina E. A continuación nos centraremos en la suplementación dietética con α -Toc y su relación con la composición lipídica de la dieta.

1.3.4.1. Suplementación dietética con α -tocoferol

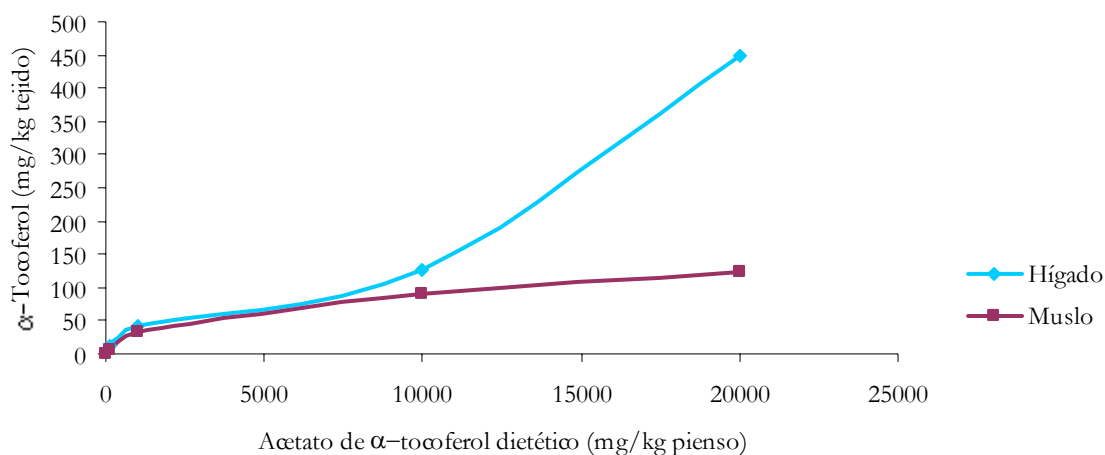
Generalmente el α -Toc se añade a la dieta en forma de α -TA siendo el acetato dl- α -tocoferol la forma comercial más habitual. En la bibliografía las estrategias para conseguir aumentar el depósito tisular de α -Toc se han basado en modificaciones tanto del nivel como del tiempo de administración en el pienso, y se muestran a continuación.

1.3.4.1.1. Nivel de inclusión

La suplementación dietética con α -TA se ha utilizado eficazmente para enriquecer la carne de pollo con α -Toc, debido a la relación positiva existente entre la concentración de α -Toc en pienso y tejidos de las aves (Sheehy et al., 1991; Klaus et al., 1995; Jensen et al., 1999; Flachowsky et al., 2002). Así en los últimos años el nivel de vitamina E en las dietas de pollos ha aumentado y se han superado los niveles recomendados por el NRC (1994). Concretamente, en la actualidad las raciones para broilers contienen casi 3 veces los requerimientos propuestos por el NRC (Villamide y Fraga, 1999). Pese a que esto supone un incremento de los costes, la mejora de las características productivas y reproductivas de las aves, así como de la calidad de la carne producida puede cubrir este coste extra. Es por ello que continúa la tendencia a incrementar el nivel de vitamina E en las dietas de pollos.

Tal y como se ha comentado, el enriquecimiento en vitamina E de la carne es proporcional a los niveles de la dieta (Sheehy et al., 1991; Jakobsen et al., 1995; Galvin et al., 1997; Jensen et al., 1999; Flachowsky et al., 2002). En este sentido, Klauss et al. (1995) suplementando el pienso de las aves con 0, 10 y 100 mg α -TA/kg y Sheehy et al. (1991) con 5, 25, 65 y 180 mg α -TA/kg, observaron una elevada correlación de 0,91 y 0,997-1, respectivamente, entre el nivel de α -Toc de los tejidos y de la dieta. No obstante, estos autores utilizan dosis relativamente bajas, inferiores a 500 mg α -TA/kg. En cambio, Flachowsky et al. (2002) que utilizaron niveles de inclusión de vitamina E en el pienso muy superiores, de 0 a 20000 mg α -TA/kg, observaron una saturación en el contenido de α -Toc del muslo y de la pechuga para dosis superiores a 10000 mg α -TA/kg. Por otro lado, no observaron saturación en el depósito de α -Toc del hígado de los pollos (**Figura 1.3.3**).

Figura 1.3.3. Depósito de α -tocoferol en el hígado y muslo de pollos en función de la suplementación dietética con acetato de α -tocoferol (Flachowsky et al., 2002).



En la **Tabla 1.3.2** se detalla la concentración de α -Toc en muslo obtenido por diversos autores a partir de diferentes dosis de α -Toc en la dieta. Como se puede observar, existe una elevada variabilidad entre los niveles de α -Toc que se depositan en este tejido, a partir de niveles de suplementación dietética similares. Esta variabilidad, en parte, es debida a la heterogeneidad de los métodos analíticos usados para la determinación de los tocoferoles en pienso y tejidos de aves. Esto hace que los datos aportados en la bibliografía sean muy variables y escasamente comparables entre sí, dificultando que se fijen unas recomendaciones de dosis y tiempo de administración.

1.3.4.1.2. Tiempo de administración

Dado que la vitamina E es un nutriente de elevado coste, al tratar de establecer una recomendación de suplementación con vitamina E en el pienso de aves, se hace preciso considerar no sólo la dosis óptima, sino el tiempo de administración. En este sentido, Morrissey et al (1997) observaron que la suplementación con 200 mg α -TA/kg de pienso durante 3 semanas antes del sacrificio produce una concentración de 17,3 mg α -Toc/kg similar a la de los pollos que recibieron pienso suplementado con esta misma concentración durante 5 semanas de la fase de crecimiento (**Figura 1.3.4**). En el caso de la pechuga, fueron necesarias 4 semanas de suplementación con 200 mg α -TA/kg para optimizar el contenido de vitamina E en este tejido.

Tabla 1.3.2. Niveles de α -tocoferol en muslo (expresados en mg/kg) conseguidos con diferentes niveles de suplementación dietética con acetato de α -tocoferol y con inclusión de diferentes tipos de aceites y grasas.

Autor	Semanas de suplementación	Acetato de α -Tocoferol (mg/kg dieta)	Fuente grasa	Nivel de inclusión grasa (%)	α -Tocoferol (mg/kg muslo)
Sheehv et al., 1991 ^{1*}	3,4	0	Sebo	5	< 10
		25			30
		65			100
		180			250
Miller y Huang, 1993	7,4	450	Aceite de Pescado	0	95,5 ^a
				10	58,9 ^b
				20	41,2 ^b
Jakobsen et al.,	6	0	Aceite de Soja	2	8 ^b
		100			11 ^b
		500			19 ^a
Cherian et al., 1996 ²	4	55	Aceite de Palma	3,5	2,5
		93			4,8
		40	Aceite de Girasol	3,5	3,2
		100			4,9
		48	Aceite de Linaza	3,5	2,5
		85			3,8
37	Aceite Pescado	3,5	2,5		
91			3,4		
Galvin et al., 1997 ¹	6	0	Aceite de Girasol	6	0,0 ^c
		30			5,0 ^b
		200			28,0 ^a
Nam et al., 1997	4	0	Linaza	10	2,2 ^b
		100			3,3 ^a
O'Neill et al., 1998a	8	30	Sebo	6	7,2 ^c
		200			23,6 ^b
		30	Aceite de Oliva	6	8 ^c
200	30,6 ^a				
Maraschiello et al.,	6	200	Manteca	6	13,4
		200	Aceite de	6	11,9
		200	Aceite de Oliva	6	8,7
Ruiz et al., 1999	6	200	Manteca	6	19,2
		200	Aceite de	6	20,1
		200	Aceite de Oliva	6	13,2
Surai y Sparks, 2000	62	40	Aceite de Maíz	3	9,5 ^b
		40	Aceite de Atún	3	7,6 ^b
		160			16,5 ^a
Flachowsky et al.,	4,2	0	Aceite de Soja y Grasa Animal	7,5	1,0 ^c
		100			4,9 ^c
		1000			31,8 ^b
		10000			90,5 ^a
		20000			122,0 ^a

¹ Contenido de α -tocoferol en el muslo estimado de la extrapolación de gráficas.

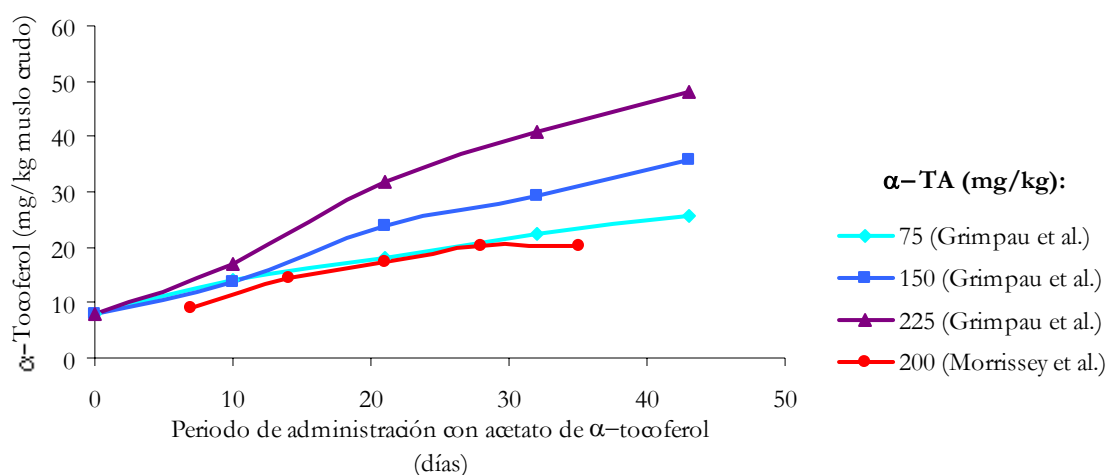
² Contenido real de α -tocoferol en el pienso.

^{a,b,c} Diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas en cada trabajo.

* Diferencias significativas de los resultados no especificadas.

De forma similar otros investigadores han estudiado el contenido de vitamina E en el muslo crudo con piel tras la administración de piensos suplementados con diferentes dosis de α -TA y tiempos de administración antes del sacrificio (Grimpau et al., datos no publicados). Ellos observaron como a medida que aumenta el periodo de administración con α -TA, aumenta el contenido de α -Toc en este tejido y, pese a que el periodo experimental fue de 6 semanas, únicamente observaron una leve tendencia a la estabilidad del depósito (Figura 1.3.4). Quizás la diferencia entre ambos trabajos se deba al contenido de grasa de los muslos. En el trabajo de Grimpa et al. las muestras de muslo estaban formadas por una mezcla homogénea de muslo y piel, y en el trabajo de Morrissey et al. (1997), las muestras contenían únicamente tejido muscular. Por otro lado, Bartov y Frigg (1992) quienes administraron dosis de 150 mg α -TA/kg durante dos semanas antes del sacrificio o durante las 3 primeras semanas de edad, únicamente consiguieron un 64% y 46%, respectivamente, del depósito de vitamina E alcanzado administrando una dosis inferior (100 mg α -TA/kg) durante todo el periodo experimental de 7 semanas.

Figura 1.3.4. Influencia del periodo de administración de piensos suplementados con diferentes dosis de acetato de α -tocoferol sobre el depósito de α -tocoferol en muslo de pollo, estudiada por diferentes autores (Morrissey et al., 1997; Grimpau et al., datos no publicados).



1.3.4.2. Composición lipídica de la dieta

Los niveles de suplementación con vitamina E recomendados por el NRC (1994) sugieren que dicha suplementación varíe en función del tipo y cantidad de grasa añadida al pienso, aumentando a medida que se incremente el nivel de insaturación de la dieta. Los AG más insaturados presentan una mayor susceptibilidad a la oxidación, y por lo tanto, utilizan más α -Toc para controlar estos procesos oxidativos, quedando menos disponible para depositarse en los tejidos. Por lo tanto, las necesidades de α -Toc, aumentan a medida

que aumentamos el nivel de insaturación. Aunque este aumento en los requerimientos no se realiza proporcionalmente al grado de insaturación de los alimentos, ya que se ha estimado que los requerimientos de vitamina E para 1 g de ácido graso con 2, 3, 4, 5 y 6 dobles enlaces son de 0,6, 0,9, 1,2, 1,5 y 1,6 mg de vitamina E (RRR- α -Toc-equivalentes), respectivamente (Muggli, 1994).

De esta forma, los requerimientos de vitamina E dependen de la longitud y el grado de insaturación de los AG presentes en la dieta, los cuales vendrán definidos, principalmente, por el nivel y tipo de grasa añadida al pienso. No obstante, diferentes autores que han utilizado grasas y aceites en la dieta con diferente grado de insaturación obtienen datos heterogéneos respecto al depósito de α -Toc en los tejidos de las aves. Algunos de ellos observan como el contenido de α -Toc de los tejidos de pollos se reduce al adicionar aceites insaturados en el pienso (Miller y Huang, 1993; Applegate and Sell, 1996; Husveth et al., 2000; Surai y Sparks, 2000; Sijben et al., 2002), mientras que otros no observan este efecto (Cherian et al., 1996; Grau et al., 2001a,b). Sin embargo, hay que señalar que la revisión bibliográfica realizada no ha encontrado trabajos diseñados para valorar la influencia del nivel y tipo de grasa añadida sobre el depósito de α -Toc en la carne de pollo.

1.3.4.3. Procesado la carne de pollo

Anteriormente, en el apartado de oxidación lipídica se han detallado los mecanismos que se desencadenan en la carne de las aves durante su conservación y procesado térmico. Así, es fácil entender que de forma general los cambios que se producen alteran la estructura y estabilidad celular provocando un aumento del estado oxidativo.

La administración de vitamina E a concentraciones elevadas ha sido amplia y eficazmente utilizada para mejorar la calidad de la carne de pollo (Bartov y Bornstein, 1981; Yamauchi et al., 1982; Lin et al., 1989a,b; Frigg et al., 1991; Ajuyah et al., 1993a; Brandon et al., 1993; Galvin et al., 1993,1997; Miller y Huang, 1993; Sheehy et al., 1993; Ahn et al., 1995; King et al., 1995; Cherian et al., 1996; De Winne y Dirinck, 1996; Lauridsen et al., 1997; Morrissey et al., 1997; Jensen et al., 1997,1998a; Nam et al., 1997; López-Bote et al., 1998a,b; O'Neill et al., 1998a,b,1999; Malczyk et al., 1999; Maraschiello et al., 1999; Ruiz et al., 1999, 2001; Grau et al., 2001a,b, Botsoglou et al., 2002), de pavo (Sante y Lacourt, 1994; Wen et al., 1996; Sheldon et al., 1997; Ahn et al., 1998; Higgins et al., 1998,1999; Mercier et al., 1998,2001; Botsoglou et al., 2003; Mielnik et al., 2003) y de pato (Russell et al., 2003).

Esta práctica es especialmente interesante en la producción avícola al haberse

demostrado que la vitamina E acumulada en los tejidos permanece en los mismos durante su conservación y procesado, mejorando tanto las propiedades tecnológicas de la carne, como los atributos de calidad de los productos: estabilidad del color, jugosidad, desecación, presentación de olores y sabores anómalos, entre otros.

Está claro que la suplementación dietética con vitamina E mejora la calidad y estabilidad de la carne de las aves sometida a procesos de cocinado y conservación. Sin embargo, la integridad de la molécula de vitamina E puede verse afectada por el procesado. Trabajos recientes indican que la vitamina E se degrada muy poco durante el procesado de productos cárnicos, y su papel antioxidante se ejerce todavía en los productos finales, retrasando su deterioro oxidativo durante la conservación (King et al., 1995; Ruiz et al., 1999). La temperatura, la velocidad a la que se alcanza esa temperatura y el tiempo de procesado, así como el tipo de atmósfera que esté con contacto con la carne serán determinantes para definir el estado oxidativo de la carne (Kingston et al., 1998), y así poder prever las pérdidas en su contenido de α -Toc.

Dada la variabilidad de factores que pueden afectar al estado oxidativo, es comprensible que en la bibliografía haya investigadores que observen una degradación y pérdida de α -Toc de la carne (Higgins et al., 1998; Ruiz et al., 1999; Grau et al., 2001a,b), mientras que otros no observen pérdidas (King et al., 1995; Wen et al., 1996). Además, algunos autores han sugerido que la pérdida parcial de α -Toc quizás sea debida a pérdidas junto con los componentes liposolubles del material exsudado durante la cocción, en vez de al propio tratamiento térmico (Ruiz et al., 1999).

En conclusión, con la incorporación de la vitamina E en la dieta de broilers:

- Cubrimos las necesidades biológicas de estos animales para este nutriente
- Obtenemos una protección frente a la oxidación de los lípidos, sobre todo en carnes ricas en AGPI, prolongando la vida comercial de estos productos.
- Obtenemos un producto con un valor añadido, enriquecido en vitamina E y que aportará un beneficio directo sobre la salud del consumidor.

Capítulo 2

Objetivo y planteamiento experimental

Para investigar la verdad es preciso dudar, siempre que sea posible, de todas las cosas, una vez en la vida.

Descartes

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En la revisión bibliográfica de la presente Memoria de Tesis se ha puesto de manifiesto que es posible modificar el contenido y la composición lipídica de la carne de pollo a través de su alimentación. Además se ha señalado la falta de estudios encaminados a valorar el mecanismo de depósito de los AG, es decir, la responsabilidad de la síntesis endógena y del aporte exógeno de AG sobre dicho depósito. Se ha hecho especial énfasis en el enriquecimiento en AGPI de la carne de pollo, la presencia de los cuales conlleva un aumento de la susceptibilidad a la oxidación de la carne. Así mismo, se ha revisado como la degradación de la fracción lipídica, se ve favorecida por los procesos de cocinado y almacenamiento de la carne. Por último, se ha evidenciado como esta oxidación puede ser prevenida mediante la suplementación con vitamina E, la cual permite a la vez, incrementar su depósito en la carne de pollo. No obstante, los diferentes trabajos en la bibliografía valoran en depósito total de vitamina E en la carne de pollo, sin diferenciar los diferentes estereoisómeros. Además, hay que señalar que en la revisión bibliográfica realizada no se han encontrado trabajos diseñados para valorar la interacción entre el grado de poliinsaturación y el nivel de vitamina E dietéticos sobre la calidad nutritiva de la carne de pollo. Así, los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- Establecer una relación entre el nivel de poliinsaturación dietética y el perfil lipídico de diferentes tejidos del pollo, valorando la responsabilidad de la síntesis endógena de los AG depositados en la carne de pollo.
- Establecer una relación entre el nivel dietético de α -Toc, así como el de sus estereoisómeros, y su depósito en los tejidos de los pollos.
- Estudiar la interacción entre el grado de poliinsaturación y el nivel de α -Toc dietéticos sobre el valor nutritivo (AG y α -Toc) y la estabilidad oxidativa de la carne de pollo.

Dentro de este objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar las modificaciones en el depósito de AG y α -Toc, así como sus estereoisómeros, en la carne de pollo en relación a diferentes dosis dietéticas de α -Toc y AGPI.
- Estudiar la persistencia del enriquecimiento en AGPI y α -Toc, y su implicación en la oxidación de la carne cruda, cocinada y durante la conservación en refrigeración de la misma.

- Establecer el nivel óptimo de suplementación dietética con α -Toc para prevenir la oxidación de la carne de pollo en función de su grado de poliinsaturación.
- Valorar si las diferentes estrategias para conseguir un gradiente de poliinsaturación dietético modifican el depósito de vitamina E en la carne de pollo.

Para alcanzar los objetivos se diseñaron dos experimentos, descritos en el capítulo 3, en base a niveles crecientes de AGPI y α -Toc dietéticos:

En la primera prueba el gradiente de poliinsaturación dietético se consiguió reemplazando una grasa saturada (sebo) por una mezcla de aceites poliinsaturados (linaza y pescado) suplementados a un nivel constante de 9%. Esta primera prueba permitió poner a punto las distintas técnicas analíticas utilizadas a lo largo de esta Tesis: análisis de AG mediante cuantificación, determinación del α -Toc y de sus correspondientes estereoisómeros y valoración de la oxidación lipídica secundaria.

Con el objetivo de valorar la responsabilidad de la síntesis endógena sobre los AG depositados en los diferentes tejidos, se planteó el segundo estudio. En esta segunda prueba el gradiente de poliinsaturación se consiguió mediante la adición de niveles crecientes de la fuente grasa poliinsaturada utilizada en la primera prueba (2, 4, 6 y 8%).

Capítulo 3

Material y Métodos

El genio empieza las obras
grandes, pero sólo el
trabajo las acaba.

Joseph Joubert

3.1. ANIMALES E INSTALACIONES

Para alcanzar los objetivos planteados se diseñaron dos estudios experimentales con pollos broiler. Ambos ensayos (separados 17 meses en el tiempo) se llevaron a cabo en la nave polivalente de las granjas experimentales de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. La sala consta de una batería de 3 pisos con un total de 48 jaulas.

Para la realización de cada estudio experimental se utilizaron 192 broilers hembras de la estirpe comercial Ross (Granja Solé, Vila-rodona, Tarragona en el primer estudio y de Terra-Avant, S.A., Anglés, Girona en el segundo). En los dos casos los animales fueron alojados en óptimas condiciones de temperatura, humedad y ventilación. Tanto el alimento como el agua se les administró *ad libitum*. Diariamente se realizaban controles de temperatura, ventilación, estado sanitario y posibles bajas.

En ambos experimentos, los animales fueron divididos aleatoriamente en 16 tratamientos compuestos de 3 réplicas de 4 animales para cada tratamiento. Las aves llegaron a las instalaciones con 1 día de edad y se mantuvieron en suelo hasta el inicio del experimento. El periodo experimental transcurrió de los 8 a los 44 días en el primer estudio, y de los 6 a los 40 días en el segundo estudio.

3.2. DIETAS

La elaboración de las dietas experimentales se llevó a cabo en la planta de fabricación de piensos del IRTA, en Mas Bové (Reus, Baix Camp). A continuación se detalla de forma individualizada la composición de las dietas de ambos estudios experimentales.

3.2.1. Estudio Experimental 1

Las dietas experimentales fueron formuladas siguiendo las recomendaciones del NRC (1994) a partir de una dieta a base de trigo, soja y cebada como ingredientes principales, a los que se añadió un 9% de grasa o aceite (**Tabla 3.1**). Los tratamientos experimentales resultaron de un diseño factorial 4 × 4. Los factores de variación fueron los siguientes:

- **Grado de Insaturación.**

El grado de insaturación se consiguió variando el **tipo de grasa añadida** a una proporción fija de 9%. El gradiente de insaturación se consiguió a través de la sustitución de **sebo**, como fuente de grasa saturada, por una mezcla de **aceite de linaza** (Cailà i Parés, Barcelona) y **pescado** (Agrupación de Fabricantes de Aceites Marinos, Vigo), como fuente de grasa insaturada, en distintas proporciones (**Tabla 3.2**). El gradiente de insaturación conseguido fue de **15, 34, 45 y 61 g AGPI/kg**.

- **Nivel de suplementación con acetato de α -tocoferol.**
 - No suplementado: **0 mg/kg.**
 - Suplementado con **100, 200 ó 400 mg/kg** de acetato de α -tocoferol (Rovimix® E-50 Adsorbate, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea, Suiza).

Tabla 3.1. Composición y análisis químico de las dietas del primer estudio¹.

Ingredientes	%	Análisis químico	%
Trigo	39,30	Materia Seca	90,78
Soja 48	34,09	Proteína Bruta	22,98
Cebada	13,39	Grasa Bruta	10,17
Grasa añadida	9,00	Fibra Bruta	3,47
Fosfato bicálcico	2,17	Cenizas	6,08
Carbonato cálcico	0,98	EM (kcal/kg) ³	3100
Sal	0,45		
Compuesto vitamínico-mineral ²	0,40		
DL-Metionina	0,28		
L-Lisina	0,04		

¹ Valores obtenidos de una media de 16 determinaciones.

² Compuesto vitamínico-mineral expresado por kilogramo de pienso: Vitamina A: 12000 UI; Vitamina D₃: 2400 UI; Vitamina K₃: 3 mg; Vitamina B₁: 2,2 mg; Vitamina B₂: 8 mg; Vitamina B₆: 5 mg; Vitamina B₁₂: 11 μ g; Ácido fólico: 1,5 mg; Biotina: 150 μ g; Pantotenato cálcico: 25 mg; Ácido nicotínico: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0,33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0,15 mg.

³ EM estimada.

Tabla 3.2. Niveles de inclusión (g/kg de pienso) de las diferentes fuentes de grasa añadida y grado de insaturación de las dietas de la primera prueba experimental (g AGPI/kg pienso).

Grado de Insaturación¹	Grasa añadida			Nivel de insaturación dietético
	Sebo	Aceite de Linaza	Aceite de pescado	
	g/kg pienso			g AGPI/kg
PU15	90	0	0	15
PU34	55	30	5	34
PU45	35	45	10	45
PU61	0	70	20	61

¹PU15: 15 g AGPI/kg; PU34: 34 g AGPI/kg; PU45: 45 g AGPI/kg; PU61: 61 g AGPI/kg.

Los 16 tratamientos experimentales resultantes de la combinación de estos 2 factores de variación se puede ver en la **Tabla 3.3.**

Tabla 3.3. Tratamientos experimentales del primer estudio.

Tratamiento	AGPI dietéticos (g/kg)	Acetato de α -Tocoferol suplementado (mg/kg)
PU15 + E0	15	0
PU15 + E1	15	100
PU15 + E2	15	200
PU15 + E4	15	400
PU34 + E0	34	0
PU34 + E1	34	100
PU34 + E2	34	200
PU34 + E4	34	400
PU45 + E0	45	0
PU45 + E1	45	100
PU45 + E2	45	200
PU45 + E4	45	400
PU61 + E0	61	0
PU61 + E1	61	100
PU61 + E2	61	200
PU61 + E4	61	400

3.2.2. Estudio Experimental 2

Las dietas experimentales fueron formuladas siguiendo las recomendaciones del NRC (1994) a partir de una dieta a base de maíz y soja como ingredientes principales, a los que se añadió una proporción variable de aceite (**Tabla 3.4**). Para conseguir dietas isoenergéticas se utilizó cáscara de almendra como diluyente, dado su escaso contenido en nutrientes no fibrosos (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.4. Composición y análisis químico de las dietas del segundo estudio.

Ingredientes	Nivel de aceite añadido			
	2%	4%	6%	8%
Maíz	58,49	52,68	46,86	41,02
Soja 48	35,49	36,42	37,34	38,24
Cascarilla de Almendra	0,00	2,92	5,84	8,76
Grasa añadida	2,00	4,00	6,00	8,00
Fosfato bicálcico	1,75	1,76	1,76	1,77
Carbonato cálcico	1,08	1,07	1,06	1,05
Sal	0,57	0,57	0,57	0,57
Compuesto vitamínico-mineral ¹	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina	0,18	0,19	0,19	0,20
L-Lisina	0,05	0,03	0,02	0,00

Análisis químico (%)

Materia Seca	88,26	89,08	89,42	90,28
Proteína Bruta	21,31	21,82	21,48	21,85
Grasa Bruta	4,45	6,30	8,40	9,91
Fibra Bruta	3,22	5,45	7,93	9,86
Cenizas	5,79	6,10	5,85	6,20
EM (kcal/kg) ²	3000	3003	3006	3007

¹Compuesto vitamínico-mineral expresado por kilogramo de pienso: Vitamina A: 12000 UI; Vitamina D₃: 2400 UI; Vitamina K₃: 3 mg; Vitamina B₁: 2,2 mg; Vitamina B₂: 8 mg; Vitamina B₆: 5 mg; Vitamina B₁₂: 11 µg; Ácido fólico: 1,5 mg; Biotina: 150 µg; Pantotenato cálcico: 25 mg; Ácido nicotínico: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0,33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0,15 mg.

² EM estimada.

Tabla 3.5. Composición química de la cáscara de almendra.

Composición	(%)
Materia Seca	91,32
Proteína Bruta	1,05
Grasa Bruta	0,32
Fibra Bruta	70,05
Cenizas	1,36

Los tratamientos experimentales resultaron de un diseño factorial 4 × 4. Los factores de variación fueron los siguientes:

- **Grado de Insaturación.**

El grado de insaturación se consiguió variando el **nivel de grasa añadida**. El gradiente de insaturación se consiguió a través de la incorporación creciente de una mezcla de **aceite de linaza** (Cailà i Parés, Barcelona) y **pescado** (Agrupación de Fabricantes de Aceites Marinos, Vigo) en una proporción 4:1, respectivamente (**Tabla 3.6**). La adición de niveles crecientes de grasa añadida de **2, 4, 6 y 8 %**, resultó en un gradiente de insaturación de **27, 38, 48 y 59 g AGPI/kg**.

- **Nivel de suplementación con acetato de α -tocoferol.**

- No suplementado: **0 mg/kg**.
- Suplementado con **100, 200 ó 400 mg/kg** de acetato de α -tocoferol (Rovimix® E-50 Adsorbate, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basilea, Suiza).

Los 16 tratamientos experimentales resultantes de la combinación de estos 2 factores de variación se puede ver en la **Tabla 3.7**.

En ambos estudios experimentales se tomaron muestras de los aceites antes de la fabricación del pienso, y de los piensos experimentales durante la fabricación y en diferentes momentos durante la realización de las pruebas experimentales. Las muestras se conservaron congeladas a -20°C hasta su análisis.

Tabla 3.6. Niveles de inclusión (g/kg de pienso) de las diferentes fuentes de grasa añadida y grado de insaturación de las dietas de la segunda prueba experimental (g AGPI/kg pienso).

Nivel de aceite añadido ¹	Grasa añadida		Nivel de insaturación dietético g AGPI/kg
	Aceite de Linaza	Aceite de pescado	
	g/kg pienso		
O2	16	4	27
O4	32	8	38
O6	48	12	48
O8	64	16	59

¹ O2: 2% aceite añadido; O4: 4% aceite añadido; O6: 6% aceite añadido; O8: 8% aceite añadido.

Tabla 3.7. Tratamientos experimentales del segundo estudio.

Tratamiento	AGPI dietéticos (g/kg)	Acetato de α -Tocoferol suplementado (mg/kg)
O2 + E0	27	0
O2 + E1	27	100
O2 + E2	27	200
O2 + E4	27	400
O4 + E0	38	0
O4 + E1	38	100
O4 + E2	38	200
O4 + E4	38	400
O6 + E0	48	0
O6 + E1	48	100
O6 + E2	48	200
O6 + E4	48	400
O8 + E0	59	0
O8 + E1	59	100
O8 + E2	59	200
O8 + E4	59	400

3.3. CONTROLES DE PRODUCCIÓN

A lo largo de los estudios experimentales se realizaron tres controles de consumo y peso de los animales: a los 8, 23 y 44 días en la primera prueba y a los 6, 26 y 40 días de vida en la segunda prueba experimental para determinar el consumo medio diario, la ganancia media diaria y el índice de conversión.

3.4. CONTROL DE RENDIMIENTOS

Al final de la prueba (44 días en la primera y 40 días en la segunda) la mitad de los animales fueron sacrificados en un matadero comercial (Gimave, S.A., Ripollet, Barcelona). Una vez sacrificados se procedió a la separación de los muslos, pechugas, hígados y grasa abdominal. Se pesó cada parte de forma individualizada para el cálculo de los rendimientos.

3.5. RECOGIDA DE MUESTRAS

3.5.1. Muestras crudas

Las muestras de muslos con piel y pechugas sin piel fueron deshuesadas y picadas durante 20 y 15 segundos, respectivamente, en un picadora Blixer 3 (Vincennes, Francia). Seguidamente la muestra homogénea de cada animal fue dividida en porciones de 30 g aproximadamente. Además, de cada animal sacrificado se obtuvo una muestra de hígado a la que se le extrajo la vesícula biliar.

Las muestras fueron empaquetadas, y en el caso de las muestras de muslo el empaquetado se llevó a cabo en presencia de oxígeno y en bolsas Cryovac® CN300 (Sant Boi de Llobregat, Barcelona). Una fracción de las muestras de muslos del primer estudio experimental, se mantuvieron en refrigeración (0-4°C) durante 3 días.

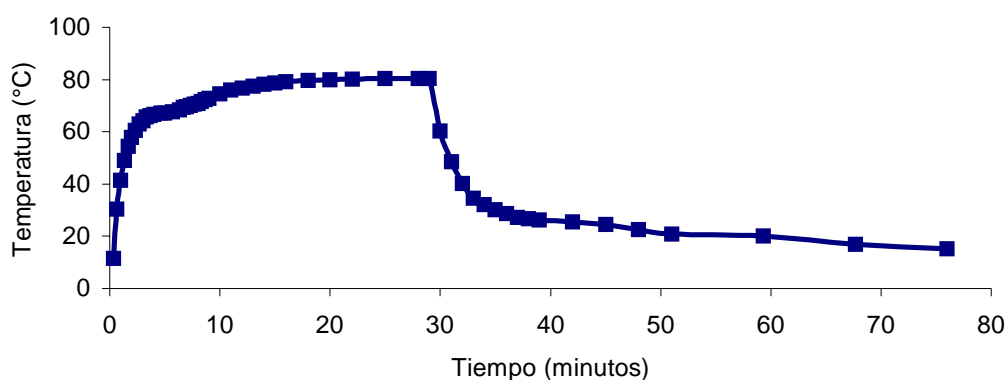
3.5.2. Muslos Cocidos

Una parte de las muestras de muslo fue sometida a un proceso de cocción. Este proceso se llevó a cabo en un baño con agitación a 80°C (Unitronic 320 OR, J.P. Selecta S.A., Abrera, Barcelona). El baño se tapó para conseguir que toda la muestra estuviera sumergida en el agua. Las muestras se mantuvieron a 80°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se introdujeron durante 15 minutos en un baño de hielo, y seguidamente se dejaron en una cámara frigorífica (0-4°C) hasta su total enfriamiento.

La temperatura interna de cocción se controló mediante una sonda situada en el centro de una muestra control. La curva de cocción se detalla en la **Figura 3.1**.

Una vez cocidas, las muestras fueron destinadas a las determinaciones analíticas en muslo cocido. Únicamente en el primer estudio, una parte de las muestras cocidas se mantuvieron en refrigeración (0-4°C) durante 2 meses.

Figura 3.1. Curva de la temperatura de cocción de las muestras de muslo en función del tiempo.



3.5.3. Conservación de las muestras

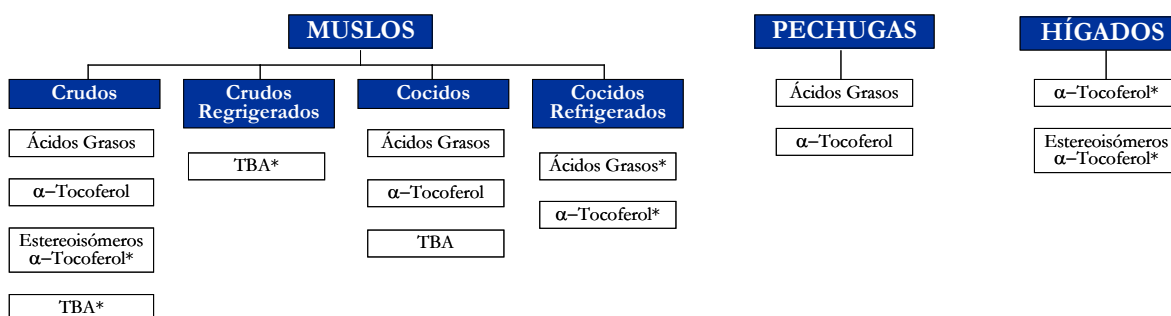
Una porción de las muestras empaquetadas de muslo crudo, refrigerado, cocido y cocido refrigerado del primer estudio y de muslo cocido del segundo estudio fue conservada en congelación a -80°C para la determinación de los valores de oxidación (TBA). La determinación de TBA se llevó a cabo durante los 3 meses posteriores a la obtención de las muestras. El resto de las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su análisis posterior. Previamente a las determinaciones analíticas del contenido de ácidos grasos y α -Toc las muestras fueron liofilizadas y molidas.

3.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

La mayoría de las determinaciones analíticas de las pruebas experimentales se llevaron a cabo en los laboratorios de Nutrició i Alimentació Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona. El contenido de α -Toc de las muestras del primer estudio y la determinación de los estereoisómeros (ST) del α -Toc fue realizada en el Department of Animal Nutrition and Physiology en el Research Centre Foulum en Dinamarca.

De las muestras de pienso recogidas a lo largo de las pruebas experimentales se realizó el Análisis de Weende (AOAC, 1990) y la energía bruta. En el resto de las muestras se determinó el contenido de la materia seca (Journal Official des Communités Européenes L279/9).

Figura 3.2. Diseño de la recogida de muestras y determinaciones analíticas realizadas.



*Determinaciones analíticas únicamente realizadas en el primer estudio experimental.

El resto de las determinaciones analíticas que se llevaron a cabo en muslos, pechugas e hígados se resumen en la **Figura 3.2**. Las determinaciones de los ácidos grasos y α -Toc en muslo, pechuga e hígado, así como de la oxidación en muslos se llevaron a cabo en 6 muestras por tratamiento (n=96). En el caso de la determinación del perfil de estereoisómeros, ésta se llevó a cabo únicamente en 8 tratamientos (n=48). La

determinación del contenido de ácidos grasos y α -Toc del pienso se realizó en una muestra por tratamiento (n=16).

3.6.1. Determinaciones analíticas de los aceites

En las grasas y los aceites utilizados en ambos estudios se llevaron a cabo las determinaciones de calidad rutinarias y que incluyen las determinaciones de humedad, impurezas, insaponificables, acidez e índice de peróxidos (**Tabla 3.8**), así como del perfil de ácidos grasos y del contenido en α -Toc (**Tabla 3.9**).

Tabla 3.8. Determinaciones analíticas de las grasas y aceites utilizados en las pruebas experimentales.

		Humedad (%)	Impurezas (%)	Insaponificable (%)	Acidez (g oleico/100g)	I.Peróxidos (mEq O ₂ /kg)
1ª Prueba	Sebo	0,05	0,09	0,25	0,31	3,40
	Aceite Linaza	ND	ND	0,57	0,28	4,14
	Aceite Pescado	ND	ND	0,54	0,32	4,51
2ª Prueba	Aceite Linaza	0,06	0,45	0,50	1,78	6,12
	Aceite	ND	0,26	0,90	3,74	23,58
	Pescado					

ND: No detectado.

3.6.2. Contenido de Ácidos Grasos

La determinación de los AG se basa en derivatizar los mismos a sus metil ésteres para que el cromatógrafo de gases sea capaz de detectarlos. Las técnicas habituales constan de dos pasos diferenciados: la extracción de lípidos de la muestra y la posterior transesterificación. Este procedimiento emplea grandes volúmenes de reactivos tóxicos, y además dificulta el uso de patrones internos para la cuantificación, dada la elevada cantidad de patrón necesaria al trabajar con cantidades elevadas de muestra.

En este caso, para la cuantificación de los AG utilizamos una técnica de transesterificación directa. Esta técnica extrae los lípidos y los metila en un único paso. Concretamente se utilizaron las técnicas descritas por Sukhija y Palmquist (1988) para pienso y por Carrapiso et al. (2000) para los muslos, pechugas e hígados. En resumen, la transesterificación directa se realiza con ácido clorhídrico metanólico a 70°C, y se utiliza tolueno para disolver la fase lipídica.

Tabla 3.9. Composición en ácidos grasos (expresados como normalización directa de área, % sobre grasa total) y α -tocoferol (expresado como mg/kg) de los aceites utilizados.

	Primera Prueba			Segunda Prueba	
	Sebo	Linaza	Pescado	Linaza	Pescado
AGS	46,78	8,88	39,91	9,21	36,72
C14:0	3,08	0,04	8,33	0,05	8,61
C15:0	0,45	ND	0,36	0,02	0,58
C16:0	25,18	5,27	19,49	5,49	20,99
C17:0	1,24	0,07	1,87	0,07	0,44
C18:0	16,65	3,25	6,69	3,39	3,78
C20:0	0,14	0,13	2,48	0,18	0,29
AGMI	48,47	18,31	27,30	18,68	25,80
C16:1 ω 7t	0,16	0,01	0,24	0,03	0,27
C16:1 ω 7	2,68	0,09	8,37	0,07	11,47
C18:1 ω 9	44,76	17,02	13,99	17,88	8,97
C18:1 ω 7	0,20	0,88	2,90	0,68	3,84
C20:1 ω 9	0,23	0,14	0,55	ND	0,20
C21:1 ω 9	ND	0,14	0,80	ND	0,35
C24:1 ω 9	ND	0,02	0,19	0,02	0,48
AGPI	4,75	72,81	32,79	72,11	37,48
C18:2 ω 6	2,99	14,98	0,81	14,90	0,08
C18:3 ω 3	0,36	56,38	0,49	56,79	1,22
C20:2 ω 6	0,07	0,05	0,29	ND	0,23
C20:3 ω 3	0,05	0,05	0,09	ND	ND
C20:4 ω 6	0,08	ND	0,90	ND	0,18
C20:5 ω 3	0,04	0,34	20,26	0,13	25,17
C22:4 ω 6	0,02	0,07	0,14	0,10	0,11
C22:6 ω 3	0,11	0,10	7,28	0,18	9,32
α-Tocoferol	ND	10,7	18,7	10,6	40,5

AGS: Ácidos grasos saturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.
ND: No detectado.

Durante la puesta a punto de esta técnica, se añadieron los AG C₁₉ y C₂₁ como patrones internos. Dado que el AG C₂₁ era más difícil de aislar debido a su proximidad con otros AG, y a que el coeficiente de respuesta era similar para ambos AG, únicamente se utilizó el C₁₉ para la cuantificación.

Las muestras fueron pinchadas en un cromatógrafo de gases HP6890 (Agilent, Waldbronn, Alemania) del Servei d'Anàlisi Química de la UAB. Las condiciones del

método fueron:

- Columna capilar: Hewlett Packard HP-23 (cis/trans FAME column) 60 m × 0,25 mm diámetro interno con un grosor de capa de fase estacionaria de 0,25 µm (USA).
- Gas portador: Helio.
- Flujo: 1,3 mL/min.
- Detector: ionización de llama (FID).
- Programa de temperaturas del horno:
 - De 140°C a 160°C a 1,50°C/min.
 - De 160°C a 180°C a 0,50°C/min.
 - De 180°C a 230°C a 2,50°C/min.
- Temperatura del inyector y del detector: 280°C.
- Volumen inyectado: 1 µL.

Las áreas de los picos fueron integradas y convertidas a concentraciones por comparación con el área del patrón interno:

Concentración $AG_x = (\text{Área } AG_x / \text{Área } C_{19}) \times (\mu\text{g } C_{19} / (\text{CR} \times \text{Peso muestra}))$,
donde CR es el coeficiente de respuesta.

La identificación de los AG se realizó mediante la comparación entre el tiempo de retención y los estándares, así como por espectrometría de masas HP5973 (Agilent, Waldbronn, Alemania) de cada pico.

3.6.3. Contenido de α -Tocoferol

El α -Toc presente en las muestras de pienso, muslo, pechuga e hígado se analizó mediante la metodología descrita por Jensen et al. (1999), con algunas modificaciones. En el primer estudio, se pesaron 100 mg de muestra de muslo, pechuga o hígado, previamente liofilizada y homogeneizada, en un tubo rosca de 10 mL, al que se añadieron 2,0 mL de etanol, 0,5 mL de metanol, 1,0 mL de ácido ascórbico (20%), 0,3 mL de una solución de hidróxido potásico en agua (1:1 w/w). Después de agitar los tubos en el vórtex durante 10 segundos, las muestras fueron saponificadas en un baño con agitación a 70°C durante 20 minutos. Seguidamente fueron enfriadas en un baño con agua fría durante 20 minutos. Todo el proceso se realizó en oscuridad. Una vez los tubos fueron enfriados, se añadieron 5 mL de heptano a los tubos y se agitaron en el vórtex durante 30 segundos. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 g. La fase superior orgánica fue transferida a un tubo de rosca de 10 mL, y la fase acuosa restante se reextrajo con otros 5 mL de heptano. Una vez agitada y centrifugada de nuevo, la fase orgánica se transfirió al tubo que contenía la anterior. La solución resultante se inyectó directamente en el HPLC.

Las muestras de pienso se analizaron de igual forma pero utilizando mayores volúmenes de solventes. Así, se pesaron 2 g de muestra en un matraz de 250 mL al que se añadieron 70 mL de etanol, 30 mL de metanol, 30 mL de ácido ascórbico (20%) y 20 mL de la solución de hidróxido potásico en agua (1:1 w/w). Una vez saponificadas las muestras, se transfirieron 2,0 mL de la mezcla saponificada a un tubo de 10 mL que contenía 1,0 mL de agua destilada. Al igual que las muestras de tejidos, el α -tocoferol fue extraído con un total de 10 mL de heptano en dos fases.

En las muestras del segundo estudio, la extracción del α -Toc se realizó de igual forma que en el primer estudio, con la única diferencia que se incorporó BHT para evitar la oxidación del α -Toc. El BHT fue introducido en un 0,02 % (w/v) diluido en el metanol. Esta modificación redujo la oxidación del α -Toc, observándose una mejora en la recuperación del método.

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las descritas por Jensen et al. (1999):

- Columna: Perkin Elmer HS-5-Silica, 125 × 4 mm diámetro interno (Perkin-Elmer, Überlingen, Alemania).
- Eluyente: heptano modificado con 0,5% de 2-propanol isocrático.
- Flujo: 1,3 mL/min.
- Detector: fluorescencia, a una λ de excitación de 290 nm y de emisión de 327 nm.
- Volumen inyectado: 100 μ L.

La identificación del α -Toc se realizó mediante la comparación entre el tiempo de retención y el estándar.

Los resultados del contenido de α -Toc de los muslos cocidos y cocidos-refrigerados fueron desestimados debido a que la técnica utilizada no extraía eficazmente el contenido de α -Toc de estas muestras y el problema tampoco puede ser resuelto con la determinación de la recuperación del α -Toc en este tipo de muestras.

3.6.4. Perfil de Estereoisómeros del α -tocoferol

El análisis del perfil de ST del α -Toc se realizó según el método descrito por Drotleff y Ternes (2001) con algunas modificaciones, y una vez conocido el contenido de α -Toc de las muestras. Se necesitaron 10 μ g de α -Toc que se consiguieron extrayendo el α -Toc según el método descrito anteriormente por Jensen et al. (1999) de una cantidad de muestra variable entre 50 y 200 mg de muslo e hígado, previamente liofilizados, ó 2 g de

pienso.

La solución conteniendo aproximadamente 10 µg de α -Toc en 10 mL heptano fue evaporada totalmente con nitrógeno. Entonces el α -Toc fue derivatizado a sus metil ésteres, para ello se añadieron 50 µL de dimetil éter de etilenglicol. Durante todo el proceso, la solución se mantuvo en constante agitación. Seguidamente se añadieron gota a gota 25 µL de una solución de hidróxido de potasio (100 mL de agua más 60 g de hidróxido potásico). Al tubo se le introdujo nitrógeno para desplazar el oxígeno y se le añadieron 30 µL de dimetil sulfato. Entonces el tubo fue cerrado y se mantuvo 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadieron nuevamente 15 µL de dimetil sulfato y se mantuvo 2 horas a temperatura ambiente. La solución fue evaporada con nitrógeno y se le añadieron 100 µL de agua destilada. Los ésteres metílicos derivatizados fueron extraídos con 500 µL de heptano y la fase superior heptánica fue transferida a un vial. La fase acuosa restante se reextrajo con otros 500 µL de heptano, fue agitada y centrifugada de nuevo y la fase orgánica se transfirió al vial que contenía la anterior. La solución resultante se inyectó directamente en el HPLC.

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las descritas por Drotleff y Ternes (2001):

- Columna: Chiralcel OD-H, 250 × 4,6 mm diámetro, con tamaño de partícula de 5 µm interno rellena de celulosa adsorbente derivatizada con 3,5-demetil fenil carbamato (Daicel Chemical industries, Ltd.,Tokyo, Japan).
- Eluente: heptano/2-propanol (99,95:0,05 v/v) isocrático.
- Flujo: 1,0 mL/min.
- Detector: fluorescencia a una λ de excitación de 295 nm y de emisión de 330 nm.
- Volumen inyectado: 20 µL.

3.6.5. Test del Ácido Tiobarbitúrico

La determinación de la oxidación en las muestras de muslo se determinó mediante el test del ácido tiobarbitúrico, según método descrito por Grau et al. (2000a).

Para la determinación del contenido de MDA se pesaron 1,50 g de muslo crudo, refrigerado, cocido ó cocido-refrigerado en un tubo de rosca de 50 mL, e inmediatamente se añadieron 1 mL de solución acuosa de EDTA 0,3% y 5 mL de BHT 0,8% en hexano. Justo antes de homogeneizar, se añadieron 8 mL de ácido tricloroacético 5% (TCA). Después de homogeneizar durante 30 segundos, y centrifugar durante 5 minutos a 1400 g, se descartó la fase superior hexánica y se filtró la fase inferior a través de un filtro Whatman nº 1, enrasando el filtrado a 10 mL con TCA. Se transfirieron 3 mL del filtrado a tubos de 10 mL a los cuales se les añadieron 2 mL de TBA 0,8% y, tras agitarlos, se incubaron durante 30 minutos a 70°C. Una vez finalizada la incubación, la reacción se detuvo con un baño de hielo durante 7 minutos, y después se mantuvieron las muestras 45 minutos a temperatura ambiente hasta la lectura del espectro de 650 a 400 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

El espectro se procesó con el programa UV-35 de Shimadzu para obtener el valor de la tercera derivada a una longitud de onda aproximada de 521 nm. Esta metodología incrementa la sensibilidad y la especificidad para medir la oxidación lipídica, debido al procesado del espectro que reduce las interferencias debidas a otros compuestos que se producen en los métodos convencionales del TBA.

El cálculo del contenido de MDA se obtuvo a través de la transformación de la altura del pico de la tercera derivada utilizando una curva de calibrado con tetraetoxipropano, siguiendo el mismo procedimiento que para las muestra experimentales. Los resultados se expresan en µg MDA/kg de muestra.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación se detalla el análisis estadístico realizado en la presente memoria de Tesis. En todos los casos los valores de $P \leq 0,05$ se consideraron significantes, y las interacciones superiores a dos no fueron consideradas en el análisis estadístico. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS (SAS[®] Institute, 2000).

3.7.1. Análisis de la varianza

Se realizó un análisis de la varianza con medidas repetidas, con la variable jaula como factor aleatorio, para determinar si los diferentes factores dietéticos (contenido de AGPI o nivel de grasa añadida y suplementación con α -TA) afectaron a los distintos

parámetros estudiados (contenido de AG y α -Toc, perfil de AG y ST del α -Toc, y estabilidad oxidativa del muslo y pechuga). También se realizó un análisis de la varianza para determinar si el cocinado de los muslos afectó a su contenido de AG.

Al valorar el efecto de los diferentes factores dietéticos y el procesado (crudo, crudo refrigerado, cocido y cocido refrigerado) del muslo de pollo sobre los valores de TBA del mismo, se tuvo en cuenta que la muestra de un mismo animal se sometió a los cuatro tipos de tratamiento térmico. Así, se utilizó la variable animal para realizar el análisis de medidas repetidas.

En el análisis de la varianza del perfil de ST del α -Toc del hígado y muslo no se observaron diferencias significativas entre los pollos que consumieron 100, 200 y 400 mg α -TA/kg. Por ello, los datos se agruparon para determinar si la fuente dietética de α -Toc (natural o sintética) y el contenido de AGPI de la dieta afectaron al perfil de ST de ambos tejidos

En todos los casos, los datos fueron analizados a través del procedimiento MIXED del SAS. Las diferencias fueron valoradas usando la corrección de Tukey para comparaciones múltiples.

3.7.2. U de Mann-Whitney

El test de la U de Mann-Whitney se usó para determinar si las recuperaciones del α -Toc del muslo y la pechuga fueron afectadas por el nivel de adición de α -Toc. Al no resultar afectadas, los resultados para ambos niveles de adición de α -Toc se agruparon y se sometieron a un análisis de la varianza, para valorar si el grado de poliinsaturación dietético afectó a dichas recuperaciones

3.7.3. Regresiones lineales

La evolución de las diferentes familias de AG y del contenido de α -Toc en función del contenido dietético y/o tisular en α -Toc y/o AGPI, así como la evolución de la oxidación lipídica de la carne cocida en función del contenido de AGPI del muslo crudo de pollo fueron ajustadas mediante un análisis de regresión lineal del tipo $y = a + bx$. Cuando se necesitó la comparación de varias ecuaciones, se realizó a través del procedimiento GLM del SAS.

3.7.4. Regresiones no lineales con 2 variables

Dado que el origen de los AGPI en los tejidos de las aves es exclusivamente dietético, la evolución del contenido de AGPI en el muslo y pechuga, en función de su contenido en la dieta o de la cantidad de grasa poliinsaturada añadida, fue ajustada mediante una ecuación exponencial del tipo $y = a - a e^{-bx}$, donde a es el máximo nivel de AG que se puede alcanzar en el tejido y b es la tasa fraccional de incremento.

De forma similar, la relación entre los valores de TBA del muslo cocido y el contenido de α -Toc del muslo crudo fue ajustada a una ecuación exponencial del tipo $y = a + b e^{-cx}$, donde a y $a+b$ son el mínimo y el máximo valor de TBA que se puede alcanzar en el muslo cocido y c es la tasa fraccional de reducción.

En ambos casos, el ajuste fue realizado mediante del procedimiento NLIN del SAS[®]. Las ecuaciones no lineales para los predecir el contenido de AGPI en ambos tejidos, muslo y pechuga, fueron comparadas entre sí mediante el likelihood ratio test.

3.7.5. Regresiones no lineales con 3 variables

La relación entre el contenido de α -Toc del muslo y la pechuga y los diferentes factores dietéticos (contenido de AGPI o nivel de grasa añadida y contenido de α -Toc), fue ajustada a una ecuación no lineal del tipo $y = x_1(a - b x_2)$, donde y es la concentración de α -Toc en los tejidos estudiados, x_1 es el contenido de α -Toc de la dieta y x_2 es el contenido de AGPI o nivel de grasa añadida a la dieta.

De igual forma, la relación entre los valores de TBA en el muslo cocido y ambos, contenido de α -Toc y AGPI de la dieta o del tejido, fue ajustada a una ecuación exponencial con 3 variables del tipo $y = x_1(a + b e^{-cx_2})$, donde y es el valor de TBA del muslo cocido, x_1 y x_2 es el contenido de α -Toc y de AGPI, respectivamente.

El ajuste se realizó mediante el procedimiento NLIN del SAS. Las ecuaciones resultantes fueron representadas mediante el programa SigmaPlot 8.02 (2002).

El talento no tiene servir
para saberlo y decirlo todo,
sino para saber lo que se
tiene que decir de lo que se
sabe.

Mariano José de Larra

Capítulo 4

Influencia del Nivel Dietético de Poliinsaturación y Vitamina E sobre la Calidad de la Carne de Pollo: Contenido de Ácidos Grasos

4. Influence of Dietary Polyunsaturation Level on Chicken Meat Quality: Fatty Acid Content

4.1. Summary

One hundred and ninety-two female broiler chickens were randomly distributed into 16 experimental treatments. The combination of 4 levels of dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA: 15, 34, 45, and 61g/kg) and 4 levels of supplementation with α -TA (0, 100, 200, and 400mg/kg) was arranged in order to determine the modification of the amount and type of fatty acids (FA) deposited in raw and cooked chicken tissues. At 44 days, quantified FA of thighs and breasts were not affected by the dietary supplementation with α -tocopheryl acetate. Total FA content of breast was less than 15% of the total FA content of thigh. However, increasing PUFA content of the diet by 46 g, from 15 to 61 g/kg, decreased total FA of thigh 17 %, but did not affect FA content in breast meat. Monounsaturated FA (MUFA) and saturated FA (SFA) content of thigh (y) decreased linearly as the inclusion of dietary PUFA (x) increased (MUFA: $y = 89.34 - 0.92x$, $R^2 = 0.70$; SFA: $y = 53.81 - 0.43x$, $R^2 = 0.57$), whereas the relationship between PUFA content of feed (x) and thighs (y) was exponential ($y = 92.03 - 92.03e^{(-0.0155x)}$, $R^2 = 0.75$). A similar response was observed in breast with less variation and more incorporation of PUFA than thigh. Cooking of thigh meat led to a reduction in total FA content that affected SFA, MUFA, and PUFA in a similar proportion.

4.2. Results and Discussion

4.2.1. Diet Composition

The FA composition of the experimental diets is shown in **Table 4.1**. The greatest differences among treatments were for the content of PUFA. Increasing the polyunsaturation level of diets, and at the same time keeping the total FA content constant, was achieved by reducing its SFA and MUFA. Thus, dietary PUFA to SFA ratio (PUFA:SFA) increased with the dietary polyunsaturation level.

Table 4.1. Fatty acid composition of the experimental diets, expressed as g per kg¹.

Fatty Acid ³	Polyunsaturation level ²			
	PU15	PU34	PU45	PU61
Total FA	100.45	98.81	99.57	96.89
Total SFA	43.75	32.38	26.22	15.74
C 10:0	0.05	0.03	0.02	0.00
C 14:0	2.72	2.01	1.79	1.45
C 15:0	0.44	0.30	0.23	0.11
C 16:0	23.80	18.15	15.25	10.31
C 17:0	1.19	0.77	0.53	0.14
C 18:0	14.64	10.23	7.68	3.33
C 20:0	0.12	0.16	0.17	0.17
Total MUFA	41.30	32.55	28.32	20.31
C 16:1 ω7t	0.20	0.15	0.12	0.07
C 16:1 ω7	2.25	1.73	1.65	1.52
C 18:1 ω9 ⁴	35.62	27.76	23.59	15.69
C 18:1 ω7t	1.60	1.37	1.29	1.12
C 20:1 ω9	0.28	0.29	0.31	0.35
C 24:1 ω9	0.09	0.46	0.81	1.46
Total PUFA	15.40	33.77	45.03	60.84
C 18:2 ω6	13.16	16.23	17.98	20.17
C 18:3 ω3	1.55	16.45	24.62	36.27
C 18:4 ω3	0.27	0.11	0.23	0.43
C 20:4 ω6	ND	ND	0.13	0.19
C 20:5 ω3	ND	0.81	1.77	3.35
C 22:6 ω3	ND	0.07	0.18	0.33
PUFA:SFA	0.35	1.04	1.72	3.87

¹ Values given in this table are means of 4 dietary treatments with different level of supplementation with α-tocopheryl acetate: 0, 100, 200 and 400 mg/kg.

² PU15: 15g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61g polyunsaturated fatty acids /kg of feed.

³ FA: fatty acids; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

⁴ C 18:1 ω9 includes sum of *cis* and *trans* forms.

ND: Not detected.

Supplementation with 100, 200 and 400 mg α -TA/kg of feed resulted in dietary levels of α -Toc that matched the amounts added. Thus, α -Toc content of diets were 6 ± 0.6 g/kg, 136 ± 1.5 g/kg, 236 ± 14.5 g/kg, and 451 ± 18.1 g/kg for E0, E1, E2 and E4 treatments, respectively.

4.2.2. Productive Parameters

Neither source of dietary α -Toc nor different levels of dietary supplementation with α -TA had significant effect on performances (data not shown). The average daily feed intake decreased as level of dietary polyunsaturation increased (111.7, 108.8, 105.0 and 104.6 g/bird/day for PU15, PU34, PU45 and PU61 treatments, $P \leq 0.05$). There were no differences in the daily weight gain (60.1 g/bird/day) between the more and the least saturated diets, thus the feed efficiency was higher in the animals fed the more saturated diet (1.87 vs. 1.75 g:g $P \leq 0.05$). The reduction in the voluntary intake with the inclusion of polyunsaturated fats has been observed in poultry by other authors (Atteh and Leeson, 1985; Scaife et al., 1994) and can be attributed to the better intestinal uptake of PUFA.

4.2.3. Effect of Dietary α -Tocopherol Acetate

Body weight ($2,340 \pm 54.4$ g), dressing percentage ($82 \pm 0.5\%$), and thigh (481 ± 13.9 g), and breast (377 ± 15.9 g) weights at 44 d of age were not affected by the dietary supplementation with different levels of α -TA. Similarly, the FA content of both thigh and breast were not modified by α -TA level (**Tables 4.2 and 4.3**). The effect of α -TA supplementation on FA composition of chicken tissues is rather controversial. In most reports, results are expressed as percentages (area normalization), which make comparisons difficult. Some authors observed a higher proportion of some long chain ω 3 PUFA in thighs (Ahn et al., 1995; Surai and Sparks, 2000) and breasts (Ajuyah et al., 1993a; Cherian et al., 1996; Nam et al., 1997; Zanini et al., 2003a), as well as testes, heart, and cerebellum (Surai and Sparks, 2000) when chicken diets were supplemented with tocopherols. This may be because α -Toc protects PUFA from oxidation, avoiding their loss. Furthermore, α -Toc promotes FA synthesis because α -Toc quinone, a product of tocopherol metabolism, has been suggested as an essential enzyme cofactor for the FA desaturases (Infante, 1999). Other authors have reported a lower proportion of some ω 3 PUFA such as LNA, in thighs when α -TA was added to the diet (Nam et al., 1997). Although it has been suggested that there may be an interference in the intestinal absorption between PUFA and α -Toc (Gallo-Torres et al., 1971), recent studies have shown that α -Toc does not interfere with intestinal absorption of PUFA (Tijburg et al., 1997; Villaverde et al., 2004). Some authors have also found no variation in FA composition of chicken thighs when broiler diets were supplemented with tocopherols (Lin et al., 1989a; Ajuyah et al.,

1993a; Cherian et al., 1996; O'Neill et al., 1998a; Bou et al., 2004). In the present study, FA were quantified with the aid of an internal standard, in order to avoid the inaccuracy associated with area normalization and no differences were found on FA content of thighs (60.0 vs. 53.9 g PUFA/kg of thigh for treatments PU61 supplemented with 0 and 400 mg α -TA/kg of feed, respectively, $P \geq 0.05$) and breast (7.5 vs. 8.0 g PUFA/kg of breast for treatments PU61 supplemented with 0 and 400 mg α -TA/kg of feed, respectively, $P \geq 0.05$) depending on the level of supplementation with α -TA. Using this methodology, it was concluded that the effect of supplementing broiler diets with α -TA up to 400 mg/kg of feed did not have any effect on thigh and breast muscle FA content.

4.2.4. Effect of Dietary Polyunsaturation

Body weight, dressing percentage, and thigh and breast weights at 44 d of age were not modified by dietary polyunsaturation level. However, when thigh weight was expressed as percentage of the carcass, it showed a tendency to increase as dietary polyunsaturation increased (PU15: 24.7, PU34: 24.6, PU45: 25.2, and PU61: 25.4 g thigh/100 g carcass, $P = 0.076$). A similar difference in thigh proportion was reported by López-Ferrer et al. (1999b, 2001) who observed increases of 2.7 and 2.3 % in thigh proportion when rapeseed oil or tallow were replaced by fish oil, respectively. Other authors did not find any differences in thigh proportion between chickens fed tallow or different vegetable oils, with a lower content of very long chain ω 3 PUFA (Olomu and Baracos, 1991; Crespo and Esteve-García, 2001).

Total FA content in thigh meat, which included subcutaneous fat, reduced as the dietary polyunsaturation level increased (from 141.2 g/kg to 116.8g/kg, in PU15 and PU61 treatments, respectively, $P \leq 0.05$) (Table 4.2). These results agree with others showing that separable fat depots (Crespo and Esteve-García, 2002a) and, specially abdominal fat (Vilà and Esteve-García, 1996; Sanz et al., 1999a; Crespo and Esteve-García, 2001,2002a,b,c; Villaverde et al., 2003a), are reduced with the addition of unsaturated oils to the diets. It appears that fat deposits (subcutaneous and abdominal) may easily be influenced by the polyunsaturation level of the diet. The mechanism by which dietary polyunsaturation modifies body fat deposition is not completely understood. Some authors have suggested that the lower fat deposition in broilers fed polyunsaturated fats compared with those fed saturated fats was, in part, explained by an increased rate of lipid catabolism and by a decrease of FA synthesis (Sanz et al, 2000b). Similarly, other authors reported significantly lower metabolic oxidation of lipids and consequently a lower thermogenesis in tissues of rats fed saturated fats than in rats fed unsaturated fats (Shimomura et al., 1990; Wilson et al., 1990). Nevertheless, additional research is needed on why body fat deposition is reduced as dietary polyunsaturation increases.

Table 4.2. Effect of dietary polyunsaturation and α -tocopheryl acetate (α -TA) supplementation on the fatty acid content of thighs with skin, expressed as g/kg¹.

Fatty Acid ³	Polyunsaturation level ²				Significance			SE
	PU15	PU34	PU45	PU61	PUFA	α -TA	PUFA \times α -TA	
Total FA	141.22 ^a	132.74 ^{ab}	132.48 ^{ab}	116.80 ^b	*	NS	NS	4.932
Total SFA	46.79 ^a	38.95 ^b	35.68 ^b	27.12 ^c	***	NS	NS	1.559
C 10:0	0.03	0.02	0.02	0.02	NS	NS	NS	0.002
C 12:0	0.07 ^a	0.06 ^b	0.05 ^b	0.04 ^c	***	NS	NS	0.002
C 14:0	2.93 ^a	2.14 ^b	1.93 ^b	1.51 ^c	***	NS	NS	0.075
C 15:0	0.46 ^a	0.35 ^b	0.30 ^c	0.19 ^d	***	NS	NS	0.012
C 16:0	29.97 ^a	24.73 ^b	23.00 ^b	17.29 ^c	***	NS	NS	1.038
C 17:0	0.93 ^a	0.75 ^b	0.61 ^c	0.31 ^d	***	NS	NS	0.028
C 18:0	11.22 ^a	10.19 ^{ab}	9.23 ^b	7.33 ^c	***	NS	NS	0.430
C 20:0	0.16 ^a	0.09 ^b	0.09 ^b	0.09 ^b	***	*	NS	0.008
Total MUFA	76.37 ^a	55.29 ^b	49.21 ^b	34.04 ^c	***	NS	NS	2.254
C 14:1 ω 5	0.69 ^a	0.42 ^b	0.33 ^c	0.14 ^d	***	NS	*	0.020
C 16:1 ω 7t	0.90 ^a	0.67 ^b	0.62 ^b	0.44 ^c	***	NS	NS	0.026
C 16:1 ω 7	6.41 ^a	4.78 ^b	4.39 ^b	3.27 ^c	***	NS	*	0.233
C 18:1 ω 9 ⁴	61.39 ^a	43.73 ^b	39.19 ^b	26.56 ^c	***	NS	NS	1.859
C 18:1 ω 7t	3.55 ^a	2.19 ^b	2.06 ^b	1.64 ^c	***	NS	NS	0.108
C 20:1 ω 9	0.52 ^a	0.35 ^b	0.33 ^b	0.31 ^b	***	NS	NS	0.015
C 24:1 ω 9	0.18 ^d	0.83 ^c	1.00 ^b	1.17 ^a	***	NS	NS	0.043
Total PUFA	17.91 ^a	38.54 ^b	47.70 ^c	55.66 ^d	***	NS	NS	2.212
C 18:2tt	0.20 ^a	0.14 ^b	0.12 ^b	0.05 ^c	***	NS	NS	0.009
C 18:2 ω 6	13.72 ^c	17.00 ^b	18.41 ^{ab}	19.09 ^a	***	NS	NS	0.560
C 18:3 ω 3	1.97 ^d	18.19 ^c	25.25 ^b	31.43 ^a	***	NS	NS	1.580
C 18:4 ω 3	0.50 ^a	0.30 ^b	0.19 ^c	0.48 ^a	***	NS	NS	0.027
C 20:2 ω 6	0.12	0.12	0.12	0.12	NS	NS	NS	0.007
C 20:3 ω 6	0.16	0.15	0.15	0.15	NS	NS	NS	0.005
C 20:4 ω 6	0.75 ^a	0.58 ^b	0.52 ^b	0.51 ^b	***	NS	NS	0.018
C 20:5 ω 3	0.07 ^d	1.06 ^c	1.69 ^b	2.39 ^a	***	NS	NS	0.129
C 22:4 ω 6	0.06 ^a	0.01 ^b	0.03 ^{ab}	0.06 ^{ab}	*	NS	NS	0.011
C 22:6 ω 3	0.17 ^d	0.73 ^c	0.92 ^b	1.13 ^a	***	NS	NS	0.046
PUFA:SFA	0.39 ^d	1.01 ^c	1.34 ^b	2.09 ^a	***	NS	NS	0.072

¹ Values given in this table are means of four dietary treatments with different level of supplementation with α -TA (0, 100, 200 and 400 mg/kg) and correspond to least-squares means obtained from ANOVA (n= 24) and their pooled SE.

² PU15: 15g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61g polyunsaturated fatty acids /kg of feed.

³ FA: fatty acids; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

⁴ C 18:1 ω 9 includes sum of *cis* and *trans* forms.

^{a,b,c,d} Values in the same row with no common superscripts are significantly different.

* = significant effect at $P \leq 0.05$; *** = $P \leq 0.001$.

Table 4.3. Effect of dietary polyunsaturation and α -tocopheryl acetate (α -TA) supplementation on the fatty acid content of breasts without skin, expressed as g/kg¹.

Fatty Acid ³	Polyunsaturation level ²				Significance			SE
	PU15	PU34	PU45	PU61	PUFA	α -TA	PUFA \times α -TA	
Total FA	18.85	18.33	17.01	18.09	NS	NS	NS	0.977
Total SFA	6.24 ^a	5.74 ^{ab}	5.10 ^{bc}	4.71 ^c	**	NS	NS	0.264
C 10:0	0.16	0.15	0.16	0.15	NS	NS	NS	0.016
C 12:0	0.01	0.01	0.01	0.01	NS	NS	NS	0.007
C 14:0	0.32 ^a	0.25 ^b	0.21 ^{bc}	0.19 ^c	***	NS	NS	0.015
C 15:0	0.05 ^a	0.04 ^b	0.04 ^c	0.03 ^d	***	NS	NS	0.002
C 16:0	3.78 ^a	3.39 ^{ab}	3.01 ^b	2.74 ^b	**	NS	NS	0.185
C 17:0	0.12 ^a	0.11 ^a	0.08 ^b	0.05 ^c	***	NS	NS	0.004
C 18:0	1.70	1.74	1.56	1.51	†	NS	NS	0.071
C 20:0	0.01	0.01	0.01	0.01	NS	NS	NS	0.002
Total	9.13 ^a	7.20 ^b	5.95 ^{bc}	4.91 ^c	***	NS	NS	0.416
C 14:1 ω 5	0.07 ^a	0.05 ^b	0.03 ^c	0.01 ^d	***	NS	NS	0.004
C 16:1 ω 7t	0.10 ^a	0.08 ^b	0.06 ^{bc}	0.05 ^c	***	NS	NS	0.005
C 16:1 ω 7	0.69 ^a	0.52 ^b	0.44 ^b	0.38 ^b	***	NS	NS	0.041
C 18:1 ω 9 ⁴	7.40 ^a	5.66 ^b	4.56 ^{bc}	3.57 ^c	***	NS	NS	0.327
C 18:1 ω 7t	0.54 ^a	0.38 ^b	0.32 ^c	0.30 ^c	***	NS	NS	0.017
C 20:1 ω 9	0.06 ^a	0.04 ^b	0.03 ^b	0.03 ^b	***	NS	NS	0.005
C 24:1 ω 9	0.12 ^a	0.40 ^b	0.44 ^b	0.52 ^c	***	NS	NS	0.010
Total PUFA	3.48 ^c	5.39 ^b	5.98 ^b	8.48 ^a	***	NS	NS	0.371
C 18:2tt	0.03 ^a	0.01 ^b	0.01 ^b	0.01 ^b	***	NS	NS	0.003
C 18:2 ω 6	1.99 ^b	2.28 ^b	2.29 ^b	2.82 ^a	NS	NS	NS	0.121
C 18:3 ω 3	0.18 ^c	1.89 ^b	2.49 ^b	4.10 ^a	***	NS	NS	0.183
C 18:4 ω 3	0.04 ^b	0.02 ^b	0.04 ^b	0.06 ^a	***	NS	NS	0.005
C 20:2 ω 6	0.04 ^a	0.02 ^b	0.02 ^b	0.03 ^{ab}	**	NS	NS	0.004
C 20:3 ω 6	0.09 ^a	0.07 ^b	0.05 ^b	0.06 ^b	***	NS	NS	0.005
C 20:4 ω 6	0.41 ^a	0.28 ^b	0.23 ^c	0.22 ^c	***	NS	NS	0.010
C 20:5 ω 3	0.03 ^d	0.30 ^c	0.40 ^b	0.57 ^a	***	NS	NS	0.015
C 22:4 ω 6	0.071 ^a	0.013 ^b	0.002 ^{bc}	0.001 ^c	***	NS	NS	0.003
C 22:6 ω 3	0.10 ^c	0.40 ^b	0.42 ^b	0.48 ^a	***	NS	NS	0.010
PUFA:SFA	0.56 ^d	0.94 ^c	1.17 ^b	1.78 ^a	***	NS	NS	0.035

¹ Values given in this table are means of four dietary treatments with different level of supplementation with α -TA (0, 100, 200 and 400 mg/kg) and correspond to least-squares means obtained from ANOVA (n= 24) and their pooled SE.

² PU15: 15g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61g polyunsaturated fatty acids /kg of feed.

³ FA: fatty acids; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

⁴ C 18:1 ω 9 includes sum of *cis* and *trans* forms.

^{a,b,c,d} Values in the same row with no common superscripts are significantly different.

* = significant effect at $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$; † = $P \leq 0.10$.

Total FA content of breast (18.1 g/kg) was not affected by dietary polyunsaturation level (Table 4.3). There are contradictory reports on lipid content in breast. In some reports there was no influence of dietary polyunsaturation level of fat on intramuscular lipid content of breast (Scaife et al., 1994; Crespo and Esteve-García, 2001), whereas Kirchgessner et al. (1993) and Ajuyah et al. (1991) found a higher fat content in breast muscle with increasing levels of PUFA in the diet, and Sanz et al. (1999a) reported lower lipid content of breast of chickens fed diets enriched with polyunsaturated oils. A possible explanation to this variety of findings in intramuscular fat content of breast muscles may be attributed to several factors, including the analytical procedure used to extract fat from samples. Fat content of tissues in more polyunsaturated treatments was underestimated when lipid contents were analyzed following AOAC (1995) methodology, suggesting total FA content as an estimator of crude fat in highly polyunsaturated samples (Villaverde et al., 2003b). In general, modification of FA composition of intramuscular fat seems to be more limited (Pan and Storlien, 1993; López-Bote et al., 1997). It may be because FA in intramuscular fat are used mainly as components of cellular membranes, and the cell has to maintain its physical characteristics to ensure fluidity and permeability of different compounds.

As expected, when the dietary polyunsaturation level increased, PUFA content in the tissues also increased (Table 4.2 and 4.3). The 46 g increase in dietary PUFA (from 15 to 61 g/kg diet) resulted in levels of PUFA that were 3.1 and 2.4 times higher in thigh and breast, respectively, than those in the most saturated diet. A similar response was observed in certain PUFA, particularly in LNA, LA, EPA and DHA. However, the SFA and MUFA contents of thigh and breast were reduced as the dietary degree of polyunsaturation increased. This reduction was more marked in MUFA (55% and 46% in thigh and breast, respectively, from PU15 to PU61) than in SFA (42% and 24% in thigh and breast, respectively, from PU15 to PU61).

Increasing the level of dietary polyunsaturation caused an increase in the accumulation of PUFA in thigh and breast. Depending on dietary polyunsaturation level, EPA and DHA proportions ranged from 0.05% to 2.05% and from 0.12% to 0.99% in thigh, respectively, and from 0.18% to 3.17% and from 0.56% to 2.79% in breast, respectively. Therefore, the predominant long chain PUFA was DHA in breast and EPA in thigh, whereas thigh deposition of LNA varied from 1.4% to 26.7% and breast deposition ranged from 0.98% to 22.2%. Furthermore, both tissues accumulated a similar proportion of LA (C18:2 ω 6: 10.3%, 12.7%, 13.7%, and 16.0% for PU15, PU34, PU45, and PU61, respectively). Similar results were reported by other authors (Hulan et al., 1988; López-Ferrer et al., 1999b; Gonzalez-Esquerria and Leeson, 2000; Crespo and Esteve-García,

2001) who found a higher deposition of long chain PUFA in breast muscle compared with thigh. Differences in tissue FA profile could be attributed to different roles of FA in these tissues or to their different phospholipids contents. The PUFA are preferentially incorporated into phospholipids (Hulan et al., 1988) and phospholipids are in a higher proportion in breast than in thigh muscles (Ratnayake et al., 1989).

Relationships between different families of FA (PUFA, MUFA, and SFA) in feed and tissues were studied. Regression analysis showed a relationship between PUFA content of diets and FA content of thighs and breasts (**Table 4.4** and **4.5**). This relationship between MUFA and SFA content of thighs and breasts and dietary PUFA content was linear, whereas the relationship between PUFA content of feed and PUFA content of tissues was exponential. The relationship between dietary PUFA content and the content of the different families of FA in chicken tissues supports the idea that the FA composition in chicken tissues is a combination of direct deposition from dietary FA and endogenous fat synthesis. All the variability in the content of PUFA, MUFA, and SFA in the studied tissues, 75%, 70%, and 57%, respectively for thigh, and 48%, 44%, and 19%, respectively for breast can be attributed to the PUFA content in the diet. These results agree with other reports that PUFA content in chicken tissues depends more on the variation in dietary FA content than SFA and MUFA contents in these tissues (López-Ferrer et al., 2001). However, when dietary treatments used a low range of PUFA variation (Hrdinka et al., 1996) was observed a poor relationship between dietary PUFA content and the percentage of these FA in meat.

Table 4.4. Multiple regression equations: y = Fatty acid content of thigh with skin (expressed as g/kg); x = Polyunsaturated fatty acid content of feeds (expressed as g/kg).

FA dependent variable	Equation	R ²	P
Total PUFA	$y = 92.03 - 92.03e^{(-0.0155x)}$	0.75	***
Total MUFA	$y = 89.34 - 0.92x$	0.70	***
Total SFA	$y = 53.81 - 0.43x$	0.57	***

¹ FA: Fatty acid; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.
*** = significant effect at $P \leq 0.001$.

Incorporation rates of PUFA in the more polyunsaturated treatments (PU61) reached 60% of the maximum of 92.0 g/kg in thigh and 66% of the maximum of 13.3 g/kg in breast (Tables 4.4 and 4.5). The accretion fractional rate of PUFA in thigh was 1.55% and was not different than those in breast. As explained previously, the behavior in the deposition of MUFA and SFA content in tissues showed an inverse relationship to the one shown for PUFA when dietary PUFA was modified. The MUFA content in thigh

decreased by 0.92 g/kg in thigh and 0.09 g/kg in breast when dietary PUFA increased 1 g/kg of feed. The decrease in rates of SFA in thigh and breast were 0.4 g/kg and 0.04 g/kg, respectively, to increase dietary PUFA 1g/kg of feed. These results are consistent with an inverse relationship between the accumulation of total MUFA and PUFA, mainly as ω 3 FA and to a lesser extent in SFA deposition, as dietary FA were modified (Ajuyah et al., 1991; Olomu and Baracos, 1991; López-Ferrer et al., 1999b, 2001).

Table 4.5. Multiple regression equations: y = Fatty acid content of breast without skin (expressed as g/kg); x = Polyunsaturated fatty acid content of feeds (expressed as g/kg).

FA dependent variable	Equation	R ²	P
Total PUFA	$y = 13.29 - 13.29e^{(-0.0155x)}$	0.48	***
Total MUFA	$y = 10.43 - 0.09x$	0.44	***
Total SFA	$y = 6.82 - 0.04x$	0.19	***

¹ FA: Fatty acid; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.
*** = significant effect at $P \leq 0.001$.

4.2.5. Effect of Cooking

The FA in raw and cooked thighs (expressed as g per kg of raw and cooked thigh on a dry matter basis; water content: 64.93% and 64.74% in raw and cooked thigh, respectively) are shown in **Table 4.6**. Cooking of thigh meat led to a reduction in FA content that affected all three families of FA in a similar proportion. This reduction was 6.2% for SFA, 6.8% for MUFA, and 5.7% for PUFA. Thus, the PUFA to SFA ratio was not significantly modified by heat processing, consistent with those of other authors who quantified some FA of thighs and observed a similar reduction in FA (Myers and Harris, 1975). When thighs were cooked at 106°C for 77 min in a conventional oven, the reduction observed was 7.0% for SFA, 5.3% for MUFA, and 6.6% for PUFA. Dawson et al. (1990) and Grau et al. (2001a,b) did not observe differences in FA profiles between raw and cooked thighs when cooked at mild temperatures (80 to 90°C). Nevertheless, researchers who processed thigh meat at higher temperatures (200°C) found PUFA proportion reduced by 12.4% (López-Ferrer et al., 1999c). These results reveal that cooking at low temperatures can cause fat losses with similar magnitude in all families of FA, while quantification of FA is necessary. On the other hand, more aggressive thermal processes may cause harsh PUFA losses which can be observed in an altered FA profile.

Table 4.6. Effect of cooking process, dietary polyunsaturation level and α -tocopherol acetate (α -TA) supplementation on the fatty acid content of thigh with skin, expressed as g/kg of raw and cooked thigh in a dry matter basis¹.

Fatty Acid ³	Process			Polyunsaturation level ²					SE
	Raw	Cooked	<i>P</i>	PU15	PU34	PU45	PU61	<i>P</i>	
Total FA	374.91	351.36	***	385.93 ^a	366.31 ^a	361.17 ^a	339.12 ^b	***	7.057
Total SFA	106.14	99.61	***	128.19 ^a	108.09 ^b	97.71 ^c	77.49 ^d	***	2.430
C 10:0	0.06	0.06	NS	0.07 ^a	0.06 ^b	0.06 ^b	0.06 ^b	***	0.003
C 12:0	0.16	0.16	NS	0.20 ^a	0.16 ^b	0.15 ^c	0.12 ^d	***	0.003
C 14:0	6.08	5.73	***	8.05 ^a	5.96 ^b	5.27 ^c	4.34 ^d	***	0.101
C 15:0	0.93	0.88	***	1.27 ^a	0.98 ^b	0.82 ^c	0.53 ^d	***	0.017
C 16:0	67.87	63.55	***	82.06 ^a	68.46 ^b	62.73 ^b	49.57 ^c	***	1.667
C 17:0	1.86	1.75	**	2.57 ^a	2.11 ^b	1.67 ^c	0.86 ^d	***	0.046
C 18:0	27.16	25.79	***	30.82 ^a	28.44 ^b	25.62 ^c	21.01 ^d	***	0.737
C 20:0	0.31	0.26	***	0.42 ^a	0.26 ^b	0.22 ^b	0.23 ^b	***	0.013
Total MUFA	153.52	143.02	***	208.30 ^a	153.20 ^b	133.79 ^c	97.79 ^d	***	3.398
C 14:1 ω 5	1.13	1.06	*	1.90 ^a	1.19 ^b	0.89 ^c	0.40 ^d	***	0.033
C 16:1 ω 7t	1.88	1.76	***	2.47 ^a	1.87 ^b	1.69 ^b	1.25 ^c	***	0.048
C 16:1 ω 7	13.49	12.51	**	17.66 ^a	12.89 ^b	12.00 ^b	9.45 ^c	***	0.467
C 18:1 ω 9 ⁴	124.67	116.30	***	171.45 ^a	125.53 ^b	108.28 ^c	76.68 ^d	***	2.805
C 18:1 ω 7t	6.75	6.19	***	9.69 ^a	6.13 ^b	5.36 ^c	4.69 ^c	***	0.189
C 20:1 ω 9	1.09	0.98	***	1.43 ^a	0.98 ^b	0.90 ^{bc}	0.82 ^c	***	0.024
C 24:1 ω 9	2.30	2.14	***	0.50 ^d	2.28 ^c	2.76 ^b	3.35 ^a	***	0.073
Total PUFA	115.07	108.48	***	49.06 ^d	104.82 ^c	129.51 ^b	163.72 ^a	***	3.552
C 18:2tt	0.37	0.37	NS	0.55 ^a	0.40 ^b	0.34 ^c	0.18 ^d	***	0.012
C 18:2 ω 6	49.06	46.07	***	37.62 ^d	46.89 ^c	50.29 ^b	55.47 ^a	***	0.843
C 18:3 ω 3	55.38	52.58	†	5.32 ^d	48.80 ^c	68.23 ^b	93.57 ^a	***	2.551
C 18:4 ω 3	1.06	0.81	***	1.40 ^a	0.84 ^b	0.53 ^c	0.98 ^b	***	0.043
C 20:2 ω 6	0.35	0.32	***	0.27 ^b	0.36 ^a	0.34 ^a	0.36 ^a	***	0.011
C 20:3 ω 6	0.44	0.42	*	0.44	0.44	0.43	0.42	NS	0.009
C 20:4 ω 6	1.70	1.53	***	2.08 ^a	1.58 ^b	1.40 ^b	1.40 ^b	***	0.046
C 20:5 ω 3	3.77	3.64	NS	0.24 ^d	2.82 ^c	4.61 ^b	7.14 ^a	***	0.238
C 22:4 ω 6	0.12	0.13	NS	0.15 ^a	0.03 ^b	0.10 ^a	0.20 ^a	***	0.025
C 22:6 ω 3	2.13	2.13	NS	0.48 ^d	2.07 ^c	2.60 ^b	3.37 ^a	***	0.082
PUFA:SFA	1.21	1.21	NS	0.38 ^d	0.98 ^c	1.33 ^b	2.13 ^a	***	0.039

¹ Values given in this table correspond to least-squares means obtained from ANOVA (n= 48) and their pooled SE.

P values for the effect of dietary α -TA supplementation and interactions between different factors (cooking process, dietary polyunsaturation and α -TA supplementation) in all cases were not significant.

² PU15: 15g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61g polyunsaturated fatty acids /kg of feed.

³ FA: fatty acids; SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

⁴ C 18:1 ω 9 includes sum of *cis* and *trans* forms.

^{a,b,c,d} Values in the same row with no common superscripts are significantly different.

* = significant effect at $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$; † = $P \leq 0.10$.

Dietary supplementation with α -TA had no effect on FA content of cooked thighs. Although PUFA are the most sensitive FA to oxidation it seems that they have a high durability and a low susceptibility to thermal oxidative processes at mild temperatures. This theory is also supported by the results of Regulska-Ilow and Ilow (2002) who processed herring meat rich in long chain ω 3 PUFA by culinary methods and did not observe any variation in the FA profile that would indicate PUFA losses.

That cooking appears to affect different families of FA in a similar way may indicate that this reduction is due to an alteration of the samples during cooking. Therefore, cooking meat results in exudates that may have homogeneous content of FA. Unfortunately, we did not analyze the FA composition of the exudates from the samples. It would be expected that high temperatures during cooking increase lipid oxidation, which in turn may result in a higher reduction of PUFA in comparison to the other FA families. However, from our results, it seems that the melting point of fat has a more marked effect on FA losses than lipid oxidation.

Capítulo 5

Influencia del Nivel Dietético de Poliinsaturación y Vitamina E sobre la Calidad de la Carne de Pollo: Contenido de α -Tocoferol

5. Influence of Dietary Polyunsaturation Level on Chicken Meat Quality: α -Tocopherol Content

5.1. Summary

One hundred and ninety-two female broiler chickens were randomly distributed into 16 experimental treatments as a result of the combination of 4 levels of dietary PUFA (15, 34, 45 and 61g/kg) and 4 levels of supplementation with α -TA (0, 100, 200 and 400mg/kg), in order to determine the modification of the α -Toc content of chicken thighs and breasts. Dietary PUFA content influenced the α -Toc recoveries in thigh and breast meat. Dietary α -Toc and polyunsaturation level influenced α -Toc content of meat. α -Toc content of thigh increased linearly as the dietary α -Toc supplementation increased. Thus, it increased at a rate of 0.114 mg/kg ($P \leq 0.001$) and 0.071 mg/kg ($P \leq 0.001$) when α -Toc increased 1mg/kg of feed in the most and the least saturated treatments, respectively. Furthermore, α -Toc content of thigh decreased linearly to the inclusion of dietary PUFA. Decrease rates of α -Toc in thigh meat when PUFA/kg of feed was increased by 1 g were 0.06 mg/kg, 0.24 mg/kg, 0.42 mg/kg and 0.58 mg/kg for 0, 100, 200 and 400mg/kg of dietary supplementation with α -TA, respectively. A similar response was observed in breasts but with rates of α -Toc incorporation 1.9-2.0 times lower than in thighs.

5.2. Results and Discussion

5.2.1. Diet composition

The α -Toc content of the experimental diets is shown in **Table 5.1**.

Table 5.1. α -Tocopherol content of experimental diets, expressed as mg/kg¹

Dietary polyunsaturation ²	Dietary supplementation with α -tocopheryl acetate ³			
	E0	E1	E2	E4
PU15	5 \pm 0.3	135 \pm 7.3	252 \pm 13.3	441 \pm 32.4
PU34	6 \pm 0.7	136 \pm 3.7	243 \pm 15.3	452 \pm 12.3
PU45	6 \pm 0.8	138 \pm 11.2	232 \pm 5.7	477 \pm 25.0
PU61	5 \pm 0.6	135 \pm 6.3	219 \pm 7.9	436 \pm 47.1

¹These values correspond to means \pm SE.

² PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed.

³ E0: without supplementation with α -tocopheryl acetate; E1: supplemented with 100 mg/kg α -tocopheryl acetate; E2: supplemented with 200 mg/kg α -tocopheryl acetate; E4: supplemented with 400 mg/kg α -tocopheryl acetate.

5.2.2. Recovery of α -Tocopherol Determination

As expected, the level of dietary supplementation with α -TA did not affect α -Toc recoveries in thigh and breast samples (data not shown). In addition, the α -Toc recoveries in thigh and breast meat samples were not affected by the level of α -Toc addition. Therefore, global recoveries (**Table 5.2**) grouping the results from both levels of addition were used for calculations of α -Toc content in meat samples. On the other hand, global recoveries of α -Toc in thigh meat samples reduced as the dietary polyunsaturation increased (Table 5.2). Thus, an increase of 46g, from 15 to 61 g/kg, of dietary PUFA, significantly reduced α -Toc recovery in thigh samples by 30.9%. In general, global recoveries of α -Toc in breast meat samples increased as dietary PUFA increased, and were higher than in the thigh meat samples. However, this increase was of a much lower magnitude (4.8%) than the decrease observed in thigh meat. The differences in the recoveries of α -Toc may be due to the different level of PUFA in the tissues. In fact, thigh meat had levels of PUFA that were 7 fold higher than those of breast meat (Chapter 4). This is due to the fact that skin was included in the thigh samples but was excluded from the breast ones. The higher PUFA content of thigh meat, together with its higher oxidative potential creates a higher oxidative pressure, that under the prooxidant conditions during saponification may increase the oxidation rate of lipids, which is in turn, neutralized by the α -Toc present in the sample. The net result is a reduction of total α -Toc in the sample. Therefore, the degree of polyunsaturation, and in turn, the level of oxidation, may negatively affect the recovery of α -Toc from the samples during the analytical determination. A correct use of a combination of antioxidants (e.g., citric acid + pyrogallol

+ BHT) for the hydrophilic and lipophilic phases during the analysis of α -Toc in meat may be able to avoid or minimize differences in α -Toc recoveries (Bou et al., 2004).

Table 5.2. Recovery of the method for α -tocopherol determination (expressed as %) in chicken meat from broilers fed diets with different degree of polyunsaturation.

Dietary treatments ²	Recovery ¹					
	Thigh			Breast		
	10 ³ (n = 4)	20 (n = 4)	Global Recovery (n = 8)	10 (n = 4)	20 (n = 4)	Global Recovery (n = 8)
PU15	86.61	87.49	87.05 ^a	93.51	93.33	93.42 ^c
PU34	78.41	78.77	78.59 ^b	94.89	93.48	94.18 ^{bc}
PU45	73.78	76.52	75.15 ^c	95.23	94.42	94.82 ^b
PU61	59.13	61.17	60.15 ^d	97.87	97.98	97.92 ^a
P values			***			***

¹ Recovery results from two levels of α -tocopherol addition.

² PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed.

³ Level of addition of α -tocopherol: 10 or 20 μ g α -tocopherol/100 mg freeze-dried sample.

^{a,b,c,d} Values in the same column with different superscript are significantly different.

*** = $P \leq 0.001$.

5.2.3. α -Tocopherol Content of Thigh and Breast Meat

The α -Toc content of thigh and breast meat, expressed as mg/kg of tissue is shown in **Table 5.3**. At dietary levels of 200 mg α -TA/kg of feed, α -Toc content ranged from 14.9 to 37.3 mg/kg in thigh meat and from 9.0 to 17.3 mg/kg in breast meat. Similarly, at this dietary level of α -TA supplementation, some authors found similar α -Toc content in thighs with skin (Ruiz et al., 1999; Grau et al., 2001a,b), as well as in breast meat (Galvin et al., 1993; Morrissey et al., 1997; O'Neill et al., 1998a).

Furthermore, α -Toc content in thigh was 1.8-2 fold higher ($P \leq 0.001$) than in breast. Despite the fact that in our study thighs contained skin, these results agree with other authors who observed α -Toc content of thighs without skin were 1.1-2.2 fold higher than those of breasts (Lin et al., 1989a; Ahn et al., 1995; Cherian et al., 1996; De Winne and Dirinck, 1996; Nam et al., 1997; O'Neill et al., 1998a; Malczyk et al., 1999). Differences among tissues may result from the different metabolic function of each tissue. So, thighs of broilers, apart from having a more developed vascular system (De Winne and Dirinck, 1996; Lin et al., 1989a,b), also have higher lipid content than breast (Malczyk et al., 1999; Crespo and Esteve-Garcia, 2001). In the present study, although PUFA expressed as percentage of total fat was higher in breast meat, the absolute amount was higher in thigh

meat, since the total fat content of thigh was 6.5-7.8 times that of breast (Chapter 4). Therefore, this higher content of PUFA may cause a greater need for α -Toc to prevent lipid oxidation. When the protective potential of α -Toc in muscle was estimated based on the total PUFA content, it revealed that the α -Toc concentration in breast meat (139.5, 305.8 and 436.3 mg/100g of total PUFA for E1, E2 and E4, respectively) was 3-4 fold higher than in thigh (51.5, 83.9 and 135.2 mg/100g of total PUFA for E1, E2 and E4, respectively). These results agree with those of Jensen et al. (1997) who observed that α -Toc to PUFA ratio in breast meat was 2 fold higher than in thigh meat.

Table 5.3. Effect of dietary polyunsaturation and α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol content in thigh and breast meat (expressed as mg/kg)¹.

Dietary polyunsaturation ²	Thigh					Breast				
	E0 ³	E1	E2	E4	Grand	E0	E1	E2	E4	Grand
PU15	2.6 ^z	20.6 ^y	37.3 ^{axy}	53.2 ^{ax}	28.4 ^A	1.3 ^z	9.0 ^y	17.3 ^{ax}	26.2 ^{aw}	13.4 ^A
PU34	0.7 ^z	17.1 ^{yz}	21.0 ^{aby}	46.9 ^{abx}	21.4 ^B	0.8 ^z	8.7 ^y	13.1 ^{aby}	25.1 ^{ax}	11.9 ^A
PU45	0.4 ^z	12.3 ^{yz}	19.5 ^{bxy}	34.3 ^{bcx}	16.6 ^{BC}	0.6 ^z	6.5 ^{yz}	12.5 ^{abxy}	16.2 ^{bx}	9.0 ^B
PU61	0.1 ^z	10.8 ^{yz}	14.9 ^{bxy}	29.3 ^{cx}	13.8 ^C	0.4 ^z	4.6 ^{yz}	9.0 ^{by}	13.5 ^{by}	6.9 ^B
Grand Mean	0.9 ^D	15.5 ^C	23.2 ^B	40.9 ^A		0.8 ^D	7.2 ^C	13.0 ^B	20.2 ^A	
SE	3.19					1.52				
<i>P</i> values										
PUFA	***					***				
α -TA level	***					***				
PUFA \times α -TA level	*					**				

¹ Values given in this table correspond to least-squares means obtained from multifactorial ANOVA (n = 96) and their pooled SE.

² PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed.

³ E0: without supplementation with α -tocopheryl acetate; E1: supplemented with 100 mg/kg α -tocopheryl acetate; E2: supplemented with 200 mg/kg α -tocopheryl acetate; E4: supplemented with 400 mg/kg α -tocopheryl acetate.

^{A,B,C,D} Grand means in the same column/row with different superscript were significantly different.

^{a,b,c} Different superscripts indicate significant differences in the same column.

^{w,x,y,z} Different superscripts indicate significant differences in the same row for thigh or breast samples.

* = significant effect at $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$.

Dietary α -Toc supplementation and polyunsaturation level influenced α -Toc content of thigh and breast meat. In relation to dietary α -Toc supplementation, several authors have reported that α -Toc content in chicken tissues is well correlated with its dietary supplementation (Klauss et al., 1995; Jensen et al., 1999; Flachowsky et al., 2002). Relationships between α -Toc content in feed (supplemented as α -TA) and tissues are shown in **Table 5.4**. α -Toc content of thigh and breast significantly increased as the

dietary α -Toc (values obtained by analysis) increased. However, incorporation rates of α -Toc were influenced by dietary polyunsaturation level. Thus, linear regression analysis showed that, in the more saturated treatments (PU15 and PU34), α -Toc content in thigh and breast increased at a rate of 0.114 mg/kg and 0.071 mg/kg, respectively, for each mg increase of α -Toc per kg feed, whereas in the more polyunsaturated treatments (PU45 and PU61), this increase was 0.059 mg/kg and 0.035 mg/kg in thigh and breast meat, respectively. Therefore, the incorporation rates of α -Toc content in thigh meat were 1.9 to 2.0 fold higher than those in breast meat ($P \leq 0.001$). This agrees with the results of Lin et al. (1989a,b) who observed that α -Toc deposition in thigh meat was approximately 50% higher than in breast meat. The different rate of deposition may result, as explained above, from the higher metabolic rate of thigh muscles.

Table 5.4. Regression equations: $y = \alpha$ -Tocopherol content in thigh and breast (expressed as mg/kg); $x_1 = \alpha$ -tocopherol (expressed as mg/kg) of feed; $x_2 =$ polyunsaturated fatty acid (expressed as g/kg) content of feed.

Independent variable ¹	Dietary treatments ²	Thigh			Breast		
		Equation	r ²	P	Equation	r ²	P
α -Tocopherol content of feed [mg/kg]	PU15, PU34	$y = 0.114x_1$	0.93	***	$y = 0.071x_1$	0.93	***
	PU45, PU61	$y = 0.059x_1$	0.94	***	$y = 0.035x_1$	0.93	***
PUFA content of feed [g/kg]	E0	$y = 3.03-0.06x_2$	0.56	***	$y = 1.52-0.02x_2$	0.49	***
	E1	$y = 24.43-0.24x_2$	0.49	**	$y = 11.28-0.11x_2$	0.56	***
	E2	$y = 39.68-0.42x_2$	0.50	***	$y = 19.51-0.17x_2$	0.47	**
	E4	$y = 63.55-0.58x_2$	0.50	***	$y = 32.68-0.32x_2$	0.49	**

¹ Values obtained by analysis of feeds.

² PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU34: 34 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU45: 45 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids /kg of feed; E0: without supplementation with α -tocopheryl acetate; E1: supplemented with 100 mg/kg α -tocopheryl acetate; E2: supplemented with 200 mg/kg α -tocopheryl acetate; E4: supplemented with 400 mg/kg α -tocopheryl acetate.

** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$.

There is a wide range of variability in the α -Toc content of chicken meat obtained by different authors with similar levels of α -TA supplementation. This variation can be due in part to the studied tissues and to the analytical method used to determine α -Toc in tissues, as explained above. Furthermore, most studies do not determine α -Toc in feed, and the real α -Toc content in diet does not always coincide with the estimated α -Toc from dietary supplementation. In addition, probably factors related to the PUFA

composition of the diet cause important differences in α -Toc content of chicken meat.

In relation to dietary polyunsaturation level, α -Toc content of thighs and breasts were reduced as the inclusion of dietary PUFA increased (Table 5.4). Thus, the decrease rates of α -Toc in thigh meat when PUFA/kg of feed was increased by 1 g were 0.06 mg/kg, 0.24 mg/kg, 0.42 mg/kg and 0.58 mg/kg for E0, E1, E2 and E4, respectively. Decrease rates of α -Toc in breasts when PUFA/kg of feed was increased by 1 g were lower than thigh, and were 0.02, 0.11 mg/kg, 0.17 mg/kg and 0.32 mg/kg for E0, E1, E2 and E4, respectively. Similarly to our results, some authors found that α -Toc content in liver and serum of rats decreased as dietary DHA (C22:6 ω 3) content increased (Saito et al., 1996; Kubo et al., 1997). This could be explained by the possibility that α -Toc is degraded in part by its activity in suppressing increased tissue lipid oxidation. Furthermore, it can be observed that α -Toc losses depending on dietary polyunsaturation level were higher in diets supplemented with high doses of α -TA. Kubo et al. (1997) observed that α -Toc was progressively reduced from rat tissues as the level of DHA increased, although the level of ascorbic acid and glutathione peroxidase increased. A possible explanation may be that the “in vivo” recycling mechanism of α -Toc is not efficient enough under high oxidative status.

In literature it has been shown that fat and oil sources varying in the polyunsaturation degree found variable results with respect to α -Toc accumulation in chicken meat. Dietary polyunsaturation gives rise to higher content of PUFA in chicken meat, which has a higher oxidative status (Grau et al., 2001a,b). The relative quantities of α -Toc required to protect a fatty acid are higher as the number of double bounds in the molecule increase (Witting and Horwitt, 1964). For this reason, supplementing chicken diets with fish oil rich in long chain PUFA with a high number of double bounds, produces a reduction in the α -Toc content of chicken tissues (Miller and Huang, 1993; Husvéth et al., 2000; Surai and Sparks, 2000; Zanini et al., 2003b). However, using vegetable oils with high levels of PUFA with a lower number of double bounds, did not affect α -Toc content of chicken tissues (Cherian et al., 1996; Lauridsen et al., 1997; Malczyk et al., 1999; Ruiz et al., 1999; Grau et al., 2001a,b).

Since α -Toc content in thigh and breast increased linearly with dietary α -Toc content (supplemented as α -TA) supplementation and decreased linearly with dietary PUFA, the following equations were calculated:

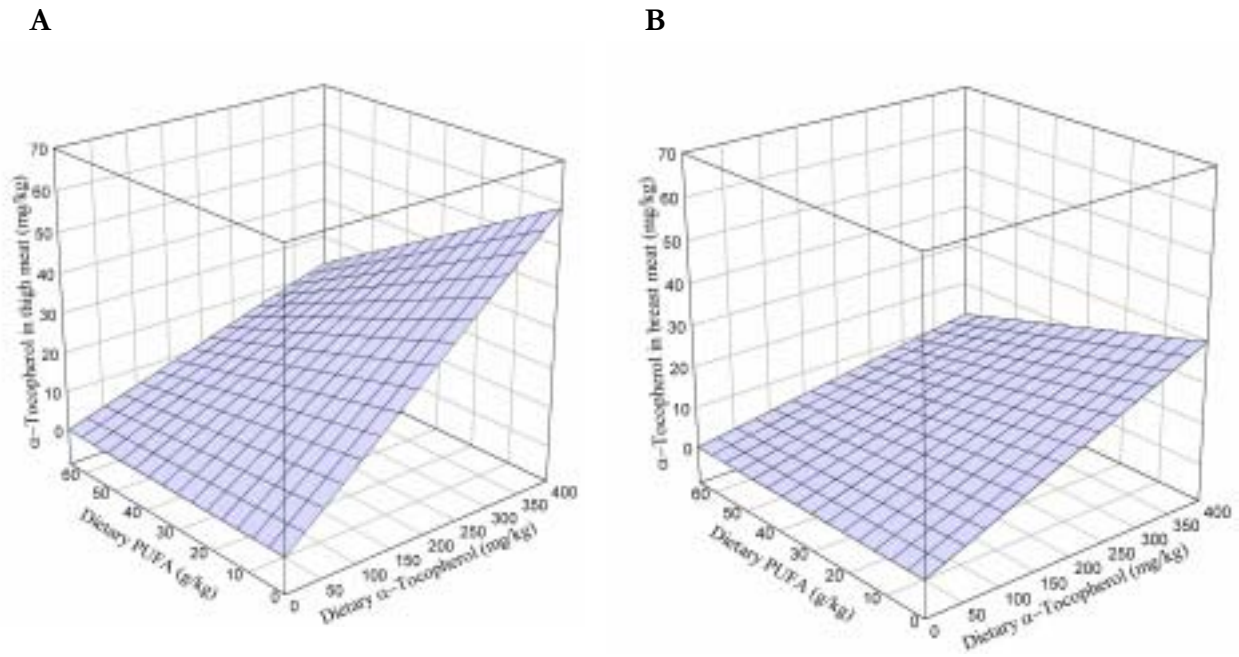
$$\text{Thigh: } y = x_1(0.1473 - 0.0014x_2) \quad (P \leq 0.001)$$

$$\text{Breast: } y = x_1(0.0746 - 0.0007x_2) \quad (P \leq 0.001)$$

where y is α -Toc concentration in studied tissue (mg/kg), x_1 is α -Toc content of the diet

(mg/kg) and x_2 is PUFA content of the diet (g/kg). The estimated response surface for α -Toc content in thigh and breast meat is shown in **Figure 5.1**.

Figure 5.1. Estimated response surface for α -tocopherol content in thigh (A) and breast (B) meat (expressed as mg/kg) to variation in dietary content of α -tocopherol (expressed as mg/kg) and polyunsaturated fatty acids (expressed as g/kg).



In conclusion, tissue retention of α -Toc varies considerably among tissues, being higher in thigh than in breast meat. α -Toc content in meat increases linearly as dietary α -Toc supplementation increases. Furthermore, as the dietary polyunsaturation level increases, α -Toc content of chicken meat decreases.

Capítulo 6

Distribución de los Estereoisómeros del α -Tocoferol en el Hígado y Muslo de Pollos

6. Distribution of α -Tocopherol Stereoisomers in Liver and Thigh of Chickens

6.1. Summary

The effect of supplementation with different levels of *all-rac*- α -TA and the inclusion of different dietary content of PUFA on the deposition of α -Toc ST in liver and thigh of chickens was evaluated. A total of 96 day-old Ross female broiler chickens were randomly distributed in 8 experimental treatments (three replicates each) resulting from 4 levels of α -TA without supplementation and supplemented with 100, 200 and 400 mg α -TA/kg and 2 levels of dietary PUFA: 15 and 61 g/kg. The feeds supplemented with α -TA contained a similar proportion of each ST. The diets without α -TA showed the following α -Toc ST: RRR 35.1%, RRS 24.5%, RSR 25.3%, RSS 13.9% and total 2S forms 1.3%. Consumption of different level of α -TA did not lead to statistical differences in α -Toc ST proportion in the liver and thigh. In general, the ST profiles in the tissues studied were similar, responding to the ST profile of the diet. Both tissues preferentially accumulated 2R ST (69% to 100%). However, when α -TA was used the discrimination is not specific for the RRR α -Toc form. Furthermore, the 2R:2S ratio showed a tendency to increase as the polyunsaturation level of the diet increased.

6.2. Results and Discussion

6.2.1. Diet Composition

α -Toc content of the experimental diets is shown in **Table 6.1**. The fish and linseed oils used had 11 and 19 mg/kg α -Toc, respectively, whereas no α -Toc was found in the tallow used. Supplementation with 100, 200 and 400 mg/kg α -TA resulted in dietary levels of α -Toc that matched the amounts added.

Table 6.1. α -Tocopherol content of the experimental diets (expressed as mg/kg)

Dietary polyunsaturation ¹	E0	ES ²		
		E1	E2	E4
PU15	5 ± 0.3	135 ± 7.3	252 ± 13.3	441 ± 32.4
PU61	5 ± 0.6	135 ± 6.3	219 ± 7.9	436 ± 47.1

¹ PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids/kg feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids/kg feed.

² E0: No supplementation with α -tocopheryl acetate; ES: supplemented with 100 (E1), 200 (E2) and 400 (E4) mg/kg all-rac- α -tocopheryl acetate.

The source of dietary α -Toc clearly affected the profile of the different ST (**Table 6.2**). Thus, the non-supplemented diets, which depended on the α -Toc provided by the feed ingredients, were predominant in 2R forms (98.9%), mainly RRR (35.1%), while the diets supplemented with α -TA had similar proportion of the different ST. With the analytical methodology used it was not possible to separate the 4 2S ST, but we assume, based on data from other researches, that the 4 2S ST are present in similar proportions (Weiser and Vechi, 1982; Scott et al., 1982; Riss et al., 1994).

Table 6.2. α -Tocopherol stereoisomer profile of the experimental diets, expressed as %

Steroisomer	E0 ¹		ES	
	PU15	PU61	PU15	PU61
RRR	32.5	37.6	14.1	14.6
RRS	25.6	23.4	15.2	14.9
RSR	27.9	22.6	11.6	12.1
RSS	12.8	15.0	11.4	11.1
Total 2R forms ²	98.9	98.6	52.2	52.6
Total 2S forms ³	1.1	1.4	47.8	47.4
2R:2S ratio	89.9	70.4	1.1	1.1

¹ PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed; E0: without α -tocopheryl acetate supplementation; ES: supplemented with 100, 200 or 400 mg/kg all-rac- α -tocopheryl acetate.

² Total 2R forms: RRR + RRS + RSR + RSS.

³ Total 2S forms: SSS + SSR + SRS + SRR.

It is generally accepted that only the RRR ST of α -Toc is present in nature. However, in the E0+PU15 diet, in which the tallow used did not have any detectable amounts of α -Toc, other ST, mainly 2R forms were found. We did not have a definitive explanation for this finding. It may be caused by unknown contamination of the feedstuffs used.

Table 6.3. α -Tocopherol (α -Toc) content (mg/kg) and fatty acid (FA) content (g/kg) of liver and thigh¹.

α -Toc content ⁴	Liver			Thigh		
	PU15 ²	PU61	SE	PU15 ²	PU61	SE
E0 ³	1.1 ^c	0.2 ^c	4.41	2.6 ^{ef}	0.1 ^f	2.88
E1	17.3 ^{bc}	6.1 ^c		21.0 ^{cd}	10.8 ^{def}	
E2	33.3 ^{ab}	8.9 ^c		36.8 ^b	14.8 ^{de}	
E4	44.9 ^a	17.0 ^{bc}		53.2 ^a	29.3 ^{bc}	
FA content						
TFA ⁵	35.8	35.1	0.98	141.2	116.8	4.93
SFA ⁵	14.2	13.5	0.33	46.8	27.1	1.56
MUFA ⁶	10.2	7.2	0.42	76.4	34.0	2.25
PUFA ⁶	11.4	14.4	0.48	17.9	55.7	2.21

α -TA: all-rac- α -tocopheryl acetate; MUFA: total monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SFA: total saturated fatty acids; TFA: total fatty acids.

¹ Values given in this table correspond to least-squares means obtained from ANOVA (n = 6) and their pooled SE.

² PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed.

³ E0: without supplementation with α -tocopheryl acetate; E1: supplemented with 100 mg/kg all-rac- α -tocopheryl acetate; E2: supplemented with 200 mg/kg all-rac- α -tocopheryl acetate; E4: supplemented with 400 mg/kg all-rac- α -tocopheryl acetate.

^{a, b, c, d, e, f} Values with different superscript are significantly different in the interaction between dietary polyunsaturated fatty acids and α -tocopherol supplementation.

⁴ Effect of dietary PUFA level and α -TA supplementation and the interaction between both factors significant at P \leq 0.01 for both tissues.

⁵ Effect of dietary PUFA significant at P \leq 0.001 for thigh.

⁶ Effect of dietary PUFA level significant at P \leq 0.001 for liver and thigh.

6.2.2. Stereoisomers in liver and thigh

The α -Toc content of liver and thigh, expressed as mg/kg of tissue is shown in **Table 6.3.** α -Toc content of tissues significantly increased with the dietary supplementation with α -TA. Our results are consistent with other reports that α -Toc content in chicken tissues increase linearly with dietary supplementation (Jensen et al., 1999; Flachowsky et al., 2002a,b; Chapter 5). However, to our knowledge, the effect of different levels of dietary supplementation with α -TA on the ST profile of different chicken tissues has not been evaluated.

Table 6.4. Effect of supplementation with all-rac- α -tocopheryl acetate and dietary polyunsaturation on α -tocopherol stereoisomer profile in liver (expressed as %)¹.

Stereoisomer	E0 ²		ES		Statistical significance of variance			SE
	PU15	PU61	PU15	PU61	PUFA	α -Toc Source	PUFA \times α -Toc Source	
RRR	39.2 ^{bx}	100.0 ^{ay}	18.7 ^{cy}	21.1 ^{cy}	0.001	0.001	0.001	1.18
RRS	20.3 ^{aby}	0.0 ^{cz}	18.4 ^{by}	20.9 ^{ay}	0.001	0.001	0.001	0.69
RSR	13.7 ^{bz}	0.0 ^{cz}	16.2 ^{abz}	17.5 ^{az}	0.001	0.001	0.001	1.10
RSS	19.9 ^{ay}	0.0 ^{cz}	16.6 ^{bz}	17.6 ^{bz}	0.001	0.001	0.001	0.87
Total 2R forms ³	93.1	100.0	69.9	77.1	0.001	0.001	0.927	1.56
Total 2S forms ⁴	7.0	0.0	30.1	22.9	0.001	0.001	0.927	1.02
2R:2S ratio	14.4	-	2.4	3.5	0.089	0.001	-	0,47

α -Toc: α -tocopherol; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

¹ Values given in this table correspond to least-squares means obtained from ANOVA (n = 6) and their pooled SE.

² PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed; E0: without α -tocopheryl acetate supplementation (natural source); ES: supplemented with 100, 200 and 400 mg/kg all-rac- α -tocopheryl acetate.

³ Total 2R forms: RRR + RRS + RSR + RSS.

⁴ Total 2S forms: SSS + SSR + SRS + SRR.

^{a, b, c} Values in the same row with different superscript are significantly different in the interaction between dietary polyunsaturated fatty acids and α -tocopherol source.

^{x, y, z} Values in the same column with different superscript are significantly different.

α -Toc ST profile in liver and thigh are shown in **Table 6.4** and **6.5** (expressed as %), respectively. Consumption of different levels of synthetic α -Toc did not alter α -Toc ST proportion in these tissues (data not shown). Thus, data from treatments supplemented with different levels of α -TA were grouped to compare natural (E0) and synthetic form (ES) of supplementation with α -Toc (Table 6.2). Contrary to our results, Nitta et al. (1993) found a reduction in the proportion of 2R ST in liver, from 93.0% to 78.4%, when dietary supplementation with α -TA increased from 10 to 100 mg/kg. This difference may be caused by the higher dietary doses of α -TA used in our study, which dilute the RRR α -Toc content in the basal diet.

Furthermore, dietary polyunsaturation also affected α -Toc deposition in the studied tissues (Table 6.3). As such, α -Toc content of liver and thigh was higher and the increase caused by supplementing diets with different levels of α -TA was more marked in the diet with lower PUFA content. As dietary polyunsaturation increased, PUFA content of tissues increased and saturated and monounsaturated fatty acid decreased (Table 6.3), creating higher oxidative pressure (Husveth et al., 2000; Grau et al., 2001a,b; Chapter 7).

The higher lipid oxidation rate can lead to higher consumption of α -Toc and, consequently, there is less α -Toc available to be deposited into the tissues. Ingold et al. (1990), reported that the chiral configuration of α -Toc is important for its antioxidant activity. Therefore, the oxidative pressure in the tissues of the animal may affect the pattern of deposition of the different ST, depending on their antioxidant activities. This is why, in the present work, the ST profiles of liver and thigh tissues were studied, since it is well known how dietary fatty acids affect their fatty acid profile and lipid oxidation.

Table 6.5. Effect of supplementation with all-rac- α -tocopheryl acetate and dietary polyunsaturation on α -tocopherol stereoisomer profile in thigh (expressed as %)¹.

Stereoisomer	E0²		ES		Statistical significance of variance			
	PU15	PU61	PU15	PU61	PUFA	α -Toc Source	PUFA \times α -Toc Source	SE
RRR	53.1 ^{by}	64.2 ^{ay}	19.4 ^{cx}	20.1 ^{cx}	0.018	0.001	0.036	2.62
RRS	11.6 ^z	12.4 ^z	23.3 ^w	20.4 ^{ax}	0.497	0.001	0.206	0.99
RSR	9.5 ^{cz}	5.5 ^{cz}	14.9 ^{by}	17.7 ^{ay}	0.682	0.001	0.023	0.96
RSS	19.2 ^{az}	5.2 ^{cz}	11.7 ^{bz}	13.5 ^{bz}	0.001	0.810	0.001	1.73
Total 2R forms³	93.4	87.4	69.2	71.6	0.681	0.001	0.142	2.21
Total 2S forms⁴	6.6 ^b	12.6 ^b	30.8 ^a	28.4 ^a	0.384	0.001	0.042	1.36
2R:2S ratio	13.5 ^a	7.6 ^{ab}	2.3 ^b	2.6 ^b	0.070	0.001	0.042	1.90

α -Toc: α -tocopherol; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

¹ Values given in this table correspond to least-squares means obtained from ANOVA and their pooled SE.

² PU15: 15 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed; PU61: 61 g polyunsaturated fatty acids/kg of feed; E0: without α -tocopheryl acetate supplementation (natural source); ES: supplemented with 100, 200 and 400 mg/kg all-rac- α -tocopheryl acetate.

³ Total 2R forms: RRR + RRS + RSR + RSS.

⁴ Total 2S forms: SSS + SSR + SRS + SRR.

^{a, b, c} Values in the same row with different superscript were significantly different in the interaction between dietary polyunsaturated fatty acids and α -tocopherol source.

^{w, x, y, z} Values in the same column with different superscript were significantly different.

Liver and thigh, both responded to the ST profile of the diet. When no α -TA was supplemented, and only the α -Toc from feed ingredients, with 98.8% of 2R α -Toc, was available, the ST profile differed between tissues depending on the polyunsaturation level of the diet (Tables 6.4 and 6.5). In liver at the highest polyunsaturation level (PU61), only RRR α -Toc was detected. It may be probably due to the concentration of other ST forms different than RRR α -Toc was very low and below the detection limit of this method. Alternatively, at the low polyunsaturation level (PU15) although the RRR was the predominant form, the other 2R and 2S forms were also present. There was an increase in

RRR level with respect to the diet (1.2 liver to diet ratio), a reduction in RRS and RSR, and an increase in the proportion of RSS and 2S (6.4 liver to diet ratio). In thigh, the ST profile of the animals from PU15 treatment was similar to that found in liver, with enrichment in RRR (1.6 thigh to diet ratio). In birds from the PU61 treatment, RRR was the main ST and the rest of 2R and 2S forms were present in this tissue.

When the synthetic source is used, with equal amount of the eight ST, the ST profile of liver and thigh tissues is similar. In general, both tissues predominantly accumulated the 2R ST (from 52.4% in diet to 73.8% in liver and 70.4% in thigh). The ratio 2R:2S showed a tendency to increase as the polyunsaturation level of the diet increased, from 2.4 to 3.5 in liver ($P = 0.089$) and from 2.3 to 2.6 in thigh ($P = 0.070$). That indicated that as polyunsaturation level increased, the deposit of 2R forms was favored at the expense of 2S forms. These results are in agreement with Weiser et al. (1996) who studied stereoisomer profile in different tissues of rats fed diets with synthetic α -Toc and found a similar ST pattern. Similarly, Ueda et al. (1993) found a similar accumulation of 2R ST in the liver, brain, adrenal glands, and adipose tissue of rats fed a diet containing 100 mg α -TA/kg.

Globally, our results show that a bias in favor of 2R ST exists in the chicken when equal proportions of the 8 ST were supplied, since the ratio 2R:2S was greater than 2 in both tissues examined. Those results are in concordance with other studies which have found that after the administration of α -TA to rats, tissues were enriched preferentially with 2R forms, with 2R:2S ratio in studied livers ranging from 2.3 to 5.6 (Nitta et al., 1993; Ueda et al., 1993; Weiser et al., 1996). Among the different 2R ST, the RRR and RRS forms were the predominant ST. The liver of the animals fed with α -TA responded in the following order $RRR = RRS > RSR = RSS$. Alternatively, the response in thighs depended on the polyunsaturation level, but it can be summarized as $RRS \geq RRR > RSR > RSS$. Both liver and thigh from birds fed diets supplemented with α -TA showed a similar discrimination towards RRR α -Toc. Thus, the ratio of RRR between tissues and diet, was 1.4, showing the preferential enrichment of RRR α -Toc in the tissues studied.

Among the four 2R ST, RRR and RRS were in higher proportion in liver and thigh among diets supplemented with α -TA. Although differences between RRR + RRS and RSR and RSS are small, they are significant, showing that there is a preferential deposition for RRR and RRS. That observation is in concordance with the observations of Weiser and Vecchi (1982) that, in general, among 2R forms, biological activities of 4R (RRR and RRS) are higher than those of the 4S ST (RSR and RSS). Contrary to our results, Weiser et al. (1996) observed that after the treatment of rats with *all-rac*- α -TA, the presence of the

different 2R ST was similar in different tissues, and concluded that the storage capacity of the tissues was almost the same for all 2R ST.

The biodiscrimination of 2R ST has been described previously in rats, humans, and pigs (Traber et al., 1990; Nitta et al., 1993; Ueda et al., 1993; Kiyose et al., 1995; Weiser et al., 1996; Lauridsen et al., 2002), and confirms that the configuration at C-2 of the α -Toc molecule has a major impact on ST biodiscrimination (Weiser et al., 1996). Piironen et al. (1991) found that when laying hens were fed diets supplemented with α -TA, the enantiomeric pair RRR + SSS was transferred to eggs in higher proportion than the other ST, suggesting that the transfer efficiencies of different ST from feed to eggs, and probably to other tissues, are proportional to their biological activities. Taking the relative concentration of ST as an indicator of its biological activity, we may assume that the biological activity of the 2R ST is more than twice the activity of the 2S (Weiser and Vecchi, 1982).

Recent studies have shown that liver has a critical role in the biodiscrimination of ST, because of the presence of α -TTP. This protein preferentially selects 2R α -Toc for secretion into plasma (Leonard et al., 2002) and although it has been described in rats and humans (Sato et al., 1991, 1993; Kuhlemkamp et al., 1993), its presence in chicken tissues has not been demonstrated. However, our results, in which enrichment in 2R ST was observed after feeding equal amount of all eight ST may be explained by the presence of the α -TTP in chicken liver. Hosomi et al. (1997) shown that the biological activity of α -Toc ST is related with its relative affinity with α -TTP. Other authors suggested that the metabolism of 2S ST in the liver may be faster than that of 2R ST, therefore, reducing the presence of 2S ST in liver and other tissues (Kiyose et al., 1995; Kaneko et al., 2000).

In conclusion, consumption of different levels of synthetic α -Toc did not modify α -Toc ST profile in liver and thigh. Both tissues showed a similar ST pattern depending on ST profile of the diet. When synthetic α -TA was used increasing dietary polyunsaturation favored the deposition of 2R forms. Our results seem to indicate that chickens have a mechanism to biodiscriminate among different ST forms, in favor of the 2R ST. However, it is not clear that this mechanism is specific for RRR α -Toc ST. This biodiscrimination may be caused by the presence of α -TTP in chicken liver.