



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

**INCORPORACIÓN DE ACEITES POLIINSATURADOS, ALFA-
TOCOFEROL Y MINERALES EN PIENSO: EFECTOS SOBRE LA
COMPOSICIÓN Y OXIDACIÓN LIPÍDICA DE PLASMA, HÍGADO Y
CARNE DE CONEJO**

Alba Tres Oliver

Mayo, 2009



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO: Medicamentos, Alimentación y Salud

(Bienio 2002-2004)

**INCORPORACIÓN DE ACEITES POLIINSATURADOS, ALFA-TOCOFEROL Y MINERALES EN
PIENSO: EFECTOS SOBRE LA COMPOSICIÓN Y OXIDACIÓN LIPÍDICA DE PLASMA,
HÍGADO Y CARNE DE CONEJO**

Memoria presentada por

Alba Tres Oliver

para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Los Directores,

Dr. Rafael Codony Salcedo Dr. Francesc Guardiola Ibarz

La Doctoranda,

Alba Tres Oliver

Barcelona, Mayo de 2009

Este trabajo ha sido financiado por:

- ✓ El Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (Ministerio de Ciencia y Tecnología, España) mediante la concesión del *proyecto de investigación* AGL2003-06559-C02-01.
- ✓ El Programa Nacional de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España) mediante la concesión de una *Beca de Formación de Profesorado Universitario (F.P.U.)*, disfrutada desde Enero de 2003 hasta Diciembre de 2006.
- ✓ El Programa Nacional de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia, España), mediante la concesión de una *Ayuda para Estancias Breves en el Extranjero para becarios F.P.U.*, realizada entre 1 de Septiembre y 31 de Diciembre de 2006, en el "Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences" Uppsala, Suecia.
- ✓ El Instituto Danone, mediante la concesión de una *Beca para la investigación científica sobre Alimentación, Nutrición y Salud*, disfrutada desde 1 de Enero de 2007 hasta la actualidad.

Als meus pares

A José Luis

Sou molts els que al llarg de tot aquest temps heu contribuït d'una manera o altra en aquesta Tesi. És molt el que us haig d'agrair, tant, que ja sé que per molt que m'esforci en expressar-ho en paraules sempre em quedaré curta.

Vull començar agraint als qui més m'han ensenyat i dels qui més he après en la vida: els meus pares. M'heu ensenyat el significat de l'esforç, a estimar allò que un fa, a aprendre cada dia, a afrontar els reptes i superar les adversitats. Sense això segur que no hagués arribat fins aquí. Gràcies papes!

Als meus Directors de Tesi, Francesc i Rafa. Gràcies per deixar-me formar part del vostre grup de recerca, pel vostre criteri i rigor, per haver-me deixat aprendre de vosaltres, per la vostra dedicació, per confiar en mi i fer-me costat no només en els aspectes professionals sinó també en els més personals. Gràcies per tots els bons moments i per "aguantar-me" fins i tot en els moments complicats. Qui s'hagués imaginat el primer dia que vam parlar al laboratori de baix que ara seriem aquí!

Pep i la Magda, gràcies per tots els cops de mà que m'heu donat al llarg de tot aquest temps, incloent aquells cops que la millor ajuda va ser "no fer res" (ja m'entens, eh, Pep?).

Gràcies Joan per ser el meu "tutor", no sé com ho veus, però d'aquest càrrec no te'n lliuraràs mai! A veure si n'aprenc una mica de tu i aviat estic tant "enfeïnada" com tu, pobret... Gràcies Rosa per la teva amistat, per ser sempre a prop, tot i que ara ens veiem menys. Gràcies "màfia" per ser molt bons amics!!

A Enrique y Concha. Espero no haber incordiado demasiado con mis preguntitas sobre conejos...

Als meus companys de Greixos 1, Ricard, Jose, Gemma, Carla, Jonathan, Eli, Yasmin, Núria, Mercedes... Gràcies pel bon ambient, pel vostre interès per la meva feina, per la vostra ajuda, pels vostres consells científics i també pels no tant científics. Per tots els cafès (i "bruixeries"), per deixar-me compartir amb vosaltres els millors moments i ser al meu costat en els moments difícils, per ser inclús més que companys de feina! Gràcies Ricard per haver-me endinsat en el complicat món del treball de laboratori. A tu, al Jose i a la Gemma, pels viatgets a Valencia, mai us ho podré agrair prou... Jose, a ver lo que tardas es encontrar los errores de la Tesis! Ens veiem a Holanda, Gemma. Gracias Carla por los comentarios de mamá que siempre alegran la rutina del laboratorio. Que te vaya todo muy bien! Gracias por escucharme y por estar ahí. Al Jonathan, per compartir les batalletes amb els nostres "amics", per afegir una gran dosi de bon humor al laboratori, i escoltar les

meves lamentacions. Algun dia ens hauríem d'apropiar de "El bolso"! Ànims, que vals molt! A la Eli, por las miles de horas de laboratorio juntas, por las risas, incluso por tenerme un poco abandonada... A la Núria i a la Mercedes ja veureu, estigueu el temps que estigueu sempre falta temps al final de la Tesi... ànims! (ja sabeu que en coses així m'acostumo a equivocar poc...). Per cert nois, quins deures tenim?? Gràcies, a tots els que heu sofert les mostres amb mi: Mercè, Lionel, Maria, Arnaud, Vanessa...

A tots els meus companys de Departament: Aleix, Mariluz, Stefania, Lulu, Montse, Carol, els Joans, Mireia, Rafa, Raúl, Miguel, Alex, Maria..., per totes aquells "com ho portes?", per tots els cafès, per tots els "debats" dels dinars... Gràcies també a tots els profes del Departament: Abel, Cristina, Rosa, Elvira, Susana, Malu, les Carmens, Teresa... A Ana Isabel, por su ayuda con los cromatógrafos, y todos los "te has apuntado en la libreta?". Sin tí la cromatografia sería un caos. A Fernando, por todos los "ahora voy...", ya sabes que puedo ser muy pesadita! A la Montse per la seva ajuda amb els paperots. A Ana, por preocuparte por mi y alegrarme la mesa con la plantita.

A Maria por haberte convertido en mi *irmanciña*. A ti, a Consuelo y a Sara por hacer mucho más agradable mi estancia en Uppsala, por todas la cenas en la Kommon Kitchen, y por mantener y aumentar nuestra amistad. Que cierto es con vosotras, eso de que no hace falta estar físicamente cerca para estar al lado de alguien! Gracias! Thanks Meri for becoming our "mother" in Uppsala, and Armen, for all the barbecues. También a José (mi Mendel Junior!), a Elena (menos mal que tu y Joselu erais los únicos normales en Laponia, sino no sé que hubiera sido de nosotros!), and to François and Marcin, for sharing the Midnight Sun. When are we going to Armenia?

I am really grateful to Paresh C. Dutta for accepting me in my research stay in SLU. Also to Kumari, for your kindness and friendship. To all my other colleagues at SLU, for the funny moments and all the card's nights: Catalina, Tyler, Thijs, Elham, Federico...

A la meva germana Olga. Crec que el meu amor per la ciència és una mica gràcies a tu. A tota la meva família, Vicenç, Raúl, Jordi, Cristina, Montse, Jaume, Miguel, Salomé, Enri... pel vostre suport durant tot aquest temps, tot i no acabar d'entendre que faig tants anys amb els conills.

A Vanessa! Gracias por tu amistad, por ser mi cuñadita y por estar siempre a mi lado. A tots els amics: los "del barrio", Manolo, Tere, Javi, Carles, Carol, Silvia, Núria... per totes les vegades que us heu interessat per la meva feina, i inclús per totes les vegades que heu preguntat alló de "no acabaves, aviat?". A Pedro Filósofo, por tu interés y por tu ayuda en Valencia. Suerte con tu Tesis!

Y muchísimas gracias a ti Joselu. Por todo. Por saber y comprender lo importante que es para mí esta Tesis. Gracias por Suecia. Gracias por tu apoyo incondicional. Gracias por disfrutar conmigo en los buenos momentos, y sobre todo por estar a mi lado cuando "el sueño se convirtió en pesadilla". Sin ti creo que ya habría tirado la toalla. Nos hemos ganado unas vacaciones!

Esta es una historia sencilla,
pero no es fácil contarla.

“La vida es bella”
Roberto Benigni

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
2.1. Ácidos grasos	9
2.1.1. Biosíntesis de ácidos grasos n-6 y n-3	9
2.1.2. Ácidos grasos <i>trans</i>	11
2.1.3. Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos	13
2.2. Oxidación lipídica	16
2.2.1. La oxidación lipídica: mecanismos	16
2.2.1.1. Iniciación por vía no enzimática	16
2.2.1.2. Iniciación por vía enzimática	19
2.2.1.3. Descomposición de los HPL	20
2.2.1.4. Termooxidación	21
2.2.2. Antioxidantes	22
2.2.3. Consecuencias de la oxidación lipídica	26
2.2.3.1. Consecuencias de la oxidación lipídica en carnes	26
2.2.3.2. Efectos biológicos de los productos de oxidación	27
2.2.4. Factores que influyen sobre la oxidación lipídica en carnes	32
2.2.4.1. Factores relacionados con los sustratos	32
2.2.4.2. Catalizadores	35
2.2.4.3. Factores antioxidantes	38
2.2.4.4. Efectos del procesado	40
2.3. Factores dietéticos: efectos en la composición de tejidos animales	44
2.3.1. Modificación del perfil lipídico mediante la dieta	44
2.3.1.1. Mejora de la composición en ácidos grasos	47
2.3.1.2. Calidad de las grasas incorporadas a los piensos	48
2.3.2. Protección con antioxidantes: α -tocoferol	51
2.3.3. Suplementación de la dieta con elementos minerales	54
3. OBJETIVOS	57

4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	63
4.1. Diseño experimental	65
4.1.1. Prueba 1	66
4.1.2. Prueba 2	68
4.2. Animales y Muestras	70
4.3. Determinaciones realizadas	72
4.3.1. Aceites añadidos a piensos	72
4.3.2. Piensos	72
4.3.3. Plasma, Hígado y Carne	72
4.4. Análisis estadístico	73
5. PUBLICACIONES	77
5.1. Influence of different dietary doses of n-3 or n-6-rich vegetable fats and α -tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability.	79
5.2. Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and antioxidants: effects on fatty acid composition and stability of rabbit plasma, liver and meat.	97
5.3. Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through a ferrous oxidation-xyleneol orange method.	135
5.4. Oxidized oils and dietary zinc and α -tocopheryl acetate supplementation: effects on rabbit plasma, liver and meat fatty acid composition and meat mineral content	149
5.5. Oxidized oils and dietary zinc and α -tocopheryl acetate supplementation: effects on rabbit plasma, liver and meat oxidative stability.	183
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	223
6.1. Efectos de la incorporación de diferentes dosis de grasas vegetales ricas en ácidos grasos de la serie n-6 o de la serie n-3 y de la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol sobre la composición en ácidos grasos de plasma, hígado y carne de conejo.	225

6.2.	Efectos de la incorporación de aceites de diferentes niveles de oxidación en pienso de conejo sobre la composición en ácidos grasos de plasma, hígado y carne de conejo.	231
6.3.	Composición en Zn, Se, Fe y Cu en carne de conejo tras la suplementación de la dieta con zinc.	234
6.4.	Efecto de la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol sobre el contenido de α -tocoferol en plasma, hígado y carne de conejo.	236
6.5.	Relaciones entre el contenido en α -tocoferol, oxidación y susceptibilidad a la oxidación entre plasma, hígado y carne de conejo.	236
6.6.	Contenido en α -tocoferol, oxidación y susceptibilidad a la oxidación de plasma, hígado y carne de conejo según la dosis y tipo de grasa incorporada al pienso.	238
6.7.	Contenido en α -tocoferol, oxidación y susceptibilidad a la oxidación de plasma, hígado y carne de conejo tras la incorporación de aceites calentados en piensos.	241
6.8.	Efectos de la cocción y de su almacenamiento en refrigeración sobre la composición, oxidación y susceptibilidad a la oxidación de la carne de conejo.	245
7.	CONCLUSIONES	253
8.	BIBLIOGRAFÍA	259
9.	ANEXOS	273
9.1.	Lista de abreviaturas utilizadas	275
9.2.	Lista de Tablas	276
9.3.	Lista de Figuras	277
9.4.	Comunicaciones a Congresos relacionadas con esta Tesis Doctoral	279
9.5.	Notificaciones de las Revistas	281

1. Introducción

La influencia de la dieta en la salud humana es cada vez más conocida y aceptada. Por ello, varios organismos han recomendado no sólo reducir la ingesta de grasa y colesterol, sino mejorar la composición de esta fracción grasa aumentando los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente los de la familia omega-3, y reduciendo los ácidos grasos saturados (American Heart Association, 2001; Food and Nutrition Board, 2005). Además, últimamente se está haciendo un énfasis especial a los ácidos grasos *trans* para eliminar o restringir al mínimo su consumo, por las implicaciones que tienen este tipo de ácidos grasos en estas enfermedades. Ello está conduciendo a la búsqueda de estrategias para mejorar la composición lipídica de muchos alimentos, las carnes entre ellos.

Es bien conocida la posibilidad de modificar el perfil lipídico de la carne mediante la dieta del animal, tanto por incorporación directa de los ácidos grasos de la dieta, como por el depósito de nuevos ácidos grasos originados por la metabolización de los que aporta la dieta. De esta forma, podemos obtener perfiles grasos más interesantes nutricionalmente, en carnes y otros alimentos de origen animal. Cabe destacar que esta posibilidad puede ser aprovechada como una estrategia productiva favorable, pero que también puede tener el efecto contrario si las grasas incorporadas a los piensos no reúnen los requisitos adecuados, como por ejemplo si fueran ricas en ácidos grasos saturados o en ácidos grasos *trans*.

La carne de conejo es una alternativa nutricional interesante tanto por su contenido graso como por su perfil de ácidos grasos. Sin embargo, para que siga manteniendo estas características es necesario que el pienso utilizado en su cría intensiva reúna las características adecuadas de composición. Es una práctica habitual la incorporación de una pequeña cantidad de grasa en el pienso de conejo, porque no aumenta de forma significativa el contenido graso de la carne y mejora la eficiencia energética del pienso, lo que tiene una gran repercusión económica. Además, como en otras especies animales, la incorporación de grasa en el pienso puede aprovecharse para mejorar el perfil lipídico de la carne.

La carne y los productos cárnicos son habitualmente consumidos por una gran parte de la población. Por ello, adquieren cada vez más relevancia los aspectos relacionados con la seguridad alimentaria. Se está dirigiendo una atención especial a la seguridad de los piensos animales, ya que de ellos depende tanto el bienestar y la salud del animal como la seguridad alimentaria de los productos derivados de ellos y, en consecuencia, la salud de la población. Una muestra de ello son las recurrentes modificaciones de la normativa que afecta a los piensos y a sus ingredientes (Boletín Oficial del Estado, 2003; Boletín Oficial del Estado, 2007). Además, la utilización creciente de grasas y subproductos grasos de la industria alimentaria para alimentación animal requiere una evaluación y un control de su composición y calidad ya que estos productos pueden influir en la salud del animal, en la composición de los alimentos derivados de él, en su calidad nutritiva y sensorial y en su vida útil. La oxidación lipídica es una alteración importante en estos productos grasos. Además de que la incorporación de grasas oxidadas en piensos puede afectar a la composición, calidad y vida útil de la carne y otros productos derivados de estos animales, se han descrito varios efectos biológicos negativos sobre la salud humana y animal para muchos de los compuestos formados durante la oxidación lipídica, tanto cuando éstos son ingeridos a través de la dieta, como cuando la oxidación se desarrolla *in vivo*.

Hay que tener en cuenta que adicionar al pienso una grasa o aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados para mejorar el perfil lipídico de la carne del animal lleva implícito el riesgo de una mayor oxidación. Esta puede producirse durante la obtención de la grasa, durante su almacenamiento y transporte, en el pienso, en el animal *in vivo* o en la carne y otros productos derivados de él. Además, algunas operaciones de procesado de la carne y las condiciones de almacenamiento influyen claramente en la oxidación lipídica. Por ello, adquiere una importancia especial la evaluación del estado oxidativo de las grasas usadas en alimentación animal. Por ello, será necesario contemplar la adición de antioxidantes en las grasas o en los piensos para conseguir una mejora en la calidad nutritiva de estos productos y minimizar el desarrollo de la oxidación en ellos para que así presenten unas características sensoriales adecuadas, sean seguros, aceptados por el consumidor, y tengan una vida útil prolongada.

Por otro lado, la carne es una fuente importante de minerales, como el hierro, tanto por su cantidad como por su buena biodisponibilidad. Este depósito mineral puede también depender de la composición de la dieta, ya que además de su contenido en minerales, la biodisponibilidad de éstos puede estar marcada por los demás ingredientes del pienso. Además, los elementos minerales participan en diversos sistemas enzimáticos en el organismo, a la vez que pueden favorecer las reacciones que se producen durante el proceso oxidativo, tanto *in vivo* como *post mortem*.

De esta forma, cualquier estudio que se plantee el enriquecimiento de las carnes en ácidos grasos poliinsaturados debe tener en cuenta un adecuado equilibrio entre todos estos aspectos: optimización de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados incorporados en el pienso, una adecuada suplementación con tocoferoles, los efectos de la eventual suplementación con elementos minerales, y conseguir el mantenimiento de una mínima estabilidad oxidativa en el producto final durante su vida comercial.

2. Antecedentes Bibliográficos

2.1. Ácidos grasos

2.1.1. Biosíntesis de ácidos grasos n-6 y n-3

Los ácidos grasos saturados (AGS) y los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) pueden ser biosintetizados por los animales, pero no el ácido linoleico (C18:2n-6), ni el linolénico (C18:3n-3), siendo por esta razón considerados nutrientes esenciales.

A partir del linoleico y del linolénico, se pueden biosintetizar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga, de la serie n-6 y n-3 respectivamente, gracias a los sistemas enzimáticos presentes en el hombre y otros animales. Mediante desaturaciones y elongaciones, que tienen lugar en el retículo endoplasmático celular, los ácidos linoleico y linolénico van dando lugar a los AGPI de cadena larga hasta llegar al C24:5 en la serie n-6, y al C24:6 en la serie n-3. Estos ácidos grasos (AG) son entonces translocados al peroxisoma donde tendrá lugar su β -oxidación, para obtener así el C22:5n-6 y el C22:6n-3 o ácido docosahexaenoico (DHA), que serán otra vez translocados al retículo endoplasmático (Burdge et al., 2005a). Hay que tener en cuenta que en este proceso los ácidos linoleico y linolénico comparten los mismos sistemas enzimáticos, y que la primera enzima en actuar, la Δ 6-desaturasa, tiene más afinidad por el linolénico que por el linoleico (Figura 1). Aunque esta ruta ha sido descrita en animales y en el hombre, su efectividad para biosintetizar AGPI n-3 de cadena larga es muy baja, especialmente en el caso del DHA, siendo el paso limitante la conversión de C24:6n-3 a DHA (Burdge et al., 2005b; Arterburn et al., 2006).

Pero al igual que el resto de AG, los AG esenciales no son sólo utilizados para la biosíntesis de AGPI de cadena larga, sino que tienen también otros usos metabólicos, como por ejemplo la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos, la obtención de energía por la β -oxidación (aunque para ello se prefieren los AGS de cadena corta y los AGMI (DeLany et al., 2000)) y el posterior reciclaje del acetil-CoA generado en la β -oxidación para la síntesis de AG *de novo* (Burdge et al., 2005a) (Figura 2).

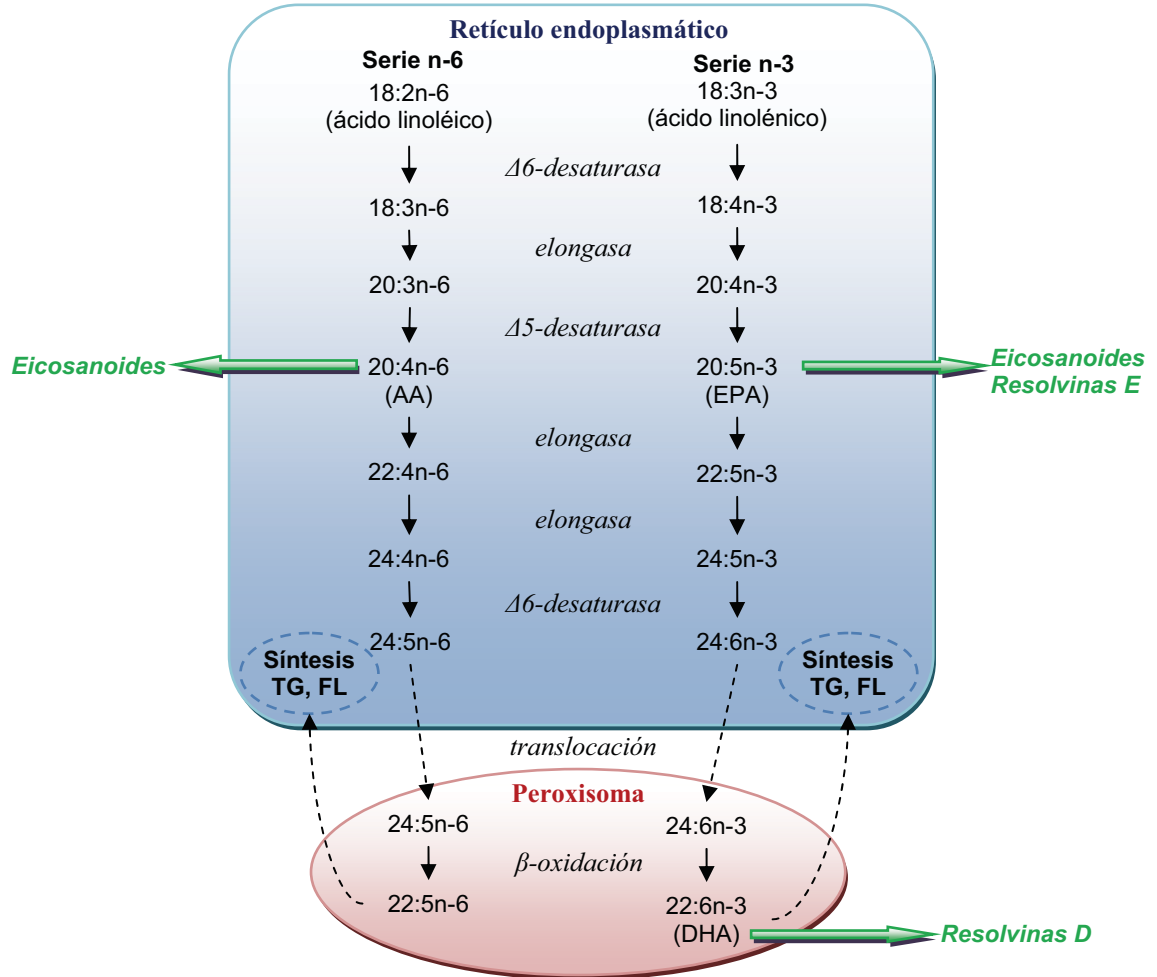


Figura 1. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-6 y n-3.

(Adaptado de Burdge y Calder, 2005; Arterburn y cols., 2006; Siddiqui y cols., 2008)

AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; FL, fosfolípido; TG, triglicérido

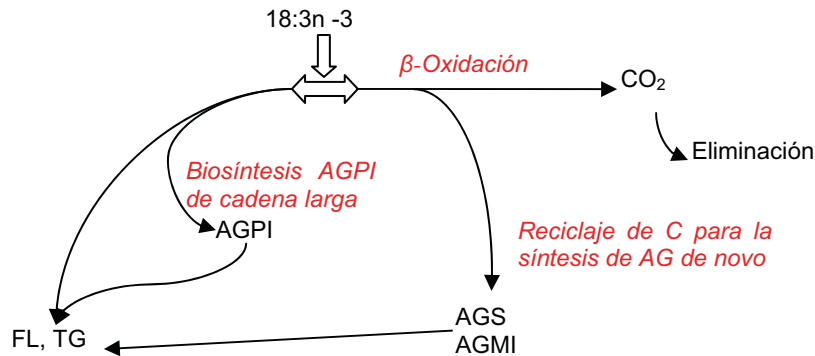


Figura 2. Esquema de la utilización del ácido linolénico por el hígado

AGPI, ácido graso poliinsaturado; FL, fosfolípido; TG, triglicérido; AGS, ácido graso saturado; AGMI, ácido graso monoinsaturado (Burdge et al., 2005a)

2.1.2. Ácidos grasos *trans*

Los AG *trans* son AGMI o AGPI que presentan al menos una de sus insaturaciones en configuración *trans*, la cual da lugar a un ángulo del enlace mayor que la configuración *cis*, de forma que la insaturación adquiere una disposición más parecida a un enlace simple que a un doble enlace *cis*, lo que confiere al AG en cuestión unas características más parecidas a las de un AGS que a un AG insaturado (AGI) (Figura 3).

Los AG *trans* se forman en las grasas y aceites principalmente durante la hidrogenación química, la refinación (principalmente durante la desodorización) y durante su calentamiento por encima de 180°C (Juanéda et al., 2003; Destailats et al., 2005). También se pueden formar de forma natural durante la biohidrogenación de los AG en el rumen de los animales rumiantes, de forma que la carne, leche y derivados de estos animales son una fuente importante de estos AG para el hombre, siendo el t11-18:1 o ácido vaccénico uno de los mayoritarios (Ledoux et al., 2007).

Un caso especial de AG *trans* son los AG que presentan dobles enlaces *trans/cis* conjugados, como se encuentra por ejemplo los isómeros geométricos y posicionales conjugados del ácido linoleico (CLA) (Figura 3), los cuales, al igual que los otros AG *trans* se forman durante la hidrogenación química, la refinación y el calentamiento (Schwarz, 2000; Juanéda et al., 2003; Destailats et al., 2005). Los CLA se forman también de forma natural, durante la biohidrogenación en el rumen o por la acción de las desaturasas en tejidos animales, siendo el *c9,t11*-CLA el isómero de CLA más abundante en los productos obtenidos de rumiantes (Grinari et al., 2000; Pariza et al., 2001).

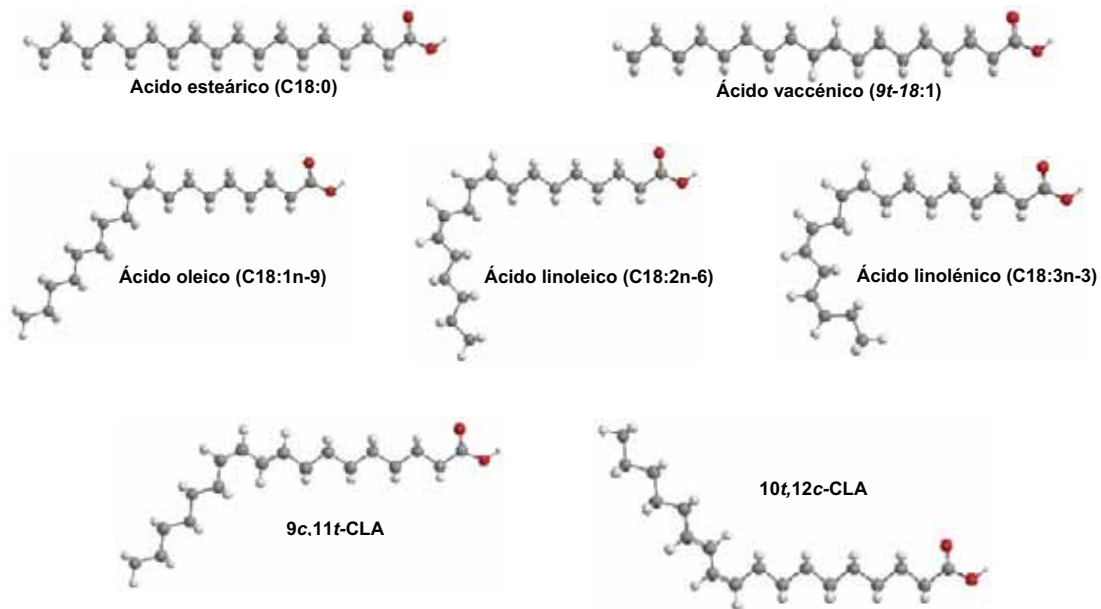


Figura 3. Estructuras moleculares de un ácido graso saturado (esteárico), uno monoinsaturado (oleico, C18:1n-9), ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, C18:2n-6 y linolénico, C18:3n-3), y ácidos grasos tipo *trans* (*t11-18:1*, *9c,11t-CLA* y *10t,12c-CLA*)

De los isómeros de CLA identificados en alimentos y en tejidos biológicos, sólo se ha atribuido actividad biológica a dos de ellos, el *c9,t11*-CLA y el *t10,c12*-CLA (Pariza et al., 2001; Evans et al., 2002; Wahle et al., 2004). A ambos se les ha atribuido un efecto inhibitor de la carcinogénesis, pero sólo el *t10,c12*-CLA ha mostrado ser efectivo frente a la obesidad, principalmente reduciendo la grasa total (Pariza et al., 2001; Evans et al., 2002). Este efecto ha sido observado en animales y cultivos

celulares, pero los estudios en humanos muestran resultados controvertidos, e incluso han indicado posibles efectos negativos en el perfil lipídico, en el metabolismo de la glucosa, en la función endotelial y en la oxidación lipídica (Evans et al., 2002; Salas-Salvadó et al., 2006; Combe et al., 2007). Además, los efectos de la suplementación con CLA a largo plazo siguen siendo poco conocidos (Evans et al., 2002; Salas-Salvadó et al., 2006), y debido a las diferencias en la efectividad de los diferentes isómeros, hay que tener en cuenta la composición y pureza de los suplementos utilizados, tanto para poder lograr los efectos deseados como por el desconocimiento de los efectos de otros isómeros que pudieran estar presentes en preparados de poca calidad.

2.1.3. Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos

Tanto la cantidad como la composición en AG de la dieta tienen una influencia importante sobre la composición en AG de los tejidos. Por ello, una mejora en la composición de la dieta puede traducirse en un perfil lipídico en los tejidos más beneficioso para la salud. Este es el motivo por el cual las recomendaciones de varios organismos no versan sólo sobre la cantidad de grasa que debe contener una dieta (entre el 20-35% de la energía), sino que también tienen en cuenta la composición de esta grasa. En este sentido se ha recomendado una reducción en el consumo de colesterol, AGS y AG *trans*, y un aumento en los AGPI (Food and Nutrition Board, 2005). Esto se debe a que el colesterol plasmático, especialmente el que se encuentra en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se ha relacionado con una mayor aterogénesis. El colesterol en la dieta, y especialmente la cantidad de AGS (principalmente los que poseen entre 12 y 16 átomos de carbono) y de AG *trans* incrementan el colesterol plasmático, siendo los AG *trans* los que tienen un mayor efecto hipercolesterolémico. De hecho, el riesgo de enfermedades cardiovasculares aumenta si el consumo de AG *trans* es superior al 2% de la energía (Combe et al., 2007), lo que ha llevado a recomendar que se evite el consumo de este tipo de AG para que en todo caso correspondan a menos del 2% de la energía (American Heart Association, 2001; Food and Nutrition Board, 2005). Los AGMI y los AGPI de la dieta

tienen el efecto contrario ya que reducen tanto el colesterol plasmático como los triglicéridos.

Tabla 1. Recomendaciones dietéticas respecto a los ácidos grasos poliinsaturados para adultos sanos.

Referencia	Ámbito	Recomendación
(World Health Organization (WHO), 2003)	Internacional	De la energía diaria: 6-10% AGPI 5-8% AGPI n-6 1-2% AGPI n-3
(Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO), 1994)	Internacional	Relación entre los ácidos linoleico y linolénico debe ser entre 5:1 y 10:1
(Simopoulos, 2002)	Internacional	En una dieta de 2000 kcal: Ácido linoleico 4,44 g/día Ácido linolénico 2,22 g/día EPA+DHA: 0,65 g/día EPA mínimo 0,22 g/día DHA mínimo 0,22 g/día
(National Heart Foundation, 1999; National Heart Foundation, 2001)	Australia	Comer pescado como mínimo dos veces por semana
(Health and Welfare Canada, 1990)	Canadá	Consumir entre 1,1-1,6 g/día en AGPI n-3
(Ministry of Health Labor and Welfare, 1999)	Japón	Relación entre n-3 y n-6 debe ser 4:1
(Nordic Council of Ministers, 1996)	Dinamarca, Finlandia, Noruega y Suecia	Los AG esenciales deben aportar el 3% de la energía, de los cuales como mínimo un 0,5% tiene que ser de los n-3
Institute of Medicine, Food and Nutrition Board (2005)	Estados Unidos de América	Ácido linoleico: 14-17 g/día Ácido linolénico: 1,1-1,6 g/día
American Heart Association (2002)	Estados Unidos de América	Comer pescado como mínimo dos veces por semana.

Abreviaciones: AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; EPA, eicosapentaenoico, C20:5n-3; DHA, docosahexaenoico, C22:6n-3

Pero además, las recomendaciones de ingesta de AG no sólo están dirigidas a un aumento en el consumo de AGPI, sino que se recomienda reducir el cociente n-6/n-3 a 10-5: 2 (Tabla 1), ya que el consumo de AGPI n-3 se ha relacionado con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Marchioli, 1999; Simopoulos, 2002; Siddiqui et al., 2008). Esto se debe a que los AGPI n-6 y n-3 de cadena larga no sólo compiten por el sistema enzimático de biosíntesis a partir de sus precursores, el cual tiene preferencia por los n-3, sino que también compiten por los enzimas responsables de la

síntesis de eicosanoides. Además, los eicosanoides derivados del ácido araquidónico (AA) y del ácido eicosapentaenoico (EPA) presentan actividades antagónicas en la inflamación y la vasoconstricción, siendo los derivados del AA más vasoconstrictores, protrombóticos, proinflamatorios y proagregantes plaquetarios (Simopoulos, 2002; Siddiqui et al., 2008). La diferente actividad de los eicosanoides derivados del AA y del EPA, junto con la acción de los AGPI n-3 a otros niveles, explica el interés de aumentar el consumo de AGPI n-3 para la prevención de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Kinsella et al., 1990; Simopoulos, 2002; Siddiqui et al., 2008). También se han descrito mejoras en patologías neurodegenerativas como la demencia y el Alzheimer (Morris et al., 2003), en patologías visuales como la degeneración macular (SanGiovanni et al., 2007), en la depresión (Harbottle et al., 2008), en los déficits de atención y en la dislexia (Sinn, 2008), entre otras (Ruxton et al., 2007). Además, el consumo de AGPI n-3 durante el embarazo, lactancia y los primeros años de vida se ha relacionado con un mejor desarrollo neuronal y una mejor agudeza visual en los niños. Muchos de estos efectos se atribuyen principalmente a los AGPI n-3 de cadena larga, como el EPA y el DHA. Pese a que éstos pueden ser biosintetizados en el organismo a partir del ácido linolénico, su biosíntesis, además de depender de la cantidad de ácido linolénico y de su competencia con el ácido linoleico por la $\Delta 6$ -desaturasa, es poco efectiva, especialmente en el caso del DHA (ver apartado 2.1.1), por lo que se obtienen mayores concentraciones en EPA y DHA si éstos se ingieren directamente de la dieta, por ejemplo, mediante el consumo de pescado o de alimentos enriquecidos en estos AG. Por todo ello se recomienda reducir el cociente n-6/n-3, y aumentar no sólo el consumo de AGPI n-3, sino también el de EPA y DHA, lo que dará lugar a una mejora en el perfil de AG en los tejidos que será favorable para la prevención de las patologías anteriormente comentadas.

2.2. Oxidación lipídica

2.2.1. La oxidación lipídica: mecanismos

La oxidación lipídica, ya sea por vía enzimática o no enzimática, es uno de los mecanismos responsables de la degradación de los lípidos y de la alteración de los productos que los contienen, como por ejemplo los productos cárnicos.

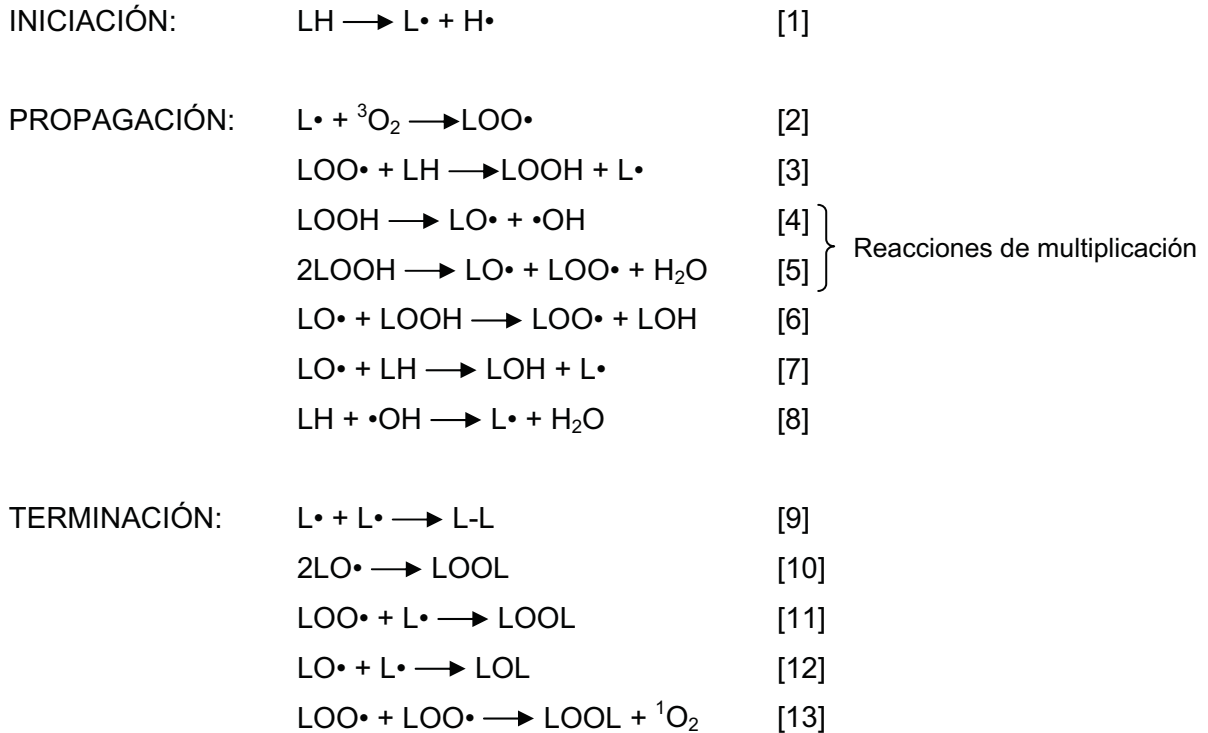
De forma esquemática, la oxidación lipídica es un proceso que implica la participación de AGI y el oxígeno, formándose hidroperóxidos de los AG (HPL) que acaban por descomponerse (con el tiempo, por la acción de altas temperaturas o por la acción de ciertas enzimas) en compuestos de oxidación secundaria, que suelen tener menos peso molecular y contener grupos carbonílicos, lo que los hace responsables de sabores desagradables, aunque también pueden dar lugar a dímeros y polímeros. Los procesos que tienen lugar durante la oxidación lipídica han sido ampliamente descritos y revisados por varios autores (Frankel, 1998; Min et al., 2005).

2.2.1.1. Iniciación por vía no enzimática

La oxidación por vía no enzimática puede tener lugar mediante dos mecanismos que implican diferentes formas del oxígeno: la autooxidación, con la participación del oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$, estado fundamental y más estable del oxígeno), y la fotooxidación, con la participación del oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$, estado excitado y más reactivo del oxígeno). En ambos mecanismos se forman HPL pero lo hacen de forma distinta ya que la reacción directa de los AGI con el oxígeno triplete está termodinámicamente impedida. Así, para que tenga lugar la autooxidación debe formarse un radical alquilo del AGI, el cual ya puede reaccionar con el oxígeno triplete [reacciones 1 y 2]. En cambio, en la fotooxidación, al reaccionar el oxígeno triplete con un fotosensibilizador en estado excitado pasa a oxígeno singulete, el cual puede reaccionar directamente con el AGI sin necesidad de formar radicales alquilo [reacción 15]. Aunque ambos mecanismos pueden tener lugar de forma simultánea, la

autooxidación es la más habitual y es la responsable primera de la alteración de las características nutritivas y sensoriales de los alimentos.

Figura 4. Esquema de la autooxidación de los ácidos grasos



L·, radical alquilo; ·OH, radical hidroxilo; LO·, radical alcoxilo; LOO·, radical peroxilo; LOOH, hidroperóxido lipídico

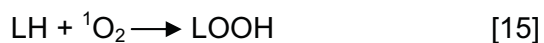
La autooxidación consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 4). La iniciación en la autooxidación tiene lugar mediante la formación de un radical alquilo a partir del AGI [reacción 1], reacción que requiere la aportación de energía o la acción catalítica de metales prooxidantes en estado libre como el hierro o el cobre [reacción 14].



Los radicales al tener un electrón desaparejado son especies muy reactivas y tienden a reaccionar con otras moléculas para estabilizarse. Así, el radical alquilo formado podrá reaccionar con el oxígeno triplete para dar un radical alcoxilo [reacción 2], el cual tenderá a estabilizarse reaccionando con otros AGI cercanos formando HPL [reacción 3].

La energía necesaria para abstraer el electrón y formar el radical alquilo es más baja en los carbonos en posición bis-alílica, siendo incluso menor cuantas más insaturaciones presenta el AGPI, lo que facilita la formación del radical en esta posición (Frankel, 1998; Min et al., 2005). Además, cuando el sustrato es un AGPI, la reacción del radical alquilo con el oxígeno triplete puede dar lugar a la formación de dobles enlaces conjugados y a dobles enlaces con configuración *cis* o *trans* resultantes de la reorganización electrónica en el AGPI. La isomerización de los AG puede también tener lugar cuando los HPL se deshidratan, por ejemplo durante refinación de las grasas y aceites en las etapas de desodorización y decoloración en las que se usan temperaturas muy altas.

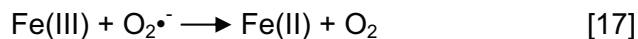
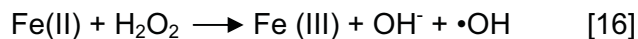
Para que tenga lugar la fotooxidación en un alimento, el oxígeno triplete debe pasar a oxígeno singulete mediante la reacción con un fotosensibilizador en estado excitado en el alimento. Estas sustancias fotosensibilizadoras son moléculas con un elevado número de dobles enlaces en su estructura (clorofila, hematoporfirinas, flavinas...), que pueden pasar a un estado excitado mediante la absorción de la luz (principalmente UV, aunque también la visible).



La iniciación de la oxidación y formación de un radical alquilo puede tener lugar también por reacción directa del radical hidroxilo con los AGI, ya que este radical es altamente reactivo [reacción 8].

Los radicales hidroxilo pueden originarse en la descomposición de los HPL [reacción 4], pero también se pueden generar *in vivo* como consecuencia de irradiaciones, la

descomposición del peroxinitrito y por la xantin-oxidasa. Además existen otras especies de oxígeno reactivo que pueden iniciar la oxidación tanto *in vivo* como en los alimentos (Frankel, 1998; Min et al., 2005). Entre ellas encontramos por ejemplo el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical perhidroxilo ($H_2O^{\cdot-}$) y el ácido hipocloroso (ClOH). Estas especies son radicales o bien contienen grupos de oxígeno reactivo. Se producen durante el metabolismo aeróbico de las células, por algunas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), o en procesos inflamatorios. Estas especies no sólo inician la oxidación *in vivo* por ellas mismas, sino que además algunas pueden ser convertidas a radical hidroxilo ($\cdot OH$) que puede atacar a moléculas biológicas cercanas como proteínas, ADN, fosfolípidos... Por ejemplo, éste puede proceder de la descomposición del H_2O_2 , catalizada por iones metálicos como el hierro (II) mediante la reacción de Fenton [reacción 16]. La presencia de reductores como el anión superóxido o el ascórbico favorece esta reacción regenerando el hierro (II) [reacción 17] (Min et al., 2005). Además, el hecho que el hierro forme parte de ciertas macromoléculas facilita que sean atacadas por los radicales hidroxilo recién formados.



2.2.1.2. Iniciación por vía enzimática

La iniciación de la oxidación por vía enzimática está catalizada por unas enzimas, las lipooxigenasas, que catalizan la oxidación de AGI a HPL. Esta reacción tiene las características de las reacciones enzimáticas, como la especificidad de sustrato, la selectividad en la formación de HPL, un pH y temperatura óptimos para la actuación de la enzima y la pérdida de actividad tras su desnaturalización. Así, las lipooxigenasas peroxidán solo los AG con un sistema pentadieno 1-*cis*, 4-*cis*. Esta especificidad no se encuentra en los mecanismos de iniciación por vía no enzimática,

que pese a producirse más fácilmente cuántas más insaturaciones presentan los AGPI, pueden tener como sustrato cualquier AGI y formar una gran variedad de HPL.

Además hay otros sistemas enzimáticos que pueden dar lugar a varias especies reactivas capaces de iniciar y propagar la oxidación. Entre ellos encontramos la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (que pueden generar el anión superóxido), la óxido nítrico sintasa (puede, en ciertas circunstancias, generar anión superóxido y formar peroxinitrito) o la mieloperoxidasa (que genera especies radicalarias y oxidantes como ácido hipocloroso). El ácido hipocloroso y el peroxinitroso son altamente oxidantes y atacan más fácilmente a proteínas que a lípidos (Stocker et al., 2005).

2.2.1.3. Descomposición de los HPL

Los diferentes mecanismos de inicio de la oxidación dan lugar a la producción de HPL. Éstos son bastante inestables y se degradan por diferentes vías dando lugar a una gran variedad de compuestos de tipo monomérico, polimérico y, compuestos de bajo peso molecular muchos de ellos volátiles que suelen contener grupos carbonílicos, los cuales son responsables del flavor de deterioración de las grasas.

La descomposición de los HPL suele cursar mediante su fragmentación por homólisis [reacciones 4 y 5], favorecida en presencia de calor, radiaciones o iones metálicos, formando radicales libres del tipo peroxilo ($\text{LOO}\cdot$), alcoxilo ($\text{LO}\cdot$) o hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que a su vez pueden reaccionar con otros radicales, con el oxígeno o atacar a otros HPL, AG e incluso a otros productos de oxidación formados [reacciones 6-8] y dar nuevos radicales propagando así la cadena y dando lugar a una gran variedad de compuestos. Además, como resultado de estas interacciones los radicales pueden sufrir reorganizaciones electrónicas, lo que puede dar lugar a isomerizaciones y a la formación de cicloendoperóxidos, principalmente en radicales peroxilo formados de AGI con 3 o más insaturaciones (Frankel, 1998; Niki et al., 2005). Finalmente se pueden también formar oligómeros de AG o de TG como resultado de las interacciones entre radicales lo que da lugar a la terminación de la cadena radicalaria [reacciones 9-13] (Frankel, 1998).

Así, puede obtenerse una gran variedad y cantidad de productos de oxidación a raíz de la degradación de los HPL como consecuencia de la gran variedad de radicales formados y de interacciones que pueden haber entre ellos y con otras moléculas no radicalarias. El tipo de productos formados y por lo tanto el flavor de degradación de grasas dependen tanto de las condiciones en que tiene lugar la oxidación (temperatura, O₂, radicaciones...) como de la cantidad y tipo de AG oxidables. La reacción 4 por la que se forma el radical hidroxilo está termodinámicamente impedida, pero es importante a altas temperaturas. Por otro lado, la reacción 5 es poco importante en los alimentos, pues necesita una cantidad tal de HPL que cuando fuera alcanzada el alimento sería incomedible.

Pero hay que tener en cuenta que los radicales formados en la descomposición de los HPL al ser altamente reactivos (especialmente el radical hidroxilo) además de reaccionar con otro radical (lo que terminaría la cadena) o con un AG para estabilizarse, también pueden reaccionar con otras moléculas como las proteínas, vitaminas, el colesterol e incluso el ADN (Frankel, 1998; Guardiola et al., 2002), lo que tiene importancia no sólo en los alimentos, sino también *in vivo*, ya que puede afectar a la actividad biológica de estas moléculas.

2.2.1.4. Termooxidación

La oxidación de los AG, principalmente la autooxidación, se acelera considerablemente cuando tiene lugar a temperaturas muy altas, como por ejemplo las usadas en un proceso de fritura, ya que la temperatura es uno de los factores que pueden iniciar la reacción radicalaria y que favorecen la descomposición de los HPL. Pero además, al calentar una grasa o aceite a alta temperatura se reduce la concentración de oxígeno porque se reduce su solubilidad, siendo éste limitante, lo que modifica el tipo de reacciones radicalarias que tienen lugar.

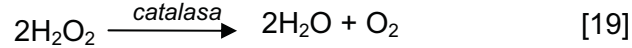
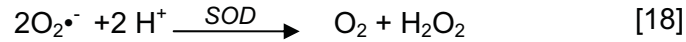
Así, la temperatura y la baja concentración de oxígeno favorecen la formación de radicales alquilo [reacción 1], mientras que la formación del radical peroxilo [reacción 2] está disminuida. Los HPL formados se descomponen rápidamente debido a la

temperatura. Además la termooxidación de AGPI favorece la isomerización, dando lugar a una aparición de AG *trans* y dobles enlaces conjugados. Así se forman un gran número de compuestos volátiles y no volátiles por oxidación térmica, hidrólisis y ciclación, entre los cuales se encuentran los monómeros cíclicos, destacables por sus efectos nocivos para la salud. La formación de AG *trans* del ácido linolénico en aceites ha sido descrita al ser éstos calentados por encima de 180°C (Juanéda et al., 2003; Bou et al., 2005b).

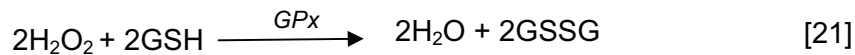
A altas temperaturas, las reacciones de terminación por interacción entre radicales que dan lugar a la formación de oligómeros adquieren más importancia que a temperatura ambiente o bajas temperaturas. Además, las reacciones de polimerización pueden tener lugar a altas temperaturas por mecanismos no radicalarios, como por ejemplo mediante reacciones de Diels-Alder entre dos AG que contengan dienos conjugados, o entre un AG con dieno conjugado y otro AGPI. Así, se pueden encontrar oligómeros polares y no polares en función de que tengan o no grupos oxigenados en su estructura. Por ello, los oligómeros son el grupo predominante entre los productos de oxidación no volátiles en grasas sometidas a altas temperaturas.

2.2.2. Antioxidantes

La oxidación lipídica tanto en los alimentos como *in vivo* puede ser evitada o frenada por la acción de los antioxidantes. Entre ellos encontramos tanto sustancias naturales (como el α -tocoferol (α T), el ácido ascórbico o la ubiquinona), las cuales tienen también un papel antioxidante *in vivo* muy importante; y artificiales (como el butilhidroxianisol, el ácido etilendiamintetraacético o EDTA, entre otros) (Decker, 2008). Existen también varios enzimas, de gran relevancia biológica, cuya actividad consiste en la destrucción de productos de oxidación. Tienen diferente estructura, especificidad de sustrato, actividad y localización. Uno de ellos es la superóxido dismutasa (SOD), que pasa el anión superóxido a peróxido de hidrógeno [reacción 18] que será entonces degradado por la catalasa [reacción 19].



También existen una serie de enzimas reductoras de HPL como la selenoproteína P en plasma, la tioredoxina reductasa, la peroxiredoxina, y la glutatión transferasas celulares, o la glutatión peroxidasa (GPx) de la cual existen 4 formas: gastrointestinal, extracelular, celular y una específica para HPL en fosfolípidos (Niki et al., 2005). En varias especies animales, la GPx tiene como cofactor al selenio, y utiliza el glutatión (GSH) para reducir los HPL a los correspondientes alcoholes [reacción 20] o bien para degradar el peróxido de hidrógeno [reacción 21].



Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser de naturaleza lipo o hidrosoluble. Según su modo de actuación se pueden dividir en primarios y secundarios, aunque algunos como la ubiquinona o la carnosina ejercen su acción por ambos mecanismos, primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios actúan gracias a su capacidad para ceder átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres formados durante la oxidación, de modo que éstos pasan a especies más estables y, aunque se forme un radical en la molécula de antioxidante, éste es poco reactivo porque el electrón desaparejado queda estabilizado por la deslocalización electrónica que ofrece su estructura (Decker, 2008). Además, estos antioxidantes pueden unirse a los radicales formando complejos estables. De este modo frenan la evolución de la oxidación tanto inactivando a los radicales como evitando que se formen productos de oxidación secundaria.

El antioxidante primario natural por excelencia es el α T cuyo sitio activo es el hidrógeno situado en la posición 6 el cual debe estar libre, no esterificado, para poder

ejercer su acción antioxidante. Su eficacia en membranas y en la LDL disminuye a medida que el radical se encuentra más hacia el interior de éstas ya que, pese a ser liposoluble, el hidrógeno activo del α T debe quedar situado en la interfase lípido-agua (Niki et al., 2005). Además del α T hay otras isoformas que también poseen actividad antioxidante y actividad vitamínica E (Figura 5). Entre ellas, el α T es el que presenta una mayor actividad vitamínica, y bajo ciertas condiciones también presenta una mayor actividad antioxidante, aunque hasta el momento se desconoce si los diferentes homólogos pueden actuar frente a la oxidación por otras vías a parte de la neutralización radicalaria (Niki, 2007). Sin embargo, ciertos estudios *in vitro* han encontrado un efecto prooxidante del tocoferol, efecto que no tendría lugar *in vivo* gracias a su regeneración por el ubiquinol-10 o el ácido ascórbico (Niki et al., 2005).

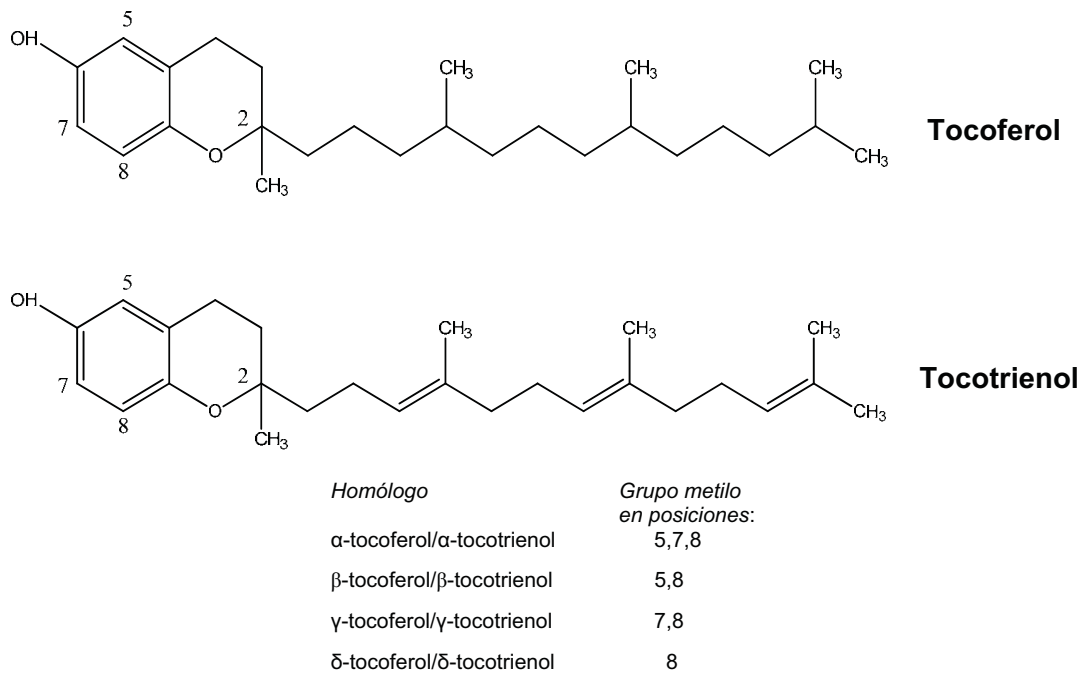


Figura 5. Estructura de los tocoferoles y tocotrienoles

Otro antioxidante primario con una acción importante, especialmente *in vivo*, es el GSH. Se trata de un tripéptido que inhibe la oxidación mediante la captación de radicales libres, aunque su principal actividad es ceder electrones para que la GPx

pueda descomponer los HPL y el H_2O_2 en compuestos no prooxidantes [reacciones 20 y 21] (Sciuto, 1997). También participa en la regeneración de antioxidantes como el ácido ascórbico (Figura 6).

Los antioxidantes secundarios pueden actuar por varios mecanismos:

- Regenerando un antioxidante primario, cediendo electrones o átomos de hidrógeno a sus radicales, de forma que alargan la vida útil del antioxidante primario (Figura 6).
- Quelando iones metálicos, para evitar que catalicen la oxidación.
- Facilitando un entorno ácido, lo que aumenta la actividad de los antioxidantes primarios.
- Captando oxígeno, para evitar que participe en la oxidación lipídica.

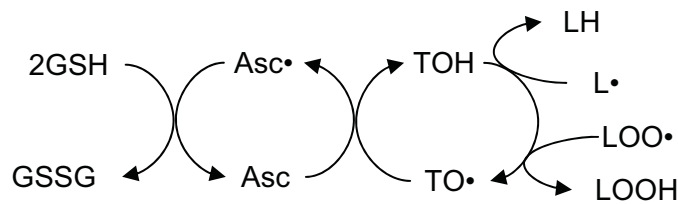


Figura 6. Inactivación de radicales por el α -tocoferol, y su regeneración mediante el ácido ascórbico y el glutatión.

GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; Asc, ácido ascórbico; Asc•, radical ascorbilo; TOH, α -tocoferol; TO•, radical tocoferoxilo; LH, lípido insaturado; L•, radical alquilo; LOO•, radical peroxilo; LOOH, hidroperóxido

Uno de los antioxidantes secundarios por excelencia es el ácido ascórbico, que ejerce su actividad por varios mecanismos: capta oxígeno, reduce HPL a alcoholes más estables e inactiva metales quelándolos. Pero su mecanismo de actuación más importante *in vivo* la regeneración del α T dando átomos de hidrógeno a su radical tocoferoxilo, siendo él regenerado a su vez por la acción de enzimas a expensas del GSH (Figura 6). Estos efectos se observan a altas concentraciones de ácido ascórbico, sin embargo cuando éstas son bajas podría comportarse como prooxidante, ya que al ser reductor puede reducir metales como el Fe (III) y el Cu (II) a Fe (II) y Cu

(I), los cuales participan en la reacción de Fenton [reacción 16] (Decker et al., 1998; Min et al., 2005).

La ubiquinona es otro antioxidante que puede ejercer su acción, bien estabilizando radicales, y mediante la regeneración del α T de un modo similar al del ácido ascórbico.

2.2.3. Consecuencias de la oxidación lipídica

2.2.3.1. Consecuencias de la oxidación lipídica en carnes

El desarrollo de la oxidación en la fracción lipídica de los alimentos es una de las principales reacciones de deterioración, ya que reduce su vida útil y su calidad nutritiva y sensorial. La oxidación puede suponer una pérdida de AG y vitaminas (como el α T) del alimento. Estas pérdidas adquieren más importancia cuando se trata de AG esenciales (linoleico y linolénico) o con efectos beneficiosos para la salud (EPA y DHA especialmente).

Desde el punto de vista sensorial, la oxidación lipídica está relacionada con la oxidación de los pigmentos. Este hecho es muy importante en carnes y derivados cárnicos ya que influye en la compra del producto por parte del consumidor. Además, el flavor y aroma de los alimentos, y en particular de la carne, pueden estar también alterados por los productos secundarios de oxidación que aparezcan, los que a su vez dependerán de los procesos que tengan lugar en la carne, del balance entre prooxidantes y antioxidantes, y de los sustratos oxidables (principalmente del tipo de AG). Ciertos compuestos secundarios de oxidación de tipo carbonílico causan la aparición del flavor a recalentado (*warmed-over flavor, WOF*) que se desarrolla rápidamente en carne cocida, principalmente durante su almacenamiento, y acorta la vida comercial del producto (Gray et al., 1996). Tras la aparición del WOF surgen el flavor y aroma a rancio, también debidos a la oxidación lipídica, los cuales pueden aparecer también en carne cruda. Algunos compuestos volátiles de oxidación que aportan aromas y sabores extraños en los alimentos difieren según el tipo de AG que se oxida. Así, los compuestos volátiles mayoritarios derivados de la oxidación del

ácido oleico son el nonanal y el octanal, mientras el ácido linoleico produce principalmente hexanal (Frankel, 1998).

Desde el punto de vista nutricional, la oxidación lipídica implica una disminución en el aporte de AG esenciales, y de vitaminas antioxidantes sensibles a este proceso, por ejemplo la vitamina E, el β -caroteno o el ácido ascórbico. Además, la oxidación puede producir una pérdida de aminoácidos esenciales, ya que los productos de oxidación pueden interaccionar con ellos. Estas interacciones pueden resultar también en cambios sensoriales, afectando a la textura, disminuyendo la solubilidad de proteínas y produciendo cambios de color.

Por otra parte hay que tener en cuenta que se han descrito efectos biológicos negativos para muchos productos de oxidación de los AG y del colesterol (ver apartado 2.2.3.2).

Por todo ello, la estabilidad oxidativa de la carne y sus productos derivados, especialmente los precocidos, es un problema que concierne a todos los profesionales implicados en la cadena de producción de alimentos. En consecuencia el conocimiento y control de los procesos que favorecen la oxidación lipídica es un desafío importante ya que de ello depende la calidad nutritiva y sensorial de los productos (Morrissey et al., 2003).

2.2.3.2. Efectos biológicos de los productos de oxidación

Además de afectar a la calidad nutritiva y sensorial de los alimentos y a su vida útil, la oxidación lipídica tiene efectos negativos para la salud humana y animal. Éstos se producen a tanto en el tracto digestivo como a nivel sistémico. La alta presencia de productos de oxidación en el tracto digestivo puede disminuir la digestibilidad, tener un efecto irritante de la mucosa y producir malabsorción (Esterbauer, 1993; Marquez-Ruiz et al., 1996). Algunos productos de oxidación también actúan a nivel sistémico, ya sean absorbidos a través del tracto intestinal o formados *in vivo*, ejerciendo diversos efectos biológicos, muchos de ellos negativos (Esterbauer, 1993; Spiteller, 2006).

Se han realizado muchos estudios con animales en cuyas dietas se habían incorporado aceites de fritura o aceites calentados. A pesar de que en muchos de estos estudios las dosis de grasa incorporadas en pienso fueron muy superiores a las dosis habituales, o bien se usaron aceites con un nivel de oxidación tan avanzado que sobrepasaría los límites legales de algunos países, o se comprometía el aporte de AG esenciales, son pocos los que observaron efectos negativos sobre la salud del animal. Algunos encontraron incrementos en la mortalidad, alteraciones en el crecimiento del animal o en el peso de algunos órganos (hígado, riñones...). Estos efectos pueden ser atribuidos a las altas dosis de grasa utilizadas, a la falta de AG esenciales y de vitamina E y, a la aparición de diarreas y malabsorción de nutrientes debidas a la menor digestibilidad de los polímeros y dímeros presentes en estas grasas respecto a la digestibilidad de los triglicéridos inalterados (Esterbauer, 1993; Marquez-Ruiz et al., 1996; Billek, 2000). Así, según el diseño y los resultados de estos estudios, no parece ser que los aceites oxidados presenten un riesgo evidente para la salud, y más cuando proceden de prácticas comerciales adecuadas (Billek, 2000).

Tabla 2. Principales compuestos de degradación de los ácidos grasos formados en los aceites de fritura y los efectos en el organismo tras su ingestión

Compuestos de degradación	Abundancia en aceites de fritura	Efectos en el organismo
Hidroperóxidos	Baja (se forman a bajas temperaturas y se degradan a temperaturas elevadas)	Disfunción de enzimas de la mucosa intestinal Inducción de proliferación celular en el colon
Epóxidos, ácidos grasos y triglicéridos oxidados	Moderada (presentes a bajas temperaturas)	Hipertrofia hepática Disfunción de enzimas hepáticos
Compuestos secundarios (carbonílicos)	Moderada-Alta	Hepatotoxicidad, mutagenicidad
Monómeros cíclicos oxidados	Moderada-Baja (formados a altas temperaturas)	Reducción del crecimiento Aumento de la mortalidad
Dímeros y oligómeros no oxidados	Moderada-Alta (formados a 200°C y bajo O ₂)	Diarrea y malabsorción
Dímeros oxidados	Predominantes (a alta temperatura, con aireación)	Reducción del crecimiento
Oligómeros oxidados	Predominantes (a alta temperatura, con aireación)	Reducción del crecimiento
Productos de oxidación del colesterol	Variable	Inhibición de la HMG-CoA reductasa Aterogénesis Citotoxicidad/Mutagénesis

(Boatella et al., 2000)

En otros estudios se ha trabajado incorporando las diferentes fracciones alteradas de los aceites oxidados a la dieta de los animales. Pese que a menudo las dosis utilizadas son también muy altas, los resultados indican que la mortalidad y las alteraciones en el crecimiento y en el peso de los órganos pueden atribuirse a la fracción polar de las grasas calentadas o de fritura (Marquez-Ruiz et al., 1996; Billek, 2000). Varios de los componentes de esta fracción polar han producido efectos negativos en el organismo (Tabla 2).

Por esto muchas normativas han regulado la utilización de grasas y aceites calentados limitando el contenido de compuestos polares a un máximo entre el 24-27%, <25% en España (Boletín Oficial del Estado, 1989). Pero algunos expertos recomiendan además limitar y controlar el contenido en polímeros (<12%, (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (German Society for Fat Science), 2000) y, en varios países como Austria, Bélgica o Alemania se recomienda controlar otros parámetros como el índice de acidez o el punto de humo, además del porcentaje de compuestos polares (Firestone, 2004).

Tabla 3. Principales efectos biológicos de los productos de oxidación del colesterol

Efectos biológicos de los productos de oxidación del colesterol	Inhibición de la HMG-CoA reductasa
	Efectos sobre otros enzimas que participan en el metabolismo del colesterol
	Efectos sobre la estructura y funcionalidad de la membrana celular
	Citotoxicidad
	Efectos mutagénicos y carcinogénicos
	Efectos sobre el sistema inmunológico
	Efectos sobre la permeabilidad vascular
	Efectos sobre la síntesis de prostaglandinas, agregación plaquetaria y reactividad vascular
	Efectos sobre el número y función de los receptores LDL
	Inducción de la acumulación de ésteres de colesterol y de la formación de células espumosas en el endotelio vascular

(Guardiola et al., 2002)

Son varios los productos de oxidación lipídica a los que se han atribuido efectos biológicos negativos. Entre ellos destacan los derivados de los AG (compuestos aldehídicos, monómeros cíclicos e hidroperóxidos) (Tabla 2) y los derivados del colesterol (Tabla 3), los que varios estudios han relacionado con la progresión de la lesión aterosclerótica (Esterbauer, 1993; Marquez-Ruiz et al., 1996; Billek, 2000; Guardiola et al., 2002). Los derivados oxidados del colesterol y algunos productos de oxidación de los AG (como los HPL, y algunos compuestos de oxidación secundaria como el MDA) pueden formarse *in vivo* y así ejercer su acción biológica en el organismo, o bien pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal en cantidades variables cuando estén presentes en los alimentos (Esterbauer, 1993; Kanazawa et al., 1998; Billek, 2000; Guardiola et al., 2002; Del Rio et al., 2005; Marquez-Ruiz et al., 2008).

Los HPL y los productos secundarios de tipo carbonílico se encontrarán en los alimentos en función de cómo se haya producido la oxidación en ellos o en sus ingredientes. Sin embargo la absorción de los HPL es escasa ya que se descomponen en el tracto gastrointestinal a hidroxiácidos, epoxicetonas y aldehídos (Kanazawa et al., 1998), o bien son reducidos por la GPx gastrointestinal a productos menos reactivos como alcoholes o aldehídos (Aw, 2005). Estos productos derivados de los HPL podrán ser absorbidos de forma más efectiva (Kanazawa et al., 1985; Kanazawa et al., 1998; Suomela et al., 2005; Marquez-Ruiz et al., 2008). Algo similar sucede con los compuestos con grupos epoxi, los cuales en el estómago se escindirían dando los correspondientes dioles, que serán mejor absorbidos (Marquez-Ruiz et al., 2008).

Pero los HPL y los radicales pueden formarse también *in vivo*. Su presencia en plasma y tejidos se ha relacionado con varias patologías degenerativas (como el Alzheimer) e inflamatorias (como la artritis), algunas formas de cáncer (Niki et al., 2005; Spiteller, 2006), y el avance de la aterosclerosis, aunque su efecto patológico en la aterogénesis no está todavía resuelto, ya que parece ser que más que su causa podrían ser su consecuencia, favoreciendo su avance (Niki et al., 2005; Stocker et al., 2005). Los compuestos secundarios de oxidación de tipo aldehídico, principalmente el MDA y los 4-hidroxi-alquenos, se han relacionado con efectos como citotoxicidad,

mutageneidad, desarrollo de procesos inflamatorios, interacción con proteínas, inhibición de la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Esterbauer, 1993; Del Rio et al., 2005; Kanner, 2007; Marquez-Ruiz et al., 2008). Hay que destacar que muchos de los efectos de los compuestos de oxidación se deben a su interacción con otras moléculas biológicas, como proteínas, vitaminas, colesterol y ADN, alterando sus funciones (Del Rio et al., 2005). Estos efectos pueden tener lugar a nivel sistémico, así como en el tracto gastrointestinal, por lo que se ha relacionado este tipo de productos con ciertos tumores gastrointestinales (Esterbauer, 1993; Marquez-Ruiz et al., 2008).

Otros productos de oxidación como los monómeros cíclicos y los oligómeros se formaran principalmente al someter los alimentos o en sus ingredientes a temperaturas muy elevadas (ver apartado 2.2.1.4), y ejercerán su acción a nivel sistémico en función de su grado de absorción, bajo en el caso de los oligómeros, y más alto en los monómeros cíclicos. Así, los efectos de los oligómeros se deben principalmente a su baja digestibilidad, y a la alteración de la microflora intestinal (Marquez-Ruiz et al., 2008). Para los monómeros cíclicos se han descrito efectos relacionados con la alteración de la estructura y funcionalidad de la membrana celular, así como alteraciones en el metabolismo lipídico en el hígado.

A pesar de que los estudios de toxicidad no hayan mostrado que los aceites oxidados sean un riesgo evidente para la salud, hay que tener en cuenta los múltiples efectos biológicos negativos demostrados para los diferentes compuestos de oxidación. Además, es difícil evaluar el riesgo real que suponen para las personas estos compuestos de oxidación ya que, aparte de las limitaciones al extrapolar resultados en estudios animales a los humanos, las personas están expuestas, en mayor o menor grado, a estos productos a lo largo de toda su vida y, todavía no hay estimaciones fiables sobre las cantidades ingeridas de los diferentes compuestos de oxidación lipídica.

2.2.4. Factores que influyen sobre la oxidación lipídica en carnes

Debido a las repercusiones de la oxidación lipídica sobre la calidad nutritiva y sensorial de la carne, y a los efectos biológicos relacionados con ciertos productos de oxidación, es importante conocer los factores que influyen en el desarrollo de la oxidación tanto en el músculo *in vivo* como *post-mortem*. El avance de la oxidación lipídica en la carne dependerá de los factores implicados directamente en la oxidación: los sustratos oxidables y el balance entre especies antioxidantes y prooxidantes (Figura 7). Pero además hay que tener en cuenta que las operaciones de procesado, almacenamiento y tratamiento por calor de la carne también tienen una clara influencia en el desarrollo de la oxidación en carnes y por lo tanto en su calidad nutritiva y sensorial. Así, los factores que influyen en la oxidación lipídica en carne los podemos dividir en cuatro grupos: los que afectan al sustrato, los catalizadores, los antioxidantes y las operaciones de procesado.

2.2.4.1. Factores relacionados con los sustratos

Los principales sustratos para la oxidación lipídica son los AGI y el oxígeno. Tal como se ha comentado en el apartado 2.2.1 la reacción del oxígeno triplete con el AGI está termodinámicamente impedida por lo que se necesita o formar un radical alquilo del AG (autooxidación) o activar el oxígeno por un fotosensibilizador (fotooxidación) (Figura 7). Además, también puede oxidarse el AG por la acción de algunas enzimas como las lipooxigenasas.

Los AGPI son más fácilmente oxidables cuando más insaturados son. La cantidad y tipo de AG en la carne depende fundamentalmente de la composición en AG de la dieta (ver apartado 2.3.1). Cambiando el tipo de grasa incorporada en la dieta se puede modificar la composición en AG en los tejidos animales y por lo tanto en la carne.

Una mejora en la estabilidad oxidativa de la carne se conseguiría mediante una reducción en su contenido en AGPI. Sin embargo, nutricionalmente se prefiere este

tipo de AG frente a otros más saturados. Por ello, como alternativas al uso de grasas saturadas en pienso se han propuesto usar grasas insaturadas como el aceite de pescado pero ajustando las dosis incorporada al pienso, cambiar total o parcialmente una grasa más insaturada por otra menos insaturada (aceite de pescado por linaza), o modificar la composición lipídica de la dieta en los últimos días antes del sacrificio del animal (ver apartado 2.3.1.1).

Otro de los factores sobre los que podemos incidir para controlar la oxidación en carnes es la presencia de oxígeno. Por ello se ha propuesto realizar las operaciones de procesado en atmósferas con una baja concentración de oxígeno. También durante el almacenamiento el envasado al vacío o en atmósferas modificadas puede contribuir a aumentar la estabilidad oxidativa, aunque si la presión de oxígeno es muy baja puede formarse metamioglobina y alterar el color de la carne. Además si se protege la carne de la luz se puede reducir la activación de oxígeno triplete a singulete el cual sería capaz de formar HPL directamente de un AGI [reacción 15] (Figura 7).

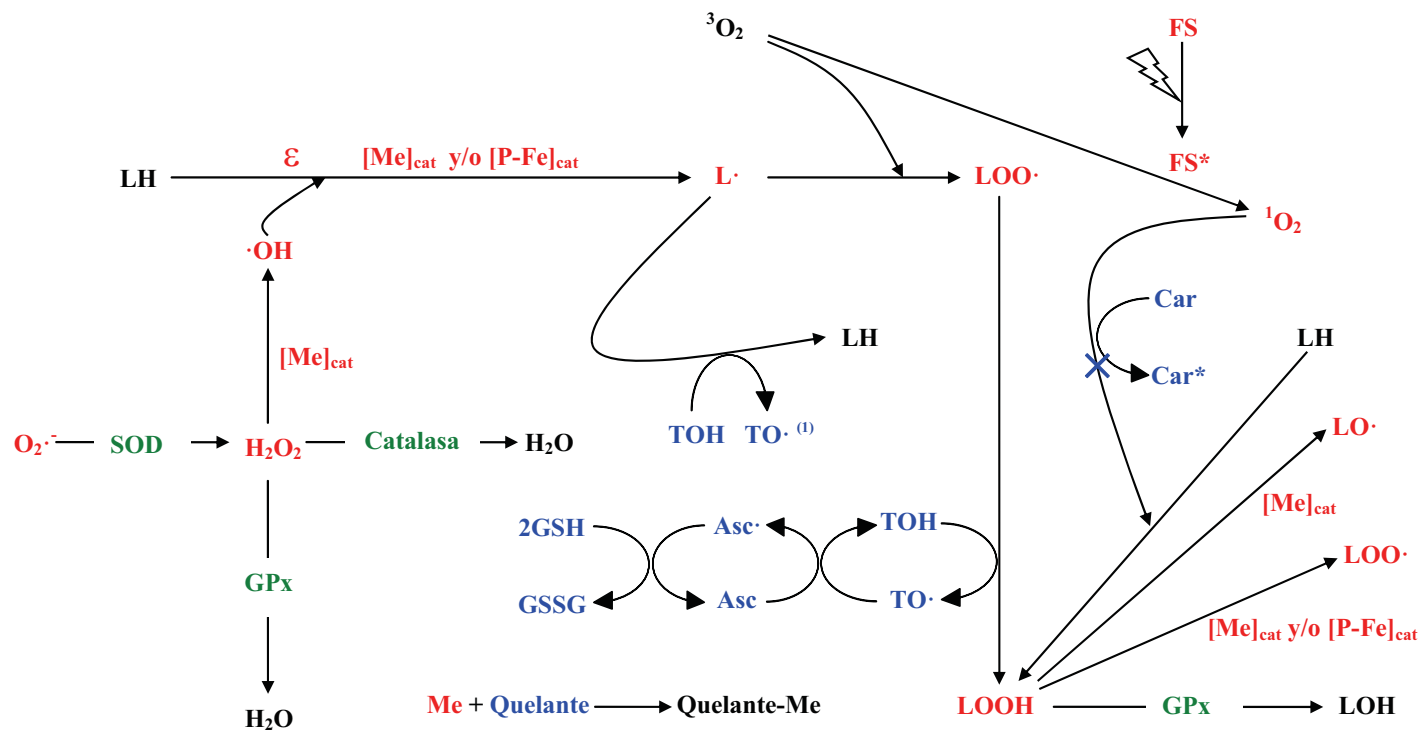


Figura 7. Esquema de los principales factores que influyen sobre la oxidación lipídica en carnes y las reacciones implicadas.

Letras en rojo indican factores prooxidantes, en azul factores antioxidantes, en verde enzimas antioxidantes y en negro compuestos sin actividad pro o antioxidante. LH, lípido insaturado; L•, radical alquilo, LO•, radical alcoxilo, LOO•, radical peroxilo; LOOH, hidroperóxido; FS, fotosensibilizante; FS*, fotosensibilizante excitado; Car, carotenoide; Car*, carotenoide excitado; LOH, hidroxiácido; ε, energía; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; Me, metales libres; [Me]_{cat}, reacción catalizada por metales libres; [P-Fe], moléculas con núcleo ferroporfirínico; [P-Fe]_{cat}, reacción catalizada por moléculas con núcleo ferroporfirínico; •OH, radical hidroxilo; O₂^{•-}, radical superóxido; TOH, tocoferol; TO•, radical tocoferoxilo; Asc, ácido ascórbico; Asc•, radical ascorbilo; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado

⁽¹⁾ Puede ser regenerado por ácido ascórbico, glutatión y ubiquinona

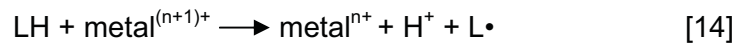
2.2.4.2. Catalizadores

Son varios los factores que pueden catalizar la oxidación en la carne: metales de transición, metaloproteínas y enzimas (Figura 7).

Como se ha comentado anteriormente, los metales de transición pueden ser promotores de la oxidación radicalaria gracias a su capacidad de transferencia electrónica por los cambios en su estado de oxidación (ver apartado 2.2.1.1).

Los principales mecanismos de acción de los metales en estado libre en la oxidación lipídica en carne son (Figura 7) (Erickson, 2007):

- Pueden iniciar la oxidación generando radicales por reacción con la molécula lipídica [reacción 14]. Pero esta reacción se da de forma lenta, por lo que la influencia de los metales a través de ella tiene poca importancia en el inicio de la oxidación lipídica.

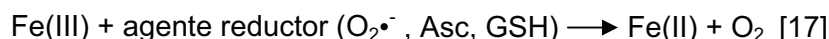
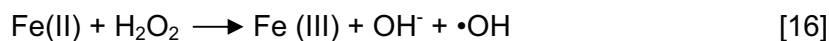


- Catalizan la descomposición de HPL para dar lugar a radicales libres promoviendo así la oxidación. Esta reacción puede darse tanto con los metales en estado reducido [reacción 22] como oxidado [reacción 23], siendo el estado reducido el que la lleva a cabo de forma más rápida.



- Pueden formar radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton [reacción 16], los cuales al ser muy reactivos pueden catalizar la oxidación lipídica formando nuevos radicales y atacar a otras moléculas biológicas cercanas, como vitaminas, proteínas, colesterol, etc. La reacción de Fenton está además

está favorecida en presencia de reductores que pueden regenerar los metales [reacción 17]. El radical hidroxilo puede proceder también de la reducción del peróxido de hidrógeno por el complejo ADP-Fe (Frankel, 1998).



- Pueden reducir la capacidad antioxidante del tejido al oxidar a agentes reductores como el ácido ascórbico, el α T, la cisteína o el GSH.

El hierro en los organismos se encuentra en su mayoría formando parte de la hemoglobina y la mioglobina. También se encuentra unido a proteínas como la transferrina, la ferritina y la hemosiderina. Sólo una pequeña parte del hierro en el organismo se encuentra no unido a estas proteínas, aunque está unido a pequeñas moléculas como el ATP, ADP, ciertos ácidos orgánicos como el cítrico, o a lípidos de membrana. El caso del cobre es similar ya que puede encontrarse unido a proteínas como la ceruloplasmina, mientras que en estado libre está quelado por la carnosina y otros péptidos.

Por lo general, los metales están unidos a proteínas en su forma oxidada, menos reactiva, lo que junto con el impedimento estérico provocado por esta unión disminuye la capacidad de los metales para entrar en el ciclo redox (Dunford, 1987). Sin embargo, el hierro hémico puede también participar en reacciones de oxidación lipídica por mecanismos diferentes a los descritos para el hierro no hémico (Rhee, 1988; Belitz et al., 2009).

Por ejemplo el complejo protoporfirina- Fe^{2+} (P-Fe^{2+}) puede oxidarse con el oxígeno y formar el anión superóxido y el complejo P-Fe^{3+} (Figura 8). Este complejo formado puede reaccionar con el H_2O_2 (que puede proceder de la dismutación del radical superóxido) para formar la especie oxen (Belitz et al., 2009) la cual es muy oxidante y puede oxidar a los AGI a radicales peroxilo que continúan la oxidación lipídica

(Figura 8). En comparación con el hierro no hémico, algunas formas de hierro hémico pueden descomponer los HPL mucho más rápido (Belitz et al., 2009).

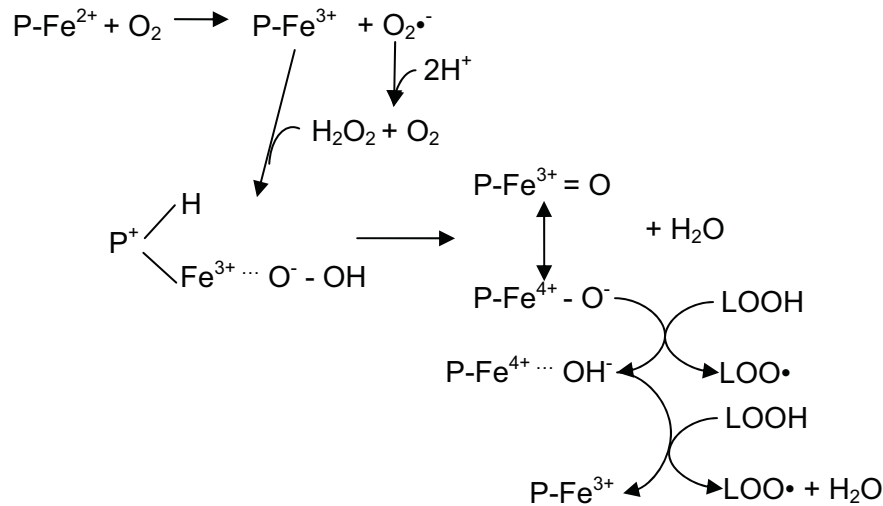


Figura 8. Mecanismo de oxidación lipídica mediada por grupos porfirínicos (Belitz et al., 2009)

Otro mecanismo postulado por el que el hierro hémico puede promover la degradación de los HPL es mediante la reacción directa de éstos con el complejo P-Fe^{3+} . Sin embargo este mecanismo parece ser menos importante ya que se ha observado que para que la metamioglobina actúe como prooxidante es necesaria la presencia de H_2O_2 (Rhee, 1988). El H_2O_2 además favorece la liberación del hierro de la proteína, lo que aumenta el hierro no hémico en el medio (Erickson, 2007).

En carne cruda hay sólo una pequeña cantidad de hierro no hémico (entre un 2.4% y un 3.9% del hierro total en carne de ternera, cordero, cerdo y pollo) (Erickson, 2007). Sin embargo, durante el procesado de la carne (picado, cocción...) y su almacenamiento, el hierro hémico puede ser liberado debido a la desnaturalización proteica, aumentando así la fracción no hémica lo que favorece el desarrollo de la oxidación lipídica (Erickson, 2007). Además, durante la cocción, la ruptura de estructuras celulares favorece el contacto de estos metales con los AGPI. Por ello,

mientras que en la mayoría de carnes crudas el hierro hémico sería el principal catalizador de la oxidación, en carne cocida lo es el hierro no hémico (Erickson, 2007).

En cuanto a las enzimas que pueden favorecer la oxidación en carne encontramos las lipooxigenasas, la mieloperoxidasa y otras enzimas que reducen el hierro en las membranas. Estas enzimas, además de favorecer propiamente la oxidación lipídica, actúan cerca de las membranas celulares, es decir cerca de los sustratos principales de la oxidación que son los AGPI (Erickson, 2007).

2.2.4.3. Factores antioxidantes

Son varios los mecanismos antioxidantes que se encuentran en el tejido muscular para evitar el desarrollo de la oxidación o sus efectos negativos. Encontramos componentes de tipo liposoluble (1), hidrosoluble (2) y enzimático (3) (ver apartado 2.2.2).

(1) Factores antioxidantes liposolubles

Los principales compuestos antioxidantes liposolubles presentes en los tejidos animales son los tocoferoles, siendo el α T el predominante. Sin embargo, al no poder ser sintetizados por los animales, deben ser incorporados a partir de la dieta. Ejercen su acción principalmente cediendo átomos de hidrógeno a radicales para estabilizarlos (ver apartado 2.2.2).

Otros antioxidantes liposolubles presentes en tejidos son los carotenoides, los cuales ejercen su actividad desactivando el oxígeno singulete (Figura 7), aunque también pueden estabilizar radicales por resonancia gracias al gran número de radicales presentes en su estructura. La capacidad de los tocoferoles para estabilizar radicales es mucho mayor (Yanishlieva et al., 1998), aunque pueden comportarse como prooxidantes a elevadas concentraciones de oxígeno (Erickson, 2007).

La ubiquinona o coenzima Q se encuentra en las mitocondrias. Ejerce su acción antioxidante captando radicales libres, pero también regenerando el radical

tocoferoxilo de una manera similar a como lo hace el ácido ascórbico (Halliwell et al., 1999).

(2) Factores antioxidantes hidrosolubles.

Estos se encuentran en el citosol. Uno de los más destacados es el ácido ascórbico, que además de poder inhibir la formación de la especie oxidante oxen, puede regenerar el tocoferol (Figura 6). No obstante, a bajas concentraciones en carne (200-300 mg/kg) puede comportarse como prooxidante reduciendo el hierro que participará en la reacción de Fenton [reacción 16] (Decker, 1998; Min et al., 2005). Durante el almacenamiento y los tratamientos térmicos se descompone fácilmente, perdiendo su actividad.

Otros antioxidantes hidrosolubles en carnes son la carnosina y el GSH. La carnosina es un dipéptido que se encuentra de forma natural en el músculo esquelético. A pesar de que su acción no es bien conocida, se cree que puede captar radicales libres en el citosol, ceder protones, y quelar metales libres, principalmente el cobre (Erickson, 2007). Además puede combinarse con los compuestos de oxidación que producen la rancidez (Gray et al., 1996). Otras moléculas peptídicas tienen también la capacidad de quelar metales: ferritina y transferrina en el caso del hierro, y albúmina e histidina en el caso del cobre (apartado 2.2.4.2).

Tal como se ha descrito en el apartado 2.2.2, el GSH puede captar radicales y suministrar electrones para que la GPx descomponga el peróxido de hidrógeno [reacción 21] y los HPL [reacción 20] a compuestos no oxidantes. Además del GSH, otros péptidos y proteínas con grupos -SH pueden contribuir a captar radicales derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo, formando un radical tiol menos reactivo en la proteína [reacción 25] (Halliwell et al., 1999; Erickson, 2007):



Esta reacción podría explicar la actividad antioxidante de la metalotioneína, proteína rica en cisteína que actúa quelando metales, regulando la cantidad de metal libre y afectando a la distribución y actividad del zinc (Maret, 2000; Maret, 2009).

Sin embargo, estos mismos grupos tiol al ser reductores pueden reducir los metales como el Fe o el Cu, en cuyo estado reducido son más activos por ejemplo descomponiendo los peróxidos en especies reactivas [reacciones 22 y 23].

(3) Enzimas antioxidantes

Las enzimas con un mayor papel antioxidante en carne son la GPx, la SOD y la catalasa (ver apartado 2.2.2). La SOD tiene como cofactores el cobre y el zinc. Actúa sobre el anión superóxido para transformarlo en peróxido de hidrógeno [reacción 18]. Este puede ser descompuesto por los metales en radical hidroxilo, muy reactivo. Por ello antes de que esto suceda, la catalasa [reacción 19] o la GPx [reacción 21] actúan sobre el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno, o agua y glutatión oxidado, respectivamente (Figura 7). Además de sobre el peróxido de hidrógeno, la GPx puede también actuar sobre los HPL reduciéndolos [reacción 20].

La GPx en muchos organismos tiene el selenio como cofactor, y para su acción utiliza el GSH. Sin embargo se cree que en el conejo, la GPx no es tan dependiente del selenio como en otras especies animales como las ratas (Cheeke, 1995; Dokoupilová et al., 2007).

2.2.4.4. Efectos del procesado

La conversión del tejido muscular en carne, junto con las operaciones de procesado a las que se somete la carne, como el deshuesado, la reducción de tamaño, el almacenamiento o la cocción influyen en todos estos parámetros antes comentados, y por lo tanto en el desarrollo de la oxidación.

En el músculo *post-mortem* se producen una serie de cambios bioquímicos como resultado del cese de la circulación sanguínea, lo que produce una falta de oxígeno y

una acumulación de productos, como el ácido láctico, que hace disminuir el pH. Esto favorece la liberación del hierro de la ferritina que actuará como catalizador de la oxidación. De hecho, se cree que éste es el responsable del avance de la oxidación descomponiendo los HPL durante la refrigeración de la carne (ver apartado 2.2.4.2), ya que la descomposición espontánea de los HPL a bajas temperaturas es poco probable porque se requieren 90 y 44 kcal/mol para romper los enlaces LOO-H y LO-OH, respectivamente (Erickson, 2007). El estrés *peri mortem* también influye en la oxidación de la carne por lo que es importante evitarlo durante su estabulación, transporte y sacrificio.

Otros factores que pueden favorecer la oxidación lipídica en el músculo *post-mortem* son:

- Pérdida de la capacidad de las membranas celulares para mantener su integridad: favorece una liberación de enzimas de los lisosomas, fosfolipasas y lipasas entre ellas, que pueden iniciar la oxidación de AG. Además, también se liberan iones calcio que pueden activar proteasas (Morrissey et al., 2004; Erickson, 2007)
- Progresiva disminución de la cantidad de antioxidantes, como los tocoferoles, el ascórbico y el GSH (Erickson, 2007)
- Generación de peróxido de hidrógeno lo que puede llevar a la liberación del hierro de las proteínas (Erickson, 2007)
- Oxidación de la metamioglobina formando un radical porfirínico, que puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para formar la protoporfirina-Fe=O oxen, la cual es muy oxidante (ver apartado 2.2.4.2) (Gutteridge et al., 1990)
- Conversión de la hipoxantina-deshidrogenasa en xantina-oxidasa, la cual puede iniciar la oxidación, dando lugar a especies muy oxidantes (Erickson, 2007).

A raíz de estos cambios provocados por la conversión del tejido muscular en carne, la oxidación iniciada en los fosfolípidos de las membranas celulares y subcelulares irá avanzando progresivamente, de forma más o menos importante en función de las condiciones de almacenamiento. Entre ellas cabe destacar la temperatura, el tiempo,

el tipo de envasado y la exposición a la luz. Debido a la influencia de la temperatura en el inicio y avance de la oxidación, la carne almacenada en congelación (-20°C) presenta una mayor estabilidad oxidativa que la refrigerada (5°C) (envasadas en las mismas condiciones) (Kingston et al., 1998).

Estos factores también tendrán importancia durante el troceado y otras operaciones de reducción de tamaño de la carne, ya que éstas implican una mayor desintegración de la estructura celular de la carne y un aumento de la relación superficie/volumen, y por lo tanto un mayor contacto con el oxígeno. Es por ello que el procesado y/o el envasado de la carne en atmósferas modificadas o al vacío mejora su estabilidad oxidativa, aunque al reducir la presión de oxígeno se favorece la formación de la metamioglobina que da un color no deseable a la carne (Morrissey et al., 2004).

La cocción favorece el desarrollo de la oxidación lipídica. La temperatura acelera las reacciones implicadas en su inicio y propagación, pero además durante la cocción se producen una serie de cambios en la carne que favorecen la oxidación (Erickson, 2007):

- Desnaturalización de las metaloproteínas: se liberan los metales que contenían como el hierro o el cobre.
- Desnaturalización de enzimas antioxidantes.
- Transformación de la mioglobina a la especie prooxidante oxen.
- Desestructuración de membranas celulares, favoreciendo el contacto entre sustratos y prooxidantes antes separados.
- Descomposición térmica de los HPL. Generación de compuestos secundarios, muchos de ellos volátiles, por oxidación, escisión, combinación e isomerización de los compuestos a los que van dando lugar los HPL al descomponerse.

Estas reacciones, y por lo tanto la oxidación, aumentan en función de la temperatura y del tiempo de cocción utilizados, así como del tipo de cocción propiamente dicho (al vapor, al baño maría, al horno, fritura, asado...), ya que de ello dependerá la magnitud

de las transformaciones sufridas por la carne, y el intercambio de componentes entre la carne y el medio de cocción (a no ser que se cueza la carne en envase cerrado).

Por ello, tras la cocción aparece el característico WOF en carnes, pero se puede llegar a la aparición de sabores y aromas desagradables como consecuencia de la oxidación lipídica (ver apartado 2.2.3.1).

El posterior almacenamiento de la carne cocida puede desencadenar un avance considerable de la oxidación, ya que esta habrá estado iniciada y promovida en etapas anteriores: manipulación, almacenamiento en crudo y cocción. Por ello las condiciones en las que se produzca el almacenamiento (temperatura, tiempo, envasado, exposición a la luz) son cruciales para la vida útil del producto, así como para su calidad nutritiva y sensorial.

2.3. Factores dietéticos: efectos en la composición de tejidos animales

2.3.1. Modificación del perfil lipídico mediante la dieta

La incorporación de grasas o aceites en los piensos para animales es una práctica común, incluso en la cría de animales herbívoros, ya que mejora la eficiencia energética de las dietas, especialmente de las ricas en fibra, aspecto interesante en la cría intensiva de animales, principalmente por motivos económicos. Sin embargo, esto puede implicar un aumento del contenido graso de las canales, más o menos acusado según la especie animal. En el conejo, lo habitual es añadir hasta un máximo 3% (p/p) de grasa en pienso. Con estas dosis moderadas se consigue una mejora en la eficiencia energética del pienso, sin provocar un aumento significativo del contenido graso la carne, el cual además se produce de forma más importante en la grasa escapular y suprarrenal que son fácilmente eliminables (Fernandez et al., 1996; Dalle Zotte, 2002). Mayores dosis de grasa dificultarían la elaboración del pienso en *pellets* (Maertens, 1998; Dalle Zotte, 2002).

La composición de la dieta no sólo influye en la composición en AG de los tejidos en el hombre, sino también en otros animales con un sistema digestivo diferente: rumiantes, no rumiantes, aves, pescado. Así, una mejora en la composición de la grasa en los tejidos animales puede contribuir a una mejora en la salud del animal, y, también, implicará una mejora en la composición de la dieta del hombre cuando éste consuma productos de origen animal. En este sentido, modificando la composición de los piensos pueden llegar a obtenerse alimentos funcionales de origen animal. Por otro lado, la utilización de grasas saturadas a los piensos (como la grasa animal, el aceite de coco o el de palma) lleva a aumentos en el contenido en AGS en carnes, lo que no sería interesante nutricionalmente para el consumidor (Wood et al., 1997).

Una modificación en la composición en AG en la carne puede alterar sus características sensoriales, tanto por lo que refiere a textura como por el riesgo de desarrollo de sabores desagradables como consecuencia de la oxidación de la

fracción grasa (ver apartado 2.2.4). Además, hay que tener en cuenta que la carne puede ser almacenada durante un tiempo más o menos prolongado antes de su consumo y que puede ser objeto de varias operaciones de procesado, como el picado o el troceado. Esta carne, en su gran mayoría, será cocida antes de ser consumida, lo que favorece todavía más el desarrollo de la oxidación, principalmente si después de la cocción vuelve a ser almacenada. Todos estos factores explican la importancia económica que tiene escoger una composición adecuada del pienso, para poder optimizar la alimentación del animal y obtener carne y otros productos saludables, atractivos a los consumidores y con una vida comercial más larga.

La cantidad y tipo de lípidos varía tanto entre las diferentes especies animales como entre diferentes tejidos: depósito, estructural o metabólico. La composición de los tejidos de depósito refleja la composición de la dieta, por lo que es fácilmente modificable, mientras que la composición de los lípidos en tejidos estructurales y metabólicos se mantiene más o menos constante, ya que éstos deben mantener sus características físicas y sus funciones biológicas.

La carne de conejo tiene una composición nutricionalmente muy interesante ya que presenta un bajo contenido en grasa y AGS, y una mejor composición en AGPI respecto a carnes de otras especies animales como la ternera, el cordero o el cerdo (Tabla 4) (Dalle Zotte, 2002; Food Standards Agency., 2002). Además, es rica en vitaminas del grupo B y en hierro, y sus proteínas tienen un alto valor biológico y son fácilmente digeribles (Dalle Zotte, 2002).

Pero hay que tener en cuenta que la composición de la dieta influye en la composición en AG de los tejidos animales, por lo que en la cría de conejos hay escoger cuidadosamente la composición del pienso para que la carne siga manteniendo estas características o bien las mejore, y evitar que se produzcan pérdidas en la calidad nutricional y sensorial, como sucedería si aumentara la cantidad de grasa, los AGS, los AG *trans*, su oxidabilidad o si se incorporaran contaminantes lipofílicos.

Tabla 4. Composición de carne de conejo alimentado con una dieta estándar (por 100 g).

	Conejo (pierna y lomo)	Ternera (bistec)	Cordero (costilla)	Cerdo (lomo)	Pollo (muslo, sin piel)	Pollo (pechuga, sin piel)
Proteína (g)	21.9	16.6	14.6	15.9	19.1	21.8
Grasa (g)	4.0	22.8	35.4	29.5	5.5	3.2
AGS	1.6	9.7	17.6	10.9	1.8	1.0
AGMI	0.8	11.0	13.6	11.9	2.3	1.3
AGPI	1.3	0.9	1.7	4.4	1.1	0.6
Colesterol	71	67	77	72	73	43
Na (mg)	67	49	61	56	89	72
K (mg)	360	260	230	220	300	330
Ca (mg)	22	9	7	8	11	10
Mg (mg)	25	16	17	17	22	27
P (mg)	220	150	140	160	180	210
Fe (mg)	1.0	1.6	1.2	0.8	0.9	0.5
Cu (mg)	0.06	0.13	0.16	0.13	0.25	0.14
Zn (mg)	1.4	3.1	2.1	1.6	1.6	0.7
Mn (mg)	0.01	0.04	0.02	0.03	0.02	0.02
Se (µg)	17	3	1	14	7	6
Vitamina E (mg)	0.13	0.20	0.18	0.01	0.13	0.08
Tiamina (mg)	0.10	0.04	0.09	0.57	0.11	0.10
Riboflavina (mg)	0.19	0.17	0.16	0.14	0.22	0.10
Niacina (mg)	8.4	4.2	4.0	4.2	5.4	9.9
Vitamina B ₆ (mg)	0.50	0.23	0.15	0.29	0.30	0.53
Vitamina B ₁₂ (mg)	10.0	1.0	1.0	2.0	1.0	Tr
Ácido fólico (µg)	5	7	3	3	12	12
Ácido pantoténico (mg)	0.80	0.50	0.40	0.70	1.30	1.20

(Food Standards Agency, 2002)

2.3.1.1. Mejora de la composición en ácidos grasos

Al estar recomendado un incremento en el consumo de AGPI n-3 debido a sus efectos beneficiosos para la salud (ver apartado 2.1.3), son muchos los estudios que han intentado obtener carnes de varias especies de animales enriquecidas en AGPI de cadena larga, y especialmente en EPA y DHA, sin aumentar su contenido graso. Para ello, se ha estudiado el modo de aumentar la cantidad de ácido linolénico en pienso, por ejemplo utilizando aceites ricos en este AG como el de linaza o el de colza. Se busca así aportar una mayor cantidad de ácido linolénico y un cociente n-6/n-3 que favorezca la biosíntesis de AGPI n-3 de cadena larga en el animal, para aumentar la cantidad de EPA y DHA en la carne. Pese a que en la mayoría de los estudios se han logrado incrementos significativos en la cantidad de EPA, no en todos se logró también aumentar el DHA siendo esto debido, tal como se ha descrito en el apartado 2.1.1, a la poca efectividad en la biosíntesis de DHA a partir de linolénico en muchas especies animales y en el hombre (Bernardini et al., 1999; Lopez-Ferrer et al., 1999; Enser et al., 2000; Hoz et al., 2003; Kouba et al., 2003; Dal Bosco et al., 2004; Bou et al., 2005; Nuernberg et al., 2005; Bou et al., 2006b). Sin embargo, estudios que utilizaron piensos ricos en EPA y DHA, por ejemplo al incorporar grasas de origen marino (aceites de pescado, extractos de alga), consiguieron unos aumentos de EPA y DHA más eficientes (Wood et al., 1997; Bernardini et al., 1999; Surai et al., 2000; Bou et al., 2004b; Bou et al., 2005).

Pero grandes incrementos en la cantidad de AGPI de cadena larga en carnes han aumentado su oleosidad, debido al menor punto de fusión de los AGPI, lo que repercute negativamente en la textura de la carne, y puede suponer un problema para posteriores operaciones de procesado. Por otro lado, pese a que un aumento en AGPI n-3 de cadena larga en carnes sea nutricionalmente favorable, implica una mayor oxidabilidad y por lo tanto una menor vida comercial en los productos enriquecidos en estos AG, ya que facilita el desarrollo de sabores desagradables como consecuencia de la oxidación de estos AG (Gray et al., 1996; Wood et al., 1997; Bou et al., 2001; Campo et al., 2006). Además, hay que tener en cuenta que el efecto de las operaciones de procesado, como por ejemplo la cocción, sobre la oxidabilidad de la

carne será mucho más acusado al estar éstas enriquecidas en AGPI (Gray et al., 1996; Erickson, 2007). Por todo esto, en algunos casos puede interesar alcanzar cantidades de EPA y DHA no tan elevadas. Una alternativa sería el uso de aceites ricos en ácido linolénico en lugar de aceites ricos en AGPI de cadena larga, ya que este AG es menos oxidable, aunque ello comportaría un menor contenido en de EPA y DHA en carne (Enser et al., 2000; Bou et al., 2006b). Otras alternativas recogen la optimización de la dosis de aceite de pescado incorporado en pienso (Bou et al., 2004b), o la sustitución del aceite de pescado por otras fuentes grasas menos insaturadas en los días anteriores al sacrificio del animal (Bou et al., 2005), lo que permite obtener un mayor depósito de EPA y DHA sin que las canales sean demasiado oleosas u oxidables.

Por otro lado, para evitar el desarrollo de la oxidación en carnes de animales alimentados con estas fuentes grasas tan insaturadas se recomienda suplementar la dieta con α T, lo que además de mejorar la estabilidad oxidativa de la carne puede evitar el desarrollo de sabores indeseables, y mejorar su textura y color (ver apartado 2.3.2).

2.3.1.2. Calidad de las grasas incorporadas a los piensos

Las grasas que se incorporen en los piensos no tienen que ser sólo seleccionadas por su composición en AG sino que también hay que evaluar su calidad oxidativa y la presencia de posibles contaminantes. Estos factores podrían tener efectos perjudiciales, tanto para la salud animal como humana, y para la calidad nutritiva y la estabilidad de los productos derivados de animales alimentados con estas grasas.

Los productos grasos utilizados en piensos actualmente se pueden clasificar en los siguientes grupos (Boatella et al., 2000):

- Grasas y aceites crudos y refinados (grasas animales, vegetales y aceites de pescado)
- Oleínas ácidas y otros subproductos de la refinación.

- Grasas y aceites procesados (jabones, aceites hidrogenados)
- Grasas y aceites reciclados (restauración, industria...)
- Fracciones de grasas y aceites (AG destilados, lecitinas, oleostearinas)
- Mezclas de varios productos grasos

En la legislación actual se permite el uso de subproductos grasos de la industria alimentaria como ingredientes para piensos animales, siempre que no representen un peligro para la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente (Boletín Oficial del Estado, 2002). Respecto a esto, se han establecido límites a la presencia de contaminantes como las dioxinas y PCBs (Boletín Oficial del Estado, 2003; Boletín Oficial del Estado, 2007). Pero por lo que respeta a las grasas y aceites reciclados de residuos de cocina, la Unión Europea ha prohibido su uso en piensos (European Communities, September 5th, 1991).

Como se ha comentado anteriormente, la incorporación de aceites con un alto contenido en compuestos de oxidación no parece tener efectos tóxicos para la salud, aunque se han descrito multitud de efectos biológicos, principalmente negativos, para muchos de los compuestos de oxidación (ver apartado 2.2.3). Por otro lado, las grasas y aceites ricos en AGPI, aunque no hayan estado calentados, son muy susceptibles de sufrir reacciones de oxidación, aumentando así su contenido en productos de degradación, y disminuyendo su contenido en AGPI y en antioxidantes, lo que disminuye su calidad.

La evaluación del nivel oxidativo de las grasas para piensos no se practica habitualmente de forma sistemática. Además en muchos casos no se realizan las medidas de oxidación adecuadas. La medida más habitual corresponde al Índice de Peróxidos (IP), con el fin de asegurar que presente unos valores moderados, aceptables para el fabricante de piensos. Pero muchos tipos de grasas se obtienen a través de procesos muy energéticos, utilizando temperaturas muy elevadas (grasas animales, subproductos de la refinación, aceites de pescado...). En estos casos lo habitual es que tras estos procesos el IP en el producto final presente valores bajos. Sólo se observarían valores altos de IP si la grasa se conserva durante un período

más o menos largo y/o en condiciones desfavorables. Por lo tanto es importante evaluar también parámetros de oxidación secundaria (*p*-Anisidina, contenido en polímeros, índice del ácido tiobarbitúrico (ATB), por ejemplo) como indicadores de calidad. Un reciente estudio (Nuchi et al., 2009) sobre la caracterización de co y subproductos grasos de uso en piensos mostró como el IP no permite realmente discriminar entre grasas de calidades muy diferentes, mientras que Índice de Acidez, el Índice de *p*-Anisidina e incluso el contenido de polímeros podían variar y discriminar grasas en función de su calidad.

Por otra parte, la oxidación de los aceites produce una reducción en el contenido en antioxidantes (como el α T) que puede llegar a ser muy drástica. Si ésta no se contrarrestara con los otros ingredientes del pienso o con la adición de α T, podrían incluso observarse signos de deficiencia en α T (Budowski et al., 1979). Además, la pérdida de α T puede producirse también en el tracto gastrointestinal, por su reacción con los radicales y productos de oxidación de la dieta y los derivados de las transformaciones sufridas por éstos, siendo entonces menor el α T absorbible. La reducción en el aporte de antioxidantes junto con la absorción de algunos compuestos de oxidación podría alterar la oxidabilidad de los tejidos animales *in vivo*, y de la carne y otros productos. Por esto la incorporación de aceites calentados en pollos ha mostrado la capacidad de reducir el contenido de α T en carne y otros tejidos, aumentar su oxidación y reducir su estabilidad oxidativa (Sheehy et al., 1993; Sheehy et al., 1994; Galvin et al., 1997). Esto implica un descenso de la calidad nutritiva de la carne, por pérdida tanto de α T como de AGPI, y por la presencia de compuestos de oxidación. Además, animales alimentados con aceites muy oxidados, cuyo contenido en AGPI esenciales había disminuido, presentaron carnes con un menor contenido en estos AG, así como un aumento en el contenido en colesterol y en sus productos de oxidación (Racanicci et al., 2008).

Sin embargo, en otros estudios, la incorporación de aceites calentados que presentaban similares contenidos en α T y un elevado contenido en compuestos de oxidación primaria o secundaria, no afectó al contenido en α T en carne de pollo, ni tampoco a su nivel de oxidación medido mediante el contenido en MDA y en productos

de oxidación del colesterol, ni tampoco afectó a su estabilidad oxidativa (Grau et al., 2001b; Bou et al., 2005a; Bou et al., 2006b).

Ahora bien, el mayor contenido en isómeros geométricos y posicionales de los AG en el aceite de girasol añadido al pienso tras ser calentado por encima de 180°C (Bou et al., 2005b) hizo que el contenido en isómeros del ácido linoleico también aumentara en la carne de pollo (Bou et al., 2005a). Ello demuestra que la composición de los aceites añadidos a los piensos influye de forma directa en la composición de carne y tejidos de los animales, y que por lo tanto es fundamental su conocimiento y control.

Los efectos de la utilización de aceites oxidados para la alimentación de conejos sobre la composición y estabilidad oxidativa de sus tejidos han sido escasamente evaluados hasta el momento. Además hay que tener en cuenta que el conejo practica la cecotrofia, hecho que podría incrementar la absorción de isómeros geométricos y posicionales de AG, de contaminantes y de compuestos de oxidación presentes en estos aceites, e influir en la composición y estabilidad de sus tejidos.

Además, hay que tener en cuenta que si el animal absorbe y deposita en sus tejidos compuestos con efectos biológicos negativos para la salud humana presentes en los aceites calentados, la carne y otros productos derivados de estos animales puede ser una fuente de este tipo de sustancias para el hombre.

2.3.2. Protección con antioxidantes: α -tocoferol

La carne y otros tejidos animales que presentan un contenido en AGPI alto o bien un contenido en antioxidantes reducido son más susceptibles a la oxidación. Como nutricionalmente interesa que el contenido de AGPI sea elevado, la susceptibilidad a la oxidación se puede mejorar aumentando el contenido en antioxidantes en los tejidos animales y en los alimentos. Para ello se pueden utilizar antioxidantes “naturales” como el α T, el ácido ascórbico, los polifenoles, los carotenos..., o bien antioxidantes de tipo artificial (butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, tert-butilhidroquinona, polifosfatos...), siendo los naturales mucho más aceptados por el consumidor.

Mientras que la suplementación de la dieta con antioxidantes como los carotenoides (Erickson, 2007) o el ascórbico (Decker et al., 1998; Grau et al., 2001b) presenta una eficacia dudosa frente a la oxidación lipídica, la suplementación de la dieta con vitamina E ha sido efectiva para reducir la oxidación y aumentar la estabilidad del color (al evitar la oxidación de la mioglobina) de la carne de pollo, ternera, cerdo, y en carnes de menor consumo como el conejo o el pavo (Morrissey et al., 2004). De hecho, para aumentar la estabilidad oxidativa de la carne ha sido más efectivo suplementar la dieta con α T (o sus formas esterificadas) que la adición directa de α T a los productos cárnicos durante el procesado. Ello se debe a que el α T de la dieta se incorpora en las membranas celulares lo que constituye un buen mecanismo de protección frente a la oxidación y por lo tanto para alargar la vida útil de los productos cárnicos (Gray et al., 1996; Decker et al., 1998; Erickson, 2007). Además, el α T estabiliza las membranas lo que favorece la retención de agua y mejora la textura de la carne.

El α T, así como sus análogos, no pueden ser sintetizados por el animal por lo que su presencia en el organismo depende del aporte por la dieta. La suplementación con dosis superiores a las recomendadas para cubrir los requerimientos del animal proporciona unos niveles de α T más elevados en tejidos, alcanzado a veces la saturación, cuando por mucho que se aumente la dosis de α T en la dieta, su contenido en tejidos no aumenta más (Oriani et al., 2001; Lo Fiego et al., 2004).

Gracias a la suplementación de la dieta de conejos y otros animales con α T (libre o en forma de acetato de α T, AT) se mejora la calidad nutritiva de carne y su estabilidad oxidativa, ya que se evita la oxidación del colesterol (Grau et al., 2001a) y de los AG (Grau et al., 2001a), de forma que puede llegar a proporcionar un mayor contenido en AGPI (Castellini et al., 1998) y se evita además el desarrollo de aromas desagradables que producen algunos compuestos volátiles de oxidación (Bou et al., 2001). Además, varios estudios han demostrado que a pesar de que el contenido en α T en carne de varias especies animales disminuye durante el almacenamiento y la cocción, el efecto protector del α T frente a la oxidación continúa durante el almacenamiento tanto de la

carne cruda como después de su cocción (Monahan et al., 1990; Castellini et al., 1998; Kingston et al., 1998; Dal Bosco et al., 2001; Russell et al., 2004).

Algunos estudios han trabajado con la suplementación simultánea con ácido ascórbico y α T, buscando conseguir un efecto sinérgico. Debido al diferente comportamiento del ácido ascórbico como prooxidante o como antioxidante según su dosis (Frankel, 1998; Min et al., 2005) los resultados han sido dispares, desde los que encuentran una acción sinérgica de ambos antioxidantes frente a la oxidación en carne (Castellini et al., 2001; Lo Fiego et al., 2004), hasta los que no encuentran un mayor efecto o incluso reportan un efecto prooxidante del ácido ascórbico (Grau et al., 2001b).

También se han adicionado a los piensos con plantas ricas en polifenoles, como el romero o el orégano, o bien extractos de éstas. Pese que algunos estudios no se encontró una mejora en la oxidación de la carne (Haak et al., 2006), otros sí han mostrado un efecto antioxidante, aunque menor que el producido por el α T (Botsoglou et al., 2003). Además, en algunos estudios que añadieron simultáneamente α T y estas plantas o sus extractos a los piensos, se obtuvo un efecto antioxidante sinérgico en la prevención del desarrollo de la oxidación durante el almacenamiento en refrigeración (Botsoglou et al., 2003), efecto que no se encontró en otros estudios (Haak et al., 2008).

Debido a la labilidad del α T lo más habitual es utilizarlo en forma de éster, como por ejemplo el AT. Así, al tener el grupo hidroxilo formando el enlace éster, se reduce la degradación del α T durante el almacenamiento del pienso. Tras la hidrólisis del AT en el tracto gastrointestinal se libera el α T que puede ser absorbido e incorporado en los tejidos.

A parte de la forma de α T que se utilice para suplementar, la protección en la carne y otros productos animales conseguida dependerá de varios factores como por ejemplo la dosis de tocoferol añadida a la dieta, la duración de la suplementación, el estado fisiológico del animal y el balance oxidativo de la carne (Decker, 1998; Grau et al., 2001b; Bou et al., 2006a).

La suplementación con vitamina E ha sido ensayada para mejorar la oxidación *in vivo* tanto en estudios con animales como en humanos. Con ello se pretendía lograr una mejora en la prevención de las patologías cardiovasculares, cuyo origen parecía ser la peroxidación lipídica. Sin embargo, la suplementación con vitamina E fue ineficaz en la prevención de la aterosclerosis (Marchioli, 1999; Vivekananthan et al., 2003) para lo que han surgido varias explicaciones (Steinhubl, 2008; Katsiki et al., 2009), entre ellas que sean otros, y no únicamente los compuestos primarios de oxidación, los agentes causantes de la aterogénesis y de la oxidación de la LDL *in vivo* (Stocker et al., 2005; Guardiola et al., 2007; Niki, 2007). Además, en varios estudios en animales y en humanos, se ha visto que tras la suplementación con vitamina E sólo se obtiene una reducción significativa en la oxidación del plasma cuando la oxidación de éste está por encima de unos valores determinados. Por lo general, en individuos sanos el alto cociente αT /grasa sería suficiente para evitar el desarrollo de la oxidación, por lo que los valores de oxidación en plasma estarían por debajo de este umbral de oxidación (Oriani et al., 2001; Block et al., 2008).

2.3.3. Suplementación de la dieta con elementos minerales

Son pocos los estudios encaminados al estudio de la posible modificación de la composición mineral de la carne mediante la suplementación de la dieta con elementos minerales. En general, en los piensos se incluye una mezcla vitamínico-mineral que contiene los elementos minerales en cantidad suficiente para cubrir las necesidades de los animales. Pero hay que tener en cuenta que ciertos minerales pueden favorecer la oxidación en tejidos animales debido a su papel prooxidante (ver apartado 2.2.1), o bien podrían reducirla al formar parte de la estructura de algunas enzimas antioxidantes, como el cobre y el zinc en la SOD, o el selenio en la GPx. Esto ha hecho ajustar la cantidad de ciertos elementos minerales incorporados al pienso, como el cobre o el hierro (Morrissey et al., 1998). Además, estos efectos pueden magnificarse si tras la suplementación de la dieta con ciertos elementos minerales se incrementa su concentración en los tejidos del animal.

Hay que tener en cuenta que las necesidades del animal en lo que a elementos minerales se refiere, la composición de sus tejidos, las funciones de los minerales en el organismo y la actividad de las enzimas de las que forman parte dependen mucho de la especie animal. Así por ejemplo, mientras que para pollos se recomienda incluir en pienso una cierta cantidad de selenio, no existen recomendaciones para el selenio en pienso de conejo. Desde un punto de vista práctico no suele ser necesaria su inclusión, al ser las necesidades en este elemento mínimas y quedar cubiertas por los otros ingredientes del pienso (National Research Council, 1977). Sin embargo, para reducir el riesgo de una deficiencia en este mineral, algunos autores recomiendan añadir una pequeña cantidad (0,05 mg/kg) de selenio en pienso de conejo, principalmente al criar a los conejos por períodos largos de tiempo (De Blas et al., 1998). Pero en casos en que se produjo una deficiencia en selenio y de vitamina E, se observaron aumentos en la oxidación lipídica y proteica que fueron contrarrestados al incorporar selenito sódico o vitamina E a los piensos, obteniéndose los mejores resultados cuando se añadieron ambos (Muller et al., 2002), acción sinérgica que puede ser debida al diferente mecanismo antioxidante del tocoferol y de la GPx. Sin embargo en conejos no deficientes en selenio aunque la concentración de selenio en tejidos aumentara tras la suplementación de la dieta con selenio, no aumentó la actividad de la GPx y ni tuvo un efecto protector frente a la oxidación (Dokoupilová et al., 2007).

En el caso del zinc, se han descrito varios mecanismos por el que podría ejercer una acción antioxidante. Forma parte de metalotioneínas como la SOD, interviene protegiendo los grupos sulfhidrilo de las proteínas, y ocupa el lugar en la membrana de otros metales prooxidantes como el cobre o el hierro que podrían promover la oxidación mediante la reacción de Fenton (ver apartado 2.2.1) (Powell, 2000). El zinc presenta una regulación homeostática importante (Hambidge et al., 2001), por lo que la suplementación de la dieta no siempre ha conseguido aumentar el contenido en zinc en tejidos animales (Bou et al., 2005a; Bou et al., 2005).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad de los elementos minerales es variable según la especie animal, su estado fisiológico y la composición

de la dieta. Por ello, la suplementación con un elemento mineral puede afectar a la biodisponibilidad de otros elementos o de otros nutrientes. Ejemplos los encontramos en la modificación de las concentraciones de cobre al retirar el hierro del pienso (Ruiz et al., 2000), o bien al suplementar con zinc (Sundaresan et al., 1996), hecho que puede aprovecharse para controlar las concentraciones de cobre en el organismo (Yuzbasiyan-Gurkan et al., 1992). En el pollo, tras suplementar con zinc se consiguieron aumentos en el contenido de selenio en carne (Bou et al., 2005a; Bou et al., 2005).

Debido al diferente papel que tienen los elementos minerales en el desarrollo y estado fisiológico del animal, a la influencia que pueden tener sobre la calidad nutritiva y el desarrollo de la oxidación en productos como la carne, y a las diferencias que pueden encontrarse entre especies animales, es importante conocer los efectos que puede tener la suplementación de la dieta con ciertos elementos minerales en cada especie animal. Sin embargo, hay pocos estudios realizados sobre la suplementación con elementos minerales en piensos animales en general, pero son más escasos aún en el conejo (Cheeke, 1995).

3. Objetivos

Los antecedentes bibliográficos han mostrado la posibilidad de modificar el perfil lipídico de la carne y otros tejidos animales. Mediante una adecuada selección de las grasas (en cantidad y composición) que se incorporarán al pienso del animal se puede obtener una carne con una composición en AG nutricionalmente más favorable. Sin embargo, hay que evitar que esto conlleve una mayor susceptibilidad a la oxidación de esta carne, pues la oxidación es uno de los principales factores que determinan la vida útil de la carne y la aceptabilidad de los consumidores.

Pero además del tipo de grasa añadida hay que tener en cuenta su calidad, ya que el empleo de grasas oxidadas podría repercutir negativamente en la calidad de la carne ya fuera por absorción de compuestos de oxidación presentes en ellas, o por su menor contenido en antioxidantes, degradados durante el desarrollo de la oxidación.

Debido a la importancia de la oxidación en la calidad de la carne, se ha recomendado suplementar los piensos de los animales con antioxidantes, siendo el α -tocoferol uno de los más utilizados. Además hay que tener en cuenta que durante el procesado de la carne, su cocción y su almacenamiento tienen lugar toda una serie de transformaciones que pueden favorecer la oxidación. Por ello, no es solo necesario estudiar la composición de la carne cruda y cómo prevenir su oxidación, sino también cómo éstas se modifican tras la cocción y el almacenamiento.

En este sentido, se han realizado un gran número de estudios que han versado sobre la utilización de grasas de diferentes orígenes (marino, vegetal, animal) en piensos de una gran variedad de especies animales, principalmente en las que proporcionan las carnes más consumidas (ternera, cerdo, pollo). Además, debido a la importancia y efectividad de la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol en la reducción de la oxidación tanto en la carne cruda como durante su almacenamiento y cocción, existen muchos estudios en la literatura que han estudiado su aplicación en la alimentación de varias especies animales.

Aunque algunos de estos estudios se han realizado en conejos, faltan estudios que evalúen de forma global el efecto que puede tener la incorporación de antioxidantes y

de grasas de diferente composición a los piensos sobre la composición y estabilidad de la carne, tanto en crudo como tras su cocción y almacenamiento. En este sentido se encuentran estudios en otros animales como el pollo, la ternera o el cerdo, pero son escasos o parciales en conejo.

Además, existen muy pocos que evalúen el efecto de la incorporación de grasas oxidadas en los piensos, y en muchos de ellos los niveles de oxidación ensayados en las grasas fueron muy superiores a los que se pueden alcanzar tras un proceso habitual como la fritura. Este tipo de estudios no han sido realizados en especies como el conejo.

Existen también muy pocos estudios, y especialmente en conejo, que evalúen otros factores dietéticos como la incorporación de elementos minerales como el zinc, cuya deficiencia puede llevar a una mayor oxidación en los tejidos animales.

Existe una carencia en la literatura de estudios evaluando simultáneamente el efecto de la incorporación de diferentes tipos de grasa o de grasas oxidadas a la dieta, y la suplementación con antioxidantes y elementos minerales sobre la composición en ácidos grasos y la oxidación en varios tejidos en el conejo.

Por ello se establecieron los siguientes objetivos para la presente Tesis Doctoral:

- Evaluar la posibilidad de enriquecer la carne de conejo en AGPI y obtener un cociente n-6/n-3 nutritivamente más favorable mediante la incorporación en pienso de diferentes dosis y tipos de aceites vegetales. Estudiar la influencia de estas modificaciones de la dieta sobre la composición de plasma e hígado de conejo.
- Evaluar la repercusión sobre la estabilidad oxidativa de la carne de conejo, así como en plasma e hígado, que puede conllevar la modificación de la composición en ácidos grasos de la carne al incorporar diferentes dosis y tipos

de aceites vegetales a los piensos. Estudiar la utilidad de la suplementación con acetato de α -tocoferol para mejorar esta estabilidad oxidativa.

- Evaluar el efecto de la incorporación de grasas con diferente nivel de oxidación en pienso de conejo sobre la composición y estabilidad oxidativa en la carne, así como en plasma e hígado. Estudiar la utilidad de la suplementación con acetato de α -tocoferol para mejorar la estabilidad oxidativa.
- Establecer los efectos de la cocción de la carne y su posterior refrigeración sobre su composición en ácidos grasos y su oxidación, tanto cuando ésta proviene de piensos en los que se han incorporado grasas particularmente insaturadas como cuando éstas presentan un elevado nivel de oxidación. Evaluar el efecto de la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol sobre la composición lipídica y la oxidación de la carne recién cocida y tras ser almacenada a refrigeración.

4. Diseño Experimental y Metodología

4.1. Diseño experimental

Para poder alcanzar los objetivos establecidos se diseñaron dos pruebas experimentales en las que se alimentaron conejos con piensos variables en diferentes factores dietéticos según los diseños factoriales explicados más adelante.

La preparación de los piensos, cría y engorde de los conejos y su sacrificio se realizó en las instalaciones del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (España). El estudio recibió la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Todo el proceso de cría de los animales se hizo de acuerdo a las normas de la Unión Europea.

La prueba 1 se diseñó para estudiar el efecto de la inclusión en pienso de conejo de diferentes dosis de aceites ricos en AGPI de la serie n-6 (aceite de girasol) o de la serie n-3 (aceite de linaza) y la suplementación de la dieta con AT sobre el contenido de AG y α T en plasma, hígado y carne de conejo, así como en su oxidación y estabilidad oxidativa.

En la prueba 2 se estudió el efecto de la inclusión en pienso de conejo de aceites con diferente nivel de oxidación (fresco, alto contenido de compuestos de oxidación primaria y alto contenido de compuestos de oxidación secundaria), y la suplementación de la dieta con AT (0 o 100 mg/kg de pienso) y con zinc (0 o 200 mg Zn/kg de pienso) sobre el contenido de Zn, Fe, Se y Cu en la carne de conejo, y sobre el contenido de ácidos grasos y α T en plasma, hígado y carne de conejo, así como en su oxidación y estabilidad oxidativa.

En ambas pruebas se estudió el efecto de la cocción y de la refrigeración de la carne cocida sobre la composición, oxidación y estabilidad oxidativa de la carne.

4.1.1. Prueba 1

En la prueba 1 se combinaron los 3 factores dietéticos estudiados en un diseño factorial ($2 \times 3 \times 2$), replicado 4 veces (Tabla 5):

- 2 tipos de aceite: aceite de girasol (rico en ácidos grasos de la serie n-6) y aceite de linaza (rico en ácidos grasos de la serie n-3).
- 3 dosis de aceite añadido al pienso: 0%, 1,5% y 3% (p/p). La dosis de grasa añadida se completó hasta el 3% (p/p) con grasa animal cuando fue necesario.
- 2 dosis de suplementación de la dieta con AT: 0 o 100 mg/kg de pienso.

Tabla 5. Prueba 1: diseño factorial

Pienso	Grasa añadida	% Grasa animal complementaria	Suplemento AT (mg/kg)
1	0% girasol	3%	0
2	1,5% girasol	1.5%	0
3	3% girasol	0%	0
4	0% girasol	3%	100
5	1,5% girasol	1.5%	100
6	3% girasol	0%	100
7	0% linaza	3%	0
8	1,5% linaza	1.5%	0
9	3% linaza	0%	0
10	0% linaza	3%	100
11	1,5% linaza	1.5%	100
12	3% linaza	0%	100

Abreviaturas: AT: acetato de α -tocoferol

Estos factores dietéticos se combinaron según el diseño factorial y fueron añadidos a una dieta basal (Tabla 6), obteniéndose 12 piensos isocalóricos (Tabla 5).

Tabla 6. Ingredientes y composición de la dieta basal

Ingrediente	Porcentaje
Pulpa de remolacha	28
Heno de alfalfa	25
Torta de girasol	20
Salvado de trigo	15
Torta de soja	6
Grasa ¹	3
Fosfato bicálcico	1,2
Corrector oligovitamínico L-510 ²	0,5
Cloruro sódico	0,5
L-Lisina	0,3
Carbonato cálcico	0,2
DL-Metionina	0,1
L-Treonina	0,1
Robenidina ³	0,1
Selenito sódico ⁴	
Composición	
Materia seca	91,3
Proteína bruta ⁵	19,4
Grasa bruta ⁵	5,2
Fibra bruta ⁵	17,9
Energía (cal/g)	4423

¹ La dieta basal se suplementó con un 3% (p/p) de grasa. El tipo de grasa añadido en cada pienso depende del diseño experimental.

² Un kilo de corrector oligovitamínico L-510 (Trouw Nutrition, España) contiene: 290 mg de óxido de magnesio; 30 mg de sodio; 275 mg de azufre; 700 µg de carbonato de cobalto monohidrato; 10 mg de sulfato de cobre pentahidrato; 76 mg de sulfato ferroso monohidrato; 20 mg de óxido de manganeso; 59,2 mg de óxido de zinc; 1,25 mg de yoduro de potasio; 8375 UI de vitamina A; 750 UI de vitamina D3; 20 mg de acetato de α-tocoferol; 1 mg de vitamina B₁; 2 mg de vitamina B₂; 1 mg de vitamina B₆; 1 mg de vitamina K; 20 mg de niacina; 250 mg de cloruro de colina; 4 mg de butilhidroxianisol + etoxiquina; 2,5 mg de flavofosfolipol (80 mg/kg).

³ La robenidina no se incluyó en los piensos utilizados en la última semana de vida de los conejos.

⁴ El selenito sódico se añadió a 0,1 mg/kg de pienso.

⁵ Proteína, grasa y fibra brutas están expresadas en porcentaje de materia seca.

4.1.2. Prueba 2

Para el estudio del efecto del nivel de oxidación del aceite añadido al pienso, primero se procedió a la obtención de los aceites con diferente contenido en compuestos de oxidación. Para ello, un mismo aceite de girasol, no refinado, se dividió en tres partes alícuotas:

- Aceite fresco: No se sometió a ningún tratamiento térmico.
- Aceite peroxidado: Se calentó a 55°C durante 245 horas en un baño en agitación y con calefacción indirecta. El aceite obtenido presentaba un elevado contenido en compuestos de oxidación primaria (Tabla 7).
- Aceite oxidado: Se calentó a 140°C durante 31 horas en agitación en una freidora industrial de calefacción directa. El aceite obtenido presentaba un alto contenido en compuestos secundarios de oxidación (Tabla 7).

En la Tabla 7 se resumen los tratamientos térmicos a los que se sometió cada uno de los tipos de aceite y los resultados de los análisis de composición y oxidación que se realizaron en ellos. Los análisis de oxidación se realizaron durante las 6 horas siguientes a la finalización del tratamiento térmico. Para el resto de análisis se recogieron muestras de los aceites en viales y se guardaron a -20°C hasta su análisis.

A partir de la dieta basal (Tabla 6) se obtuvieron 12 piensos isocalóricos (Tabla 8) mediante la combinación de los 3 factores dietéticos estudiados de acuerdo a un diseño factorial ($3 \times 2 \times 2$), que fue replicado 4 veces:

- 3 niveles de oxidación del aceite de girasol: fresco, peroxidado y oxidado (Tabla 7).
- 2 niveles de suplementación de la dieta con AT: 0 o 100 mg/kg de pienso.
- 2 niveles de suplementación de la dieta con zinc: 0 o 200 mg Zn/kg de pienso (añadidos como óxido de zinc).

Tabla 7. Tratamiento térmico, composición y variables de oxidación de los aceites de girasol utilizados en la prueba 2*

	Fresco	Peroxidado	Oxidado
Tratamiento térmico	Sin tratamiento	55°C, 245 h	140°C, 31 h
Evaluación de la oxidación ^a			
Índice de Peróxidos	10,4 y	83,0 z	9,8 x
Contenido en Peróxidos (FOX)	10,5 y	89,0 z	5,84 x
Índice de <i>p</i> -Anisidina	2,8 x	2,7 x	124,5 y
Polímeros	0,09 x	0,25 y	9,9 z
α -Tocoferol ^b	621,54 y	510,57 x	605,06 xy
Composición en ácidos grasos ^c			
AGS ^c	110	108	106
AGMI ^c	188	189	184
C18:2n-6	630 y	620 y	580 x
C20:2n-6	0,43	0,34	0,36
C18:3n-3	1,50 y	1,50 y	1,33 x
<i>c</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	0,60 x	0,61 x	0,70 y
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	0,17 x	0,17 x	0,3 y
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA	0,16	0,17	0,23
<i>ditrans</i> CLA ^d	0,13 x	0,14 x	0,64 y
Total <i>trans</i> FA	1,06 x	1,08 x	1,87 y

Abreviaturas: AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; CLA, ácido linoleico conjugado.

*Todos los valores mostrados corresponden a las medias cuadráticas obtenidas de ANOVA (n=18).

^a Índice de Peróxidos (mEq O₂/kg aceite), DGF Method C-VI 6a (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF), 2002); Índice FOX, (mmol CHP eq/kg aceite) (Navas et al., 2004); Índice de *p*-Anisidina, AOCS Official Method Cd 18-90 (AOCS, 1998-2008); Contenido de Polímeros, (% p/p) DGF Method C-III 3d (2000) (<3%) (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF), 2000), IUPAC 2508 (>3%) (IUPAC, 1992).

^b Contenido de α -tocopherol, mg α -tocopherol/kg aceite (Bou et al., 2005b).

^c Composición en ácidos grasos, g de ácido graso/kg aceite. Sólo se muestran los ácidos grasos que se cuantificaron en los aceites: AGS, suma de C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0; AGMI, suma de C16:1n-9, C18:1n-9, C20:1n-9, C16:1n-7 y C18:1n-7.

^d *Ditrans*-CLA, mezcla de isómeros.

x,y,z En una misma fila, los valores acompañados de letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05). Las letras se obtuvieron mediante el test de Scheffé ($\alpha=0.05$).

Tabla 8. Diseño factorial correspondiente a la prueba 2.

Pienso	Grasa añadida 3% (p/p)	Suplemento TA (mg/kg)	Suplemento Zn (mg/kg)
1	Aceite girasol	0	0
2	Aceite girasol	0	200
3	Aceite girasol	100	0
4	Aceite girasol	100	200
5	Aceite girasol peroxidado	0	0
6	Aceite girasol peroxidado	0	200
7	Aceite girasol peroxidado	100	0
8	Aceite girasol peroxidado	100	200
9	Aceite girasol calentado	0	0
10	Aceite girasol calentado	0	200
11	Aceite girasol calentado	100	0
12	Aceite girasol calentado	100	200

Abreviaturas: TA: acetato de α -tocoferol

4.2. Animales y Muestras

En cada una de las pruebas al finalizar la cría de los conejos se tomaron muestras de los piensos, que fueron picadas y envasadas al vacío en bolsas multicapa (Cryovac BB325; permeabilidad al O_2 $25 \text{ cm}^3 \times \text{m}^{-2} \times \text{día}^{-1} \times \text{bar}^{-1}$ a 23°C y 0% HR, ASTMD-3985; Cryovac Europe, Sealed Air S.L.; Sant Boi de Llobregat, España; aproximadamente 15 g de pienso/bolsa). Se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Los análisis de los piensos se hicieron por triplicado.

Para cada una de las pruebas se utilizaron 288 conejos (cruce de razas Neozelandesa y Californiana). A los 28 días de vida se destetaron, y los animales se repartieron al azar en 48 grupos (12 tratamientos dietéticos diferentes, 4 réplicas, 6 animales por grupo) para cada prueba. Los piensos se suministraron *ad libitum*. A los 63 días de vida, se procedió al sacrificio de los animales. Éstos se aturdieron eléctricamente y se sacrificaron cortando las carótidas y yugulares.

De cuatro conejos de cada grupo se recogieron 20 mL de sangre por animal en tubos que contenían heparina como anticoagulante, e inmediatamente se centrifugaron a 1450 g a 4°C durante 5 minutos. El plasma se separó. El plasma correspondiente a los 4 animales del mismo grupo se homogeneizó y se repartió en microtubos y se almacenó a -80°C hasta el análisis.

Los hígados se separaron inmediatamente después del sacrificio, y se refrigeraron 5 horas. Los hígados correspondientes a los 6 conejos de un mismo grupo se mezclaron y picaron para homogeneizarlos, y se envasaron al vacío en bolsas multicapa (Cryovac BB325; Cryovac Europe, Sealed Air S.L.; Sant Boi de Llobregat, España; aproximadamente 15 g de hígado/bolsa). Se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Las canales se refrigeraron 24 horas a 4°C. De cada conejo se tomó una pata y se deshuesó manualmente. La carne correspondiente a las patas de los seis conejos de un mismo grupo se mezcló y se picó. Esta mezcla se dividió en tres partes: carne cruda, carne cocida y carne cocida refrigerada:

- Carne cruda: Las muestras de carne se envasaron al vacío en bolsas multicapa (Cryovac BB325; aproximadamente 20 g de carne/bolsa) y se guardaron a -25°C hasta el análisis.
- Carne cocida: Las muestras de carne cruda se envasaron al vacío en bolsas termorresistentes multicapa (Cryovac CN330; permeabilidad al O₂ 15 cm³ × m⁻² × día⁻¹ × bar⁻¹ a 23°C y 0% HR, ASTM D-3985; aproximadamente 20 g de carne/bolsa, con un grosor de unos 5 mm). Una vez envasadas se procedió a su cocción:
 - *Prueba 1*: La cocción se realizó en autoclave a 82°C durante 36 minutos. Después las muestras se guardaron a -25°C hasta el análisis.
 - *Prueba 2*: La cocción se realizó sumergiendo las bolsas de carne en un baño de agua a 78°C durante 5 minutos. Después las muestras se guardaron a -25°C hasta el análisis.

- Carne cocida refrigerada: En cada una de las prueba, después de la cocción, una parte de las muestras se almacenaron a 5°C durante 62 días. Trascurrido este tiempo se guardaron a -25°C hasta el análisis.

4.3. Determinaciones realizadas

4.3.1. Aceites añadidos a piensos

En los aceites de girasol utilizados en la prueba 2 se determinó:

- Índice de peróxidos (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF), 2002).
- Contenido de peróxidos (método FOX) (Navas et al., 2004).
- Índice de *p*-Anisidina (AOCS, 1998-2008).
- Contenido de polímeros <3% (p/p), DGF Method C-III 3d (2000) (Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF), 2000)
- Contenido en polímeros >3% (p/p), IUPAC 2508 (IUPAC, 1992)
- Contenido de α T (Bou et al., 2005b).
- Composición en AG (ver publicación 1, apartado 5.1).

4.3.2. Pienso

En los piensos se determinó la composición en AG (ver publicación 1, apartado 5.1) y el contenido de α T (Bou et al., 2004b).

4.3.3. Plasma, Hígado y Carne

En plasma, hígado y carne (cruda, cocida y cocida refrigerada) se determinó:

- La composición en AG por CG (ver publicaciones 1 y 2, apartados 5.1 y 1.1).
- El contenido de α T por HPLC (ver publicaciones 1 y 2, apartados 5.1. y 1.1)

- El contenido de Zn, Se, Fe y Cu de la carne cruda de la prueba 2. La cuantificación de Zn, Fe y Cu se llevó a cabo mediante ICP-AES, y para el Se mediante ICP-MS tras la generación de hidruros (Bou et al., 2004a).
- La oxidación mediante el índice del ATB (Grau et al., 2000b). Este método determina en las muestras el contenido de MDA, compuesto secundario de oxidación, después de su extracción de las muestras con ácido tricloracético, y su reacción con el ATB. El complejo formado se determina espectrofotométricamente, mediante la obtención de la tercera derivada para su cuantificación.
- La susceptibilidad a la oxidación mediante el método de naranja de xilenol (índice FOX) (Grau et al., 2000a). Se trata de un método inducido que mide la formación de HPL cuando un extracto de la muestra se añade al medio de reacción FOX en condiciones estandarizadas. Para las carnes de la prueba 2 se modificó el método para mejorar el seguimiento de la evolución de la oxidación y obtener así una información más completa (ver publicación 3, apartado 5.3).

4.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS v.15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)

Se han realizado los siguientes análisis estadísticos:

- ANOVA (n=18) para determinar si había diferencias en la composición y los diferentes parámetros de oxidación en los aceites añadidos en los piensos de la prueba 2, debidas a los diferentes tratamientos térmicos.
- ANOVA multifactorial (n=36, en ambas pruebas), para determinar si los factores dietéticos estudiados en cada una de las pruebas afectaban al contenido de AG y α T en los piensos.

- ANOVA multifactorial para determinar si los factores dietéticos estudiados en la prueba 1 (dosis y tipo de aceite añadido a pienso, y suplementación con AT) afectaban a la composición en AG, contenido de α T, índice del ATB e índice FOX en plasma (n=48), hígado (n=48) y carne de conejo (n=48).
- ANOVA multifactorial para determinar si los factores dietéticos estudiados en la prueba 1 (dosis y tipo de aceite añadido a pienso, y suplementación con AT) afectaban a la composición en AG, contenido de α T e índice del ATB en la carne cocida (n=36) y en la cocida y refrigerada (n=36).
- ANOVA multifactorial para determinar si la cocción (n=84) y la refrigeración de la carne cocida (n=72) modificaban la composición en AG, el contenido de α T y el índice del ATB en la carne de la prueba 1.
- ANOVA multifactorial para determinar si los factores dietéticos estudiados en la prueba 2 (nivel de oxidación del aceite añadido al pienso, y suplementación con AT y con zinc) modificaban la composición en AG, el contenido de α T, el índice del ATB y el índice FOX en plasma (n=48), hígado (n=48), carne cruda (n=48), carne cocida (n=48) y carne refrigerada (n=48), y si modificaban el contenido de Zn, Se, Fe y Cu en la carne de conejo (n=48).
- ANOVA multifactorial para determinar si la cocción afectaba a la composición en AG de la carne (n=96), y si la cocción y la refrigeración afectaba al contenido de α T, índice del ATB e índice FOX en la carne (n=96 para el efecto de la cocción, y n=96 para el efecto de la refrigeración).

En todos los casos, las medias cuadráticas para los factores principales que tenían un efecto significativo se separaron mediante el test post-hoc de Scheffé, considerando $P \leq 0.05$ como significativo.

- Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para:
 - o Contenido de α T, índice del ATB e índice FOX entre carne cruda y cocida de la prueba 1.

- Contenido de α T e índice del ATB e índice FOX entre plasma, hígado y carne cruda de la prueba 1.
- Contenido de α T, índice del ATB e índice FOX entre carne cruda, cocida y cocida y refrigerada de la prueba 2.
- Contenido de α T, índice del ATB e índice FOX entre plasma, hígado y carne de la prueba 2.

5. Publicaciones

5.1. Influence of different dietary doses of n-3 or n-6-rich vegetable fats and α -tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability.

Título: Influencia de la suplementación con diferentes dosis de grasas vegetales, ricas en ácidos grasos n-3 o n-6, y con acetato de α -tocoferol en la composición y estabilidad oxidativa de carne de conejo cruda y cocida.

Revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56, 7248-7253.

Índice de impacto: 2,53; Posición 7/103 (Journal Citation Reports, 2007).

Resumen: Este estudio evalúa los efectos de la sustitución de la grasa animal añadida a pienso de conejo (3%, p/p) por diferentes dosis (0%, 1,5% y 3%, p/p) de aceites vegetales, ricos en AG de la serie n-6 (aceite de girasol) o de la serie n-3 (aceite de linaza), y la suplementación con AT (0 o 100 mg/kg de pienso), sobre la composición en AG, el contenido de α T, la oxidación (índice del ATB) y la susceptibilidad a la oxidación (índice FOX, método inducido para medir la formación de HPL) en la carne de conejo. Estos parámetros también se evaluaron tras la cocción de la carne (previamente envasada al vacío) y tras el almacenamiento de la carne cocida en refrigeración durante 62 días.

Tanto la suplementación de la dieta con AT como la dosis y tipo de grasa añadida a los piensos repercutieron sobre la composición en AG de la carne de conejo, modificando el cociente n-6/n-3. Ésta fue nutricionalmente más favorable cuando se añadió aceite de linaza a los piensos. Además, la incorporación simultánea de aceite de linaza y la suplementación con AT en piensos aumentó la biosíntesis de AGPI de cadena larga en el conejo. Sin embargo, la adición de aceite de linaza al 3% (p/p) en

pienso aumentó la oxidación en la carne. Ésta oxidación se redujo en carne cruda gracias a la suplementación con AT, reducción que no fue tan efectiva en la carne cocida.

La incorporación en pienso de un 1,5% (p/p) de aceite de linaza más un 1,5% (p/p) de grasa animal, y la suplementación de la dieta con 100 mg de AT por kilo de pienso sería la composición de pienso de conejo más recomendable entre las estudiadas para mejorar la calidad nutricional de la carne de conejo sin conllevar su deterioro oxidativo.

5.2. Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and antioxidants: effects on fatty acid composition and stability of rabbit plasma, liver and meat.

Título: Estabilidad oxidativa y composición en ácidos grasos de plasma, hígado y carne de conejo, según la concentración de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6 y de α -tocoferol en el pienso.

Revista: Animal (en revisión).

Índice de impacto: Por determinar (revista indexada, creada en 2007).

Resumen: Se estudiaron los efectos de la suplementación en piensos de conejo con AT (100 mg/kg) y la sustitución de la grasa animal añadida en el pienso (3%, p/p) por diferentes dosis de aceites vegetales ricos en ácidos grasos de la serie n-6 (aceite de girasol) o de la serie n-3 (aceite de linaza), sobre la composición en AG, el contenido de α T y la estabilidad oxidativa en plasma e hígado de conejo. Estos efectos fueron comparados con los obtenidos en un estudio previo en carne.

Como en la carne, el contenido de AGS, AGMI y AG *trans* en plasma e hígado de conejo reflejó el perfil de AG de los piensos, excepto para el contenido de ácido esteárico en el hígado, el cual aumentó a medida que los piensos contenían más cantidad de aceite vegetal, hecho que puede ser debido a la inhibición de la actividad de la enzima esteroil-CoA-desaturasa. Al ir aumentando la dosis de aceite de linaza en los piensos, el cociente n-6/n-3 mejoró en plasma e hígado de conejo tanto por incorporación de AG de la dieta como por la diferente selectividad de la Δ 6-desaturasa.

Sin embargo, un aumento de la dosis de aceite vegetal en el pienso conllevó una reducción significativa del contenido de α T de plasma e hígado de conejo, siendo

mayor la reducción cuando la grasa añadida al pienso era aceite linaza en lugar de aceite de girasol.

El aumento de la dosis de aceite vegetal en pienso también implicó un aumento en la susceptibilidad a la oxidación (índice FOX) de plasma, hígado y carne, y en el índice de ATB de la carne. Aunque la suplementación de la dieta con AT aumentó el contenido de α T en plasma e hígado, no modificó sus índices de FOX ni de ATB. Sin embargo en carne, tanto el índice FOX como el de ATB fueron menores cuando la dieta había sido suplementada con AT.

El contenido de α T en plasma de conejo reflejó el contenido de α T en los tejidos (hígado y carne), y se correlacionó negativamente con la susceptibilidad oxidativa de los mismos.

Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and α -tocopheryl acetate: effects on fatty acid composition and stability of rabbit plasma, liver and meat

Running head: Effect of dietary fats and tocopherol on tissues

A. Tres¹, R. Bou¹, R. Codony¹, F. Guardiola¹

¹Nutrition and Food Science Department – XaRTA – INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Corresponding author: F. Guardiola. E-mail: fguardiola@ub.edu

Nutrition and Food Science Department – XaRTA – INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Phone number: (+34) 934024508

Fax number: (+34) 934035931

Abstract

We supplemented diets with α -tocopheryl acetate (100 mg/kg) and replaced beef tallow in feeds with increasing doses of n-6- or n-3- rich vegetable fat sources (linseed and sunflower oil) and studied the effects on the fatty acid composition, the α -tocopherol content and the oxidative stability of rabbit plasma and liver. These effects were compared with those observed in a previous study in rabbit meat. As in meat, the content of saturated, monounsaturated and *trans* fatty acids in plasma and liver mainly reflected feed fatty acid profile, except stearic acid in liver, which increased as feeds contained higher doses of vegetable fat, which could be related to an inhibition of the activity of the stearyl-CoA-desaturase. As linseed oil increased in feeds, the n-6/n-3 fatty acid ratio was decreased in plasma and liver as a result of the incorporation of fatty acids from diets and also, due to the different performance and selectivity of desaturase enzymes. However, an increase in dose of vegetable fat in feeds led to a significant reduction in the α -tocopherol content of plasma and liver, which was greater when the fat source was linseed oil. Increasing the dose of vegetable fat in feeds also led to an increase in the susceptibility to oxidation (lipid hydroperoxide [LHP] value) of rabbit plasma, liver and meat and on the TBA values of meat. Although the dietary supplementation with α -tocopheryl acetate increased the α -tocopherol content in plasma and liver, it did not modify significantly their TBA or LHP values. In meat however, both TBA and LHP values were reduced by the dietary supplementation with α -tocopheryl acetate. The plasma α -tocopherol content reflected the α -tocopherol content in tissues, and correlated negatively with tissue oxidability. From the studied diets, those containing 1.5% linseed oil plus 1.5% beef tallow and 100 mg of α -tocopheryl acetate/kg most improved the fatty acid composition and the oxidative stability of rabbit tissues.

Keywords: fatty acid, meat quality, oxidation, rabbit, tissues, tocopherol.

Implications: Several health beneficial effects have been attributed to n-3 polyunsaturated fatty acids, thus dietary recommendations have focused on reducing the intake of saturated fatty acids, and on increasing that of polyunsaturated fatty acids, especially n-3 fatty acids. Tissue composition can be improved through the diet, which can be used to improve the nutritional value of meats. This might alter tissue oxidation, which may produce negative biological effects, and in meat this may affect its stability, nutritional and sensory quality. Oxidation may be prevented by increasing tissue content of antioxidants as tocopherol. We studied the influence of rabbit feeding with different fats and antioxidants on the composition and stability of its plasma, liver and meat.

Introduction

The composition of biological tissues can be modified through diet, either by direct incorporation of the absorbed compounds or by their interactions with anabolic and catabolic pathways. If the n-6/n-3 fatty acid (FA) ratio of diets is reduced, this generates eicosanoids with more beneficial effects in some chronic diseases than those derived from n-6 FA (Kinsella *et al.*, 1990; Simopoulos, 1997; Siddiqui *et al.*, 2008).

Attempts have been made to increase the long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) content in animal tissues by enriching diets with fats that have a high linolenic acid content (Bernardini *et al.*, 1999; Enser *et al.*, 2000; Bou *et al.*, 2006b). However, the increase in dietary long-chain n-3 PUFA, achieved for instance by adding marine fat sources to the diet, has been reported to be more effective (Nettleton, 1991; Wood and Enser, 1997). But this might also lead to more unstable tissues from an oxidative point of view because lipid oxidation is favored in highly unsaturated FA (Frankel, 1998).

Oxidation in biological tissues should be avoided because some negative biological effects have been attributed to lipid oxidation products (Guardiola *et al.*, 2002; Niki *et al.*, 2005; Spiteller, 2006). In meat and food products, oxidation might lead to a reduction of the sensory and nutritional quality (Gray *et al.*, 1996). Oxidation can be prevented in foods and biological tissues by the action of antioxidants, for instance increasing the α -tocopherol (α T) content in tissues as a result of a higher α T intake (Cherian *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1996).

Rabbit meat is interesting from a nutritional point of view, since it has a low cholesterol and fat content, and the fat depot can be more easily removed than in other meats, such as beef or pork (Food Standards Agency., 2002). Regardless of the feeding regimen, rabbit meat FA composition is richer in PUFA than lamb, beef or pork and its content of saturated fatty acids (SFA) is lower than in beef or lamb (Food Standards Agency, 2002).

Several studies have been conducted on animals such as chicken, pig or beef, since they produce highly consumed meats (Gray *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2003). Fewer

studies in the literature deal with rabbit feeding, although recently the number of studies conducted with rabbit has increased (Pla and Cervera, 1997; Bernardini *et al.*, 1999; Castellini *et al.*, 2001; Dalle Zotte, 2002; Dal Bosco *et al.*, 2004; Lo Fiego *et al.*, 2004; Corino *et al.*, 2007; Gigaud and Combes, 2008; Maertens *et al.*, 2008; Zsedely *et al.*, 2008). Most of them are focused in rabbit meat due to its nutritional value, but there is a lack of comprehensive studies dealing at the same time with rabbit plasma, meat and other tissues more involved in animal's metabolism, as liver. Therefore, we studied the addition of different fat sources to feeds, with or without the dietary supplementation with α -tocopheryl acetate (TA) on the FA composition, the α T content and the oxidative stability of plasma, liver and meat. In a previous paper coming from this study, the effects of cooking and the refrigerated storage of cooked rabbit meat were reported (Tres *et al.*, 2008).

Material and methods

The reagents and standards used were reported in Tres *et al.* (2008).

Animals and diets

The preparation of diets and housing of animals took place in the Animal Science Department at the Polytechnic University of Valencia. Twelve isocaloric dietary treatments were prepared from a basal diet (described in Tres *et al.* (2008)) by combining several dietary factors, according to a factorial design (2x3x2) replicated four times: 2 vegetable fat sources were used to replace animal fat (beef tallow, BT), one rich in n-6 fatty acids (sunflower oil [SO]) and another rich in n-3 fatty acids (linseed oil [LO]); 3 doses of vegetable fat replacement (0%, 1.5% or 3% [wt/wt] of vegetable fat; in all treatments total added fat was completed up to 3% [wt/wt] with BT); and TA (0 or 100 mg TA/kg of feed).

The animal experiments were performed in the animal facilities of the Polytechnic University of Valencia (Spain), and received prior approval from the respective Animal Protocol Review Committee. All animal housing, husbandry and slaughtering conditions agreed to current European Union guidelines.

Samples

Feed samples were taken at the end of the feeding trial, as described in Tres *et al.* (2008).

Two hundred and eighty-eight rabbits (a cross of New Zealand and Californian rabbits) were weaned at 28 days. They were randomly divided into forty-eight groups (twelve dietary treatments, four replicates, 6 rabbits per cage) and fed *ad libitum* with the corresponding experimental diet. At 63 days of age, rabbits were electrically stunned and killed by cutting carotids and jugulars. From four rabbits in each group, 20 mL of blood per animal was collected in heparinized tubes and immediately centrifuged at 1450 *g* at 4 °C for 10 min. Plasma samples from each group were mixed and transferred into microtubes and stored at -80 °C until analysis. Livers were immediately removed from carcasses and refrigerated at 4 °C for 5 h. Then, the six livers from each group were mixed, ground and vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; permeability to O₂ 25 cm³/m², 24 h, 23 °C, 1 bar, ASTM D-3985; Cryovac Europe, Sealed Air S. L., Sant Boi de Llobregat, Spain; approximately 15 g liver/bag) and stored at -80 °C until analysis. Meat samples were obtained as described in Tres *et al.* (2008).

Feed and meat analysis

Feed FA composition and α T content were analyzed as described in Tres *et al.* (2008).

Fatty acid composition, α T content, oxidation (thiobarbituric acid [TBA] value) and oxidative stability (lipid hydroperoxide [LHP] value) of meat were described in Tres *et al.* (2008).

Fatty acid composition of plasma and liver

Plasma FA composition was determined by gas chromatography. First, 0.6 mL of plasma was pipetted into a 50 mL-screw-capped tube. Twenty milliliters of chloroform:methanol (2:1, vol/vol) was then added and the mixture was mixed for 45 min using a magnetic stirring bar. The mixture was transferred to another tube, and residues in the first tube were washed twice with 10 mL of the same solvent mixture and transferred to the second tube. Then, 10 mL of 1% (wt/vol) sodium chloride was added. The tube was manually shaken and centrifuged for 20 min at 500 g. The chloroform phase was filtered through anhydrous sodium sulfate (using Whatman No. 1 filter paper), which was then washed once with 5 mL of chloroform: methanol (2:1, vol/vol) and then twice with 5 mL of chloroform. The lipid extract was concentrated in a vacuum rotatory evaporator at 35 °C. It was then dissolved with diethyl ether and quantitatively transferred to a screw-capped tube (16 x 100 mm) containing the internal standard (heneicosanoic acid (C21:0) methyl ester). The solvent was removed under a slight nitrogen stream, and the tube was left overnight in a vacuum desiccator at 10 mmHg. Fatty acid methyl esters were prepared by adapting the method used for feed, liver and meat (Guardiola *et al.*, 1994) to plasma samples: 1 mL of 0.5 N methanolic solution of sodium methoxide was added and the tube was placed in a boiling water bath for 20 min. Then, the tube was chilled and 1 mL of a methanolic solution of boron trifluoride (14%, wt/vol) was added and the tube was placed in a boiling water bath for 15 min. It was then chilled to room temperature and the FA methyl esters were extracted by adding 2 mL of n-hexane and 1 mL of saturated sodium chloride solution to the tube. The hexanic phase was transferred to a vial containing a small amount of anhydrous sodium sulfate. After 1 h, 1 mL of the hexanic phase was transferred to another tube (10 x 75 mm) and evaporated under a light nitrogen stream at 30 °C. Then, 0.15 mL of n-hexane was added to dissolve the FA methyl esters. Two microliters were injected in the gas chromatograph, following the conditions described in Tres *et al.* (2008).

The FA composition of liver was determined by gas chromatography, following the same procedure used in meat and described in Tres *et al.* (2008).

Determination of α -tocopherol in plasma and liver

Plasma α T content was determined as follows: 0.25 mL of plasma was transferred into a screw-capped tube (16 x 100 mm). Then, 0.1 mL of internal standard solution (TA in ethanol) and 0.4 mL of an ethanolic solution containing 0.032% (wt/vol) of butylated hydroxytoluene and 0.3% (wt/vol) of pyrogallol was added. After one minute of vortex agitation, 0.75 mL of hexane was added, and the solution was mixed by another minute of vortex agitation. Tubes were then centrifuged for 10 min at 1000 g, and the hexanic phase was transferred to another tube. The remaining ethanolic phase was reextracted twice with 0.75 mL of hexane. The three hexanic phases were mixed and filtered through a 0.45 μ m PTFE filter. Filters were washed twice with 0.5 mL of hexane. The solvent was evaporated under a light nitrogen stream at 30 °C. The residue was dissolved in 200 μ L of 96% ethanol. Chromatographic separation of this solution was performed using an Agilent 1100 Series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), equipped with a Rheodyne 7725i model injector (Rheodyne, Cotati, CA) with a loop volume of 500 μ L (samples were injected by partial loop filling using 100 μ L of sample), a reverse phase column (15 x 0.4 cm, 3 μ m, 80 Å, Tracer Extrasil ODS2, Teknokroma, Sant Cugat del Valles, Spain) and a precolumn (1 x 0.4 cm, 3 μ m, 80 Å, Tracer Extrasil ODS2, Teknokroma). Sample compounds were isocratically eluted with methanol at 1.5 mL/min at 27 °C and detected by means of an Agilent 1100 Series variable wavelength UV detector (wavelength at 292 nm, set after 3.9 minutes at 285 nm). The content of α T was determined by means of a calibration curve using TA as an internal standard.

The content of α T in liver was determined, after saponification, by HPLC-fluorescence detection (Tres *et al.*, 2008).

Lipid hydroperoxide determination

In order to assess the susceptibility of plasma and liver to lipid oxidation, LHP value was measured by the ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) method (Grau *et al.*, 2000a) adapted to these samples. In this method, the methanolic extract of a sample was mixed with the FOX reagents in glass cuvettes capped with Teflon caps, and then

the mixture (the final volume of the reaction mixture was always 2 mL) was left in the dark to induce LHP formation until absorbance readings at 560 nm were steady over time. The formed LHP were quantified with a calibration curve using cumene hydroperoxide (CHP) as standard.

The FOX method described by Grau *et al.* (2000a) was adapted to plasma samples: 300 μ L of plasma were pipetted into screw-capped tubes (16 x 100 mm), and 3 mL of cold methanol was added. This blend was agitated by vortex for one minute and centrifuged for 5 min at 1350 *g*. Then, in glass cuvettes capped with Teflon caps, two aliquots of 600 μ L of the supernatant were mixed: one with 500 μ L of 10 mM triphenylphosphine (TPP) in methanol, and the other with 500 μ L of methanol. After 30 min, 900 μ L of FOX reagent (500 μ L of ferrous-ammonium sulfate 1 mM, 200 μ L of 0.25 M sulfuric acid in methanol, 200 μ L of xylenol orange 1 mM in methanol) was added. Absorbance from cuvettes containing TPP was measured after 30 min, and absorbance from cuvettes without TPP was assessed after 116 h. As TPP is a specific reducing agent of organic hydroperoxides, the residual absorbance developed by cuvettes containing TPP measures hydrogen peroxide, free ferric ion or other chromophores present in the sample (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994; Sodergren *et al.*, 1998; VanderJagt *et al.*, 2001). Therefore, the difference in absorbance between cuvettes without TPP and with TPP was used to calculate the LHP value by means of a calibration curve using CHP as standard. No increase in absorbance at 560 nm was observed when the FOX reaction was incubated for 30 min with meat or liver methanolic extracts and TPP (data not shown).

The FOX method used for meat samples (Tres *et al.*, 2008) was adapted to liver samples: 20 mL of cold methanol was added to two gram liver samples. After homogenization and centrifugation, methanolic extract was diluted ten-fold and 250 μ L of it were added to the FOX mixture. Absorbance was measured after 168 h.

Determination of TBA value

The TBA value in rabbit plasma and liver was determined by an acid aqueous extraction method with third derivative spectrophotometry described by Grau *et al.* (Grau *et al.*, 2000b). In plasma, the volumes of reagents needed were adjusted to the sample amount that was 1mL of plasma. In liver, the sole difference with respect to the original method was that after the reaction mixture was cooled, samples were tempered for 2.5 h at room temperature in order to obtain a steady reading.

Statistics

Multifactor ANOVA was used to determine significant differences in α T content, FA composition and LHP and TBA values due to the dietary factors (source of n-3 or n-6 fat, dose of n-6 or n-3 fat, and TA supplementation) in rabbit plasma (n=48) and liver (n=48). Multifactor ANOVA was used to determine whether there were any significant differences in α T content, LHP value, TBA value and FA composition between plasma, liver and meat samples (n=144). Least-squares means for the main factors that had a significant effect were separated by the Scheffé's test (except when otherwise stated). Pearson correlation coefficients were calculated between α T content, LHP and TBA values in plasma, liver and meat. In all cases, $P \leq 0.05$ was considered significant.

Results and discussion

Fatty acid composition

The FA composition of feeds differed depending on both the source and dose of unsaturated fat used to replace BT (Tres *et al.*, 2008). Feeds containing 3% (wt/wt) BT had the highest content of SFA, monounsaturated fatty acids (MUFA) and total *trans* FA, and the lowest content of PUFA. Feeds with added SO had a higher content of C18:2n-6, while in feeds containing LO, the C18:3n-3 content was higher. Long-chain PUFA as C22:5n-6, C22:5n-3 or C22:6n-3 were not detected in feeds. The addition of TA (100 mg/kg) to feeds had no effect on feed FA composition. Feed composition was fully described in Tres *et al.* (2008).

According to what was found in meat (Tres *et al.*, 2008), the FA composition of plasma (Table 1) and liver (Table 2) was mainly affected by feed FA composition (Tres *et al.*, 2008), which depended on the dose and source of n-6- or n-3-rich vegetable fat used in feeds. Changes in the FA composition of tissues from rabbit (Bernardini *et al.*, 1999), other animals (Wood and Enser, 1997; Enser *et al.*, 2000; Bou *et al.*, 2006b) and humans (Arterburn *et al.*, 2006) have been reported as a result of varying the FA profile of diets. In our study in rabbits, the content of *trans* FA in plasma and liver and the content of MUFA in liver decreased, while total PUFA increased in liver (Tables 1 and 2) as BT in feeds was replaced by increasing doses of n-6- or n-3-rich vegetable fat (Tres *et al.*, 2008). Meat FA composition was similarly affected by the type and dose of vegetable fat added to feeds (Tres *et al.*, 2008).

The content of SFA in plasma was not significantly affected by feed FA composition whereas C24:0 was increased when BT had been replaced from feeds thus reflecting feed FA composition (Table 1). In liver, most of SFA remained unchanged when BT was replaced by a vegetable fat source (Table 2) whereas C18:0, C20:0 and C24:0 were increased. These increases reflected feed FA composition with the exception of stearic acid which followed the opposite trend than in feeds. However, in meat all SFA, including stearic acid, followed feed FA composition (Tres *et al.*, 2008). Therefore, liver stearic acid content might be affected by the tissue's role in FA metabolism and storage, since its metabolic pathways might be altered by the dietary factors. One possible explanation can be found in the increase in PUFA content in liver as BT was reduced in feeds. It has been reported that PUFA inhibit the activity of stearoyl-CoA-desaturase, the enzyme that synthesizes oleic acid from stearic acid, thus regulating its expression (Sessler *et al.*, 1996). This inhibition could lead to accumulation of the precursor (C18:0), and to a reduction in MUFA content, which might also be affected by the lower MUFA supply in the diet as vegetable fat increased in feeds. In fact, MUFA content was much more reduced in liver (40%) than in meat (26%) (Tres *et al.*, 2008) as the dose of vegetable fat increased in feeds. This difference between tissues might be related to the higher biosynthetic role of liver, in which the inhibition of stearoyl-CoA-desaturase might lead to a major decrease in MUFA content and to an accumulation of stearic acid in liver but not in meat.

The PUFA/SFA ratio increased in plasma and liver as increasing doses of n-6- or n-3-rich vegetable fats were added to feeds. However, long-chain PUFA as C22:5n-6, C22:5n-3 or C22:6n-3, were not detected in feeds (Tres *et al.*, 2008). Therefore, their presence in plasma and liver might have a biosynthetic origin, which in turn could be modified by the dietary factors, particularly the dose and the FA profile of the dietary fat added to feeds. In addition, supplementation with TA might also affect FA biosynthesis (Tres *et al.*, 2008).

Long-chain n-6 and n-3 PUFA are biosynthesized from their precursors (linoleic acid and linolenic acid, respectively) through an enzymatic system that involves elongation and desaturation. Both precursors share the same enzyme, $\Delta 6$ -desaturase (Burdge and Calder, 2005b), which has more affinity for linolenic acid. In our study in rabbits, increased amounts of EPA and DHA were found in plasma and liver due to the addition of LO to feeds (Tables 1, 2 and 3), as it had been found in meat (Tres *et al.*, 2008). This is in accordance with other studies in rabbit (Bernardini *et al.*, 1999; Dal Bosco *et al.*, 2004; Maertens *et al.*, 2008) and other animals (Enser *et al.*, 2000; Bou *et al.*, 2006b). However, the effectiveness of the synthesis of DHA from linolenic acid in animals and humans is controversial, as it has been reported to be limited (Cherian and Sim, 1995; D'Arrigo *et al.*, 2002; Hoz *et al.*, 2003; Burdge and Calder, 2005b; Nuernberg *et al.*, 2005). This has been related to the last step in the biosynthesis pathway of DHA, a β -oxidation of C24:6n-3 which involves translocations between endoplasmic reticulum and peroxisomes of both DHA and its precursor (C24:6n-3) (Burdge and Calder, 2005b; Arterburn *et al.*, 2006).

For the content of long-chain n-6 and n-3 PUFA in plasma and liver, we observed an interaction between the dose and the source of n-6- or n-3-rich vegetable fat used to replace BT in feeds (Table 3). As the dose of SO increased in feeds (linoleic acid increased and linolenic acid remained the same), the content of long-chain n-6 FA increased in plasma, and liver with significant reductions in some n-3 PUFA, such as C20:5n-3, C22:5n-3 or C22:6n-3. When LO was added to feeds at 1.5% or 3% (wt/wt), linolenic acid and long-chain n-3 PUFA increased in plasma and liver, while the content of some very long-chain n-6 FA (such as C22:4n-6 or C22:5n-6) was concomitantly reduced. For instance, in plasma, C22:5n-3 and C22:6n-3 increased 1.8-fold and 4.7-

fold respectively when BT (3%, wt/wt) was completely replaced by LO (3%, wt/wt), and there was a 60% and 22% reduction in the content of C22:4n-6 and C22:5n-6 (Table 3). Although the content of C18:2n-6 in feeds and liver was higher in LO than in BT treatments, the linoleic/linolenic acid ratio of LO treatments favored the biosynthesis of long-chain n-3 PUFA by $\Delta 6$ -desaturase due to its greater affinity for linolenic acid than for linoleic acid. A similar effect of increasing doses of LO in feeds was found in meat FA composition (Tres *et al.*, 2008), however; due to the higher biosynthetic activity of liver, the increases in long chain n-3 PUFA in liver were greater than in meat, as well as the decreases in long chain n-6 FA. In other animal and human studies, concomitant reductions have also been reported in the content of long-chain n-6 PUFA, as a result of increased biosynthesis of n-3 FA in several tissues due to dietary LO (Cherian *et al.*, 1996; Bernardini *et al.*, 1999; Nuernberg *et al.*, 2005; Arterburn *et al.*, 2006).

Dietary TA supplementation (100 mg/kg) did not affect plasma FA composition, but reduced the content of C18:1n-9 in liver (Table 2). In meat, TA supplementation affected the n-3 FA composition when LO was added at 3% (wt/wt). This effect was attributed to both a protection effect of α T against PUFA oxidation, and to an enhancement of long-chain PUFA biosynthesis (Tres *et al.*, 2008). These changes on n-3 FA composition were not significant in plasma and liver, although the same tendency was observed. The higher α T content already in livers from non-TA supplemented diets compared with the corresponding meats, could account for the lack of significance for this interaction. This is in accordance with Surai and Sparks (2000) who, as a result of increased dietary vitamin E, also found increases in long-chain FA content in cockerel meat, testes and cerebellum, but not in liver.

When the FA composition in plasma, liver and meat was compared, some differences were found. The proportions of the different FA varied among the tissues. For instance, the content of linoleic acid in plasma was higher than the content of linolenic acid (Tables 1 and 3) and the ratio between them is also proportionally higher than that found in meat (Tres *et al.*, 2008). In liver, linoleic acid content was 1.5-fold higher than in meat, but the content of linolenic acid was only half that in meat (Tables 2 and 3). This could be due to liver preferentially accumulating linoleic acid rather than linolenic

acid; to a reduction in the content of linolenic acid due to its preferential use by $\Delta 6$ -desaturase in the biosynthesis of long-chain PUFA (Burdge and Calder, 2005a); and to preferential use of linolenic acid instead of linoleic acid for β -oxidation (McCloy *et al.*, 2004). Consequently in liver, the ratio between the amount of long-chain n-3 PUFA derived from linolenic acid and the content of linolenic acid was much higher than the ratio between the amount of long-chain n-6 PUFA derived from linoleic acid and the content of linoleic acid (Figure 1). Furthermore, these ratios were higher in liver than in plasma and meat, which in turn showed similar values. However, the long-chain n-3 PUFA/linolenic acid ratio was slightly higher in plasma. These findings might reflect the different functions of FA in these tissues: FA in muscle have mainly a structural, regulatory and energy function; but liver has a greater biosynthetic function. As plasma transports FA between tissues, its FA composition, and therefore its ratios, were proportionally intermediate between those of liver and meat.

Dietary FA composition determines the FA composition of several tissues both by direct incorporation of FA from the diet into tissues and also by the induction of some changes in FA metabolism. Dietary recommendations suggest increasing the PUFA/SFA ratio, and decreasing the n-6/n-3 FA ratio of diets to values of 10 to 5 or less (Simopoulos, 2002; Food and Nutrition Board, 2005), as both n-6 and n-3 FA compete for the same enzymes in the production of eicosanoids. In our study, the replacement of BT in feeds by a vegetable fat source led to increases in the PUFA/SFA ratio in plasma, liver and meat. However, the FA composition of tissues was improved when the vegetable fat used was LO, since it decreased the n-6/n-3 FA ratio (Tables 1, 2 and 3). Therefore, rabbit meat FA profile was more nutritionally favorable when LO was used in feeds instead of BT or SO (Tres *et al.*, 2008).

Content of α -tocopherol

The content of α T was higher in supplemented feeds (100 mg TA/kg) than in non-supplemented feeds (124 vs. 34 mg of α T/kg of feed). It was also slightly higher in SO feeds than in LO feeds (81 vs. 75 mg of α T/kg of feed). However, it was not affected by the dose of unsaturated fat used in BT replacement (Tres *et al.*, 2008).

The highest content of α T was found in liver (9.21 mg/kg), followed by plasma (4.15 mg/L) and meat (2.93 mg/kg).

Dietary supplementation with TA (100 mg/kg) increased the α T content in rabbit plasma by 2.3-fold, and the content in liver and meat by 3-fold (Table 4), according to previous literature in rabbit (Castellini *et al.*, 1998; Castellini *et al.*, 2001; Oriani *et al.*, 2001; Lo Fiego *et al.*, 2004) and other animal species (Sheehy *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 2004; Bou *et al.*, 2006a). Although this increase was proportionally slightly higher in meat than in liver (3.2 fold vs. 3 fold), liver from rabbits on TA-supplemented diets presented the highest α T content (Table 4). This reflects the α T storage capacity of liver, according to previous studies (Surai and Sparks, 2000; Lo Fiego *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2004). Furthermore, positive correlations were found among the α T content in plasma, liver and meat (Table 5). This suggests that α T content in plasma responds to feed α T content and reflects the α T status of tissues (Sheehy *et al.*, 1994; Castellini *et al.*, 2001; Oriani *et al.*, 2001).

Dietary supplementation with TA (100 mg/kg) increased the α T content in plasma. However, this α T content was much higher when BT was not replaced by a vegetable fat, while it reached similar levels when BT was half or completely replaced (Figure 2). The complete replacement of BT by a vegetable fat (regardless of its source) led to a significant reduction in α T content in plasma from rabbits on non-TA supplemented diets (Figure 2).

For the α T content in plasma, there was a significant interaction between the dose of vegetable fat used to replace BT in feeds and its source (SO or LO) (Figure 3A). The content of α T decreased as the dose of vegetable fat increased, but this decrease was more pronounced when LO was used. Indeed, the addition of either 1.5% or 3% (wt/wt) SO to feeds decreased (10%) the plasma α T content to similar levels. However, when LO was used at 1.5% (wt/wt), the α T content in plasma was reduced by 30% (compared with plasma from BT diets). In contrast, when LO was added at 3% (wt/wt), a 39% reduction in plasma α T content was found (Figure 3A). Similar results were obtained in liver ($P=0.080$), in which the lowest α T content was also encountered in animals on 3% LO diets. All the other treatments led to higher and similar liver α T

content (Figure 3B). These reductions in α T content were in accordance with the FA composition of tissues which, as discussed above, also depended on the dose and source of n-3- or n-6-rich vegetable fat. The amount of unsaturated fat rose as LO increased in feeds. Therefore, the increase of PUFA in tissues, which are more prone to oxidation than SFA or MUFA (Frankel, 1998), might explain these reductions in α T content. When the source of fat was SO, the effects on α T content were attenuated, as the FA profile of tissues was less unsaturated than when LO was used. In liver, α T might be accumulated and released into circulation when the demand for α T in tissues (i.e. muscles) increases as a result of greater oxidability. This might explain why α T in meat was not significantly affected by PUFA increases (Tres *et al.*, 2008) than plasma and liver.

Susceptibility to oxidation and oxidation levels in rabbit plasma, liver and meat

The FOX method applied in this study evaluates the susceptibility of samples to lipid oxidation. It is an induced method that assesses sample oxidability by measuring the LHP formed in the FOX reaction media over time. It has been applied to chicken and rabbit meat (Grau *et al.*, 2000a; Bou *et al.*, 2005; Bou *et al.*, 2008; Tres *et al.*, 2008), but this is the first time that it has been used on rabbit's plasma and liver samples. Oxidation was assessed by the TBA value, which measures the content of malondialdehyde (MDA, a secondary oxidation compound) in the sample.

Both LHP and TBA values in the different samples decreased in the following order: liver, meat and plasma (Table 4), which was the same as the order for the fat content in the different tissues. Positive correlations were found between the LHP value of liver and the LHP value of meat, and between the TBA and the LHP of liver (Table 5).

Plasma TBA values were below the detection limit in all samples: 13 μ g of MDA/L plasma. This low oxidation status of plasma might be related to its high ratio α T/FA content with respect to fattier tissues, such as liver and meat.

Negative correlations were found between the α T content of plasma and the LHP value in liver and meat, as well as between plasma α T content and meat TBA value (Table

5). Therefore, plasma α T content was a good indicator of meat oxidation and of the susceptibility to oxidation of liver and meat thus supporting the antioxidant effect of α T against oxidation.

The dietary supplementation with TA (100 mg/kg) did not significantly modify liver oxidation levels (TBA values) or their susceptibility to oxidation (LHP values) although it tended to be reduced (Table 4), due to the protection effect of the increased α T content against induced oxidation. In meat, this effect was significant (Tres *et al.*, 2008). Reductions in meat, liver and plasma oxidation and oxidability as a result of TA supplementation have been previously reported in rabbit (Castellini *et al.*, 2001; Oriani *et al.*, 2001; Dal Bosco *et al.*, 2004; Dal Bosco *et al.*, 2004; Zsedely *et al.*, 2008) and other animals (Monahan *et al.*, 1990; Grau *et al.*, 2001; Bou *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2004).

Plasma and liver susceptibility to oxidation, measured by means of the FOX induced method, was altered by the dose of vegetable fat used to replace BT in feeds (in plasma it was significant when the least-squares means were separated by the Duncan's test, however, the Scheffé's test did not give significant differences) (Table 4). The same tendency was observed for liver TBA value (Table 4). The higher oxidation and lower oxidative stability of tissues as a result of increasing the dose of vegetable fat in feeds could be attributed to the increase in their PUFA content, which are more prone to oxidize than SFA and MUFA (Frankel, 1998). This may have led to lower α T contents in the studied tissues (as discussed above) (Table 4). Whether this vegetable fat was SO or LO did not affect LHP or TBA values of plasma and liver, although the addition of LO reduced their α T contents (Table 4). In meat however, LO increased TBA values (Tres *et al.*, 2008). Therefore, although the increase in PUFA in tissues may be interesting from a nutritional point of view, and in the prevention of some chronic diseases (Kinsella *et al.*, 1990; Simopoulos, 1997; Siddiqui *et al.*, 2008), it might cause a reduction in α T content and an increase in tissue oxidability that should be avoided, due to the negative biological effects that have been described for various oxidation compounds (Guardiola *et al.*, 2002; Niki *et al.*, 2005; Spiteller, 2006).

Rabbit producers should take this into account, because the α T content usually found in basal diets might not be enough for preventing oxidation in rabbit tissues, especially when unsaturated fats are added to feeds. The assessment of rabbit plasma α T content might be indicative of tissue oxidability. Apart from the *in vivo* effects of oxidation in tissues, oxidation might be *post-mortem* developed. Oxidation in tissues increases as a result of pre-slaughter stress, slaughtering techniques, *post mortem* pH, carcass temperature, disruption of cell membranes, as well as during processing and storage, which might reduce their nutritional and sensory quality due to the loss of PUFA and α T, and the formation of secondary oxidation compounds presenting unpleasant flavours (Gray *et al.*, 1996; Erickson, 2007).

In another part of this study (Tres *et al.*, 2008), cooking of meat and the refrigerated storage of cooked meat, reduced its α T content and increased its oxidation, reaching the lowest α T content and the highest increase in oxidation when 3% LO diets had not been supplemented with TA (Tres *et al.*, 2008). Dietary supplementation with 100 mg TA/kg on 3% LO diets, or the addition of 1.5% (wt/wt) LO with or without TA supplementation, diminished this oxidation (Tres *et al.*, 2008).

In summary, the dose of n-6- or n-3-rich vegetable fats and dietary supplementation with TA (100 mg/kg) modified the FA composition, the α T content and the oxidative stability of rabbit plasma, liver and meat. The FA composition was modified by the accumulation of FA absorbed from the diet, and by changes in some metabolic pathways due to the dietary treatments. As BT was replaced in feeds with increasing doses of LO (n-3-rich vegetable fat source), the ratio n-6/n-3 was more favored from a nutritional point of view. The n-6/n-3 ratio was decreased due to absorption of linolenic acid from the diet, which led to higher long-chain n-3 FA biosynthesis. However, this increase in plasma, liver and meat unsaturation increased their susceptibility to oxidation, which was prevented by dietary supplementation with TA (100 mg/kg). Therefore, the combination of 1.5% (wt/wt) LO plus 1.5% (wt/wt) BT, and 100 mg of TA/kg of feed is the best diet out of those studied, as it provides a healthier n-6/n-3 ratio in tissues and good protection against oxidation. Furthermore, as significant negative correlations have been encountered between α T content in plasma and the

oxidative stability of tissues, plasma α T determination could be useful in the assessment of the α T status and the oxidability of rabbit tissues beforehand.

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Education (MEC) (Research project AGL2003-06559-C02-01 and a Ph.D. grant [FPU] to A. Tres) and by a research grant from Instituto Danone to A. Tres. The authors thank the Department of Animal Science of the Polytechnic University of Valencia for preparing diets, housing animals, and providing slaughtering facilities. They are also grateful to E. Carmona and L. Bourgain for their help in the analyses.

References

- Arterburn LM, Hall EB and Oken H 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 83, 1467S-1476S.
- Bernardini M, Dal Bosco A and Castellini C 1999. Effect of dietary n-3/n-6 ratio on fatty acid composition of liver, meat and perirenal fat in rabbits. *Animal Science* 68, 647-654.
- Bou R, Guardiola F, Tres A, Barroeta AC and Codony R 2004. Effect of dietary fish oil, alpha-tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poultry Science* 83, 282-292.
- Bou R, Codony R, Baucells MD and Guardiola F 2005. Effect of heated sunflower oil and dietary supplements on the composition, oxidative stability, and sensory quality of dark chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7792-7801.
- Bou R, Grimpa S, Baucells MD, Codony R and Guardiola F 2006a. Dose and duration effect of alpha-tocopheryl acetate supplementation on chicken meat fatty acid composition, tocopherol content, and oxidative status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5020-5026.
- Bou R, Grimpa S, Guardiola F, Barroeta AC and Codony R 2006b. Effects of various fat sources, alpha-tocopheryl acetate and ascorbic acid supplements on fatty acid composition and alpha-tocopherol content in raw and vacuum-packed, cooked dark chicken meat. *Poultry Science* 85, 1472-1481.

Bou R, Codony R, Tres A, Decker EA and Guardiola F 2008. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylene orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry* 377, 1-15.

Burdge GC and Calder PC 2005a. Alpha-linolenic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 426-439.

Burdge GC and Calder PC 2005b. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reproduction Nutrition Development* 45, 581-597.

Castellini C, Dal Bosco A, Bernardini M and Cyril HW 1998. Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability of raw and cooked rabbit meat. *Meat Science* 50, 153-161.

Castellini C, Dal Bosco A and Bernardini M 2001. Improvement of lipid stability of rabbit meat by vitamin E and C administration. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 46-53.

Cherian G and Sim JS 1995. Dietary alpha-linolenic acid alters the fatty acid composition of lipid classes in swine tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2911-2916.

Cherian G, Wolfe FW and Sim JS 1996. Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poultry Science* 75, 423-431.

Corino C, Lo Fiego DP, Macchioni P, Pastorelli G, Di Giancamillo A, Domeneghini C and Rossi R 2007. Influence of dietary conjugated linoleic acids and vitamin E on meat quality, and adipose tissue in rabbits. *Meat Science* 76, 19-28.

Dal Bosco A, Castellini C, Bianchi L and Mugnai C 2004. Effect of dietary α -linolenic acid and vitamin E on the fatty acid composition, storage stability and sensory traits of rabbit meat. *Meat Science* 66, 407-413.

Dalle Zotte A 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science* 75, 11-32.

D'Arrigo M, Hoz L, Lopez-Bote CJ, Cambero MI, Pin C and Ordonez JA 2002. Effect of dietary linseed oil on pig hepatic tissue fatty acid composition and susceptibility to lipid peroxidation. *Nutrition Research* 22, 1189-1196.

Enser M, Richardson RI, Wood JD, Gill BP and Sheard PR 2000. Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Science* 55, 201-212.

Erickson MC 2007. Lipid oxidation of muscle foods. In *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology* (eds CC Akoh and DB Min), CRC Press, Boca Raton, FL.

Food and Nutrition Board. 2005. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids (macronutrients). The National Academies Press, Washington, DC.

Food Standards Agency. 2002. McCance and Widdowson's *The Composition of Foods*, 6 th edition. Cambridge, UK.

Frankel EN 1998. *Lipid oxidation*, The Oily Press LTD, Dundee, UK.

Gigaud V and Combes S 2008. The effect of decreasing the omega 6/ omega 3 ratio in feed on fatty acid content of rabbit meat to meet human dietary recommendations. In *Book of Abstracts of the 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, pp. 1353-1357.

Grau A, Codony R, Rafecas M, Barroeta AC and Guardiola F 2000a. Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xylene orange method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4136-4143.

Grau A, Guardiola F, Boatella J, Barroeta AC and Codony R 2000b. Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1155-1159.

Grau A, Guardiola F, Grimpa S, Barroeta AC and Codony R 2001. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poultry Science* 80, 1630-1642.

Gray JI, Gomaa EA and Buckley DJ 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science* 43, S111-S123.

Guardiola F, Codony R, Rafecas M, Boatella J and Lopez A 1994. Fatty acid composition and nutritional value of fresh eggs, from large- and small-scale farms. *Journal of Food Composition and Analysis* 7, 171-188.

Guardiola F, Dutta PC, Codony R and Savage GP 2002. Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects. AOCS Press, Champaign, IL.

Hoz L, Lopez-Bote CJ, Cambero MI, D'Arrigo M, Pin C, Santos C and Ordonez JA 2003. Effect of dietary linseed oil and alpha-tocopherol on pork tenderloin (Psoas major) muscle. *Meat Science* 65, 1039-1044.

Kinsella JE, Lokesh B and Stone RA 1990. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition* 52, 1-28.

Lo Fiego DP, Santoro P, Macchioni P, Mazzone D, Piattoni F, Tassone F and De Leonibus E 2004. The effect of dietary supplementation of vitamins C and E on the α -tocopherol content of muscles, liver and kidney, on the stability of lipids, and on certain meat quality parameters of the longissimus dorsi of rabbits. *Meat Science* 67, 319-327.

Maertens L, Huyghebaert G and Delezie E 2008. Fatty acid composition of rabbit meat when fed a linseed based diet during different periods after weaning. In *Book of Abstracts of the 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, pp. 1381-1386.

McCloy U, Ryan MA, Pencharz PB, Ross RJ and Cunnane SC 2004. A comparison of the metabolism of eighteen-carbon C-13-unsaturated fatty acids in healthy women. *Journal of Lipid Research* 45, 474-485.

Monahan FJ, Buckley DJ, Gray JI, Morrissey PA, Asghar A, Hanrahan TJ and Lynch PB 1990. Effect of dietary Vitamin E on the stability of raw and cooked pork. *Meat Science* 27, 99-108.

Nettleton JA 1991. Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *Journal of the American Dietetic Association* 91, 331-337.

Niki E, Yoshida Y, Saito Y and Noguchi N 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 668-676.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J and Wolff SP 1994. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analytical Biochemistry* 220, 403-409.

Nuernberg K, Fischer K, Nuernberg G, Kuechenmeister U, Klosowska D, Eliminowska-Wenda G, Fiedler I and Eder K 2005. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. *Meat Science* 70, 63-74.

Oriani G, Corino C, Pastorelli G, Pantaleo L, Ritieni A and Salvatori G 2001. Oxidative status of plasma and muscle in rabbits supplemented with dietary vitamin E. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 12, 138-143.

Pla M and Cervera C 1997. Carcass and meat quality of rabbits given diets having a high level of vegetable or animal fat. *Animal Science* 65, 299-303.

Russell EA, Lynch PB, O'Sullivan K and Kerry JP 2004. Dietary supplementation of α -tocopheryl acetate on α -tocopherol levels in duck tissues and its influence on meat storage stability. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 331-340.

Sessler AM, Kaur N, Palta JP and Ntambi JM 1996. Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase 1mRNA Stability by Polyunsaturated Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 271, 29854-29858.

Sheehy PJA, Morrissey PA and Flynn A 1994. Consumption of thermally-oxidized sunflower oil by chicks reduces alpha-tocopherol status and increases susceptibility of tissues to lipid oxidation. *The British Journal of Nutrition* 71, 53-65.

Siddiqui RA, Harvey KA and Zaloga GP 2008. Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 417-437.

Simopoulos AP 1997. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Food Reviews International* 13, 623-631.

Simopoulos AP 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy* 56, 365-379.

Sodergren E, Nourooz-Zadeh J, Berglund L and Vessby B 1998. Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 37, 137-146.

Spiteller G 2006. Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology and Medicine* 41, 362-387.

Surai PF and Sparks NHC 2000. Tissue-specific fatty acid and α -tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poultry Science* 79, 1132-1142.

Tres A, Bou R, Codony C and Guardiola F 2008. Influence of different dietary doses of n-3- or n-6-rich vegetable fats and alpha-tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7243-7253.

VanderJagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA and VanderJagt DL 2001. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clinical Biochemistry* 34, 265-270.

Wood JD and Enser M 1997. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *British Journal of Nutrition* 78, S49-S60.

Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR and Enser M 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science* 66, 21-32.

Zsedely E, Toth T, Eiben C, Virag G, Fabian J and Schmidt J 2008. Effect of dietary vegetable oil (sunflower, linseed) and vitamin E supplementation on the fatty acid composition, oxidative stability and quality of rabbit meat. In *Book of Abstracts of the 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, pp. 1473-1477.

Table 1. Fatty acid composition of rabbit plasma (mg of FA/L) depending on the dose and source of vegetable fat used to replace beef tallow in feeds, and on dietary supplementation with α -tocopheryl acetate¹

	Dose of vegetable fat			Source of fat		TA	
	0%	1.5%	3%	SO	LO	0 mg/kg	100 mg/kg
C12:0	9.9	15.0	14.6	15.6	10.7	12.8	13.5
C14:0	36	35	30	36	32	33	35
C15:0	12.4	16.2	21.3	17.1	16.1	16.6	16.7
iso-16:0	15.3	14.7	14.9	14.9	15.1	15.3	14.7
C16:0	390	410	350	400	370	390	370
C17:0	18.1	17.2	15.5	17.6	16.2	17.3	16.5
C18:0	198	206	191	209	188	203	194
C20:0	2.18	3.09	3.19	3.09	2.55	2.91	2.73
C24:0	2.46 ^a	3.41 ^b	3.29 ^b	3.23	2.88	3.08	3.03
Total SFA	680	720	650	720	650	700	670
C16:1n-9 ²	10.5	12.5	10.6	13.0 ^b	9.4 ^a	11.2	11.2
C18:1n-9	470	490	380	460	440	460	440
C20:1n-9	8.76	6.89	6.09	7.45	7.04	7.38	7.11
C24:1n-9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C16:1n-7	21.3	21.7	16.5	18.4	21.2	18.3	21.4
C18:1n-7	22.1	21.0	16.9	19.8	20.1	20.1	19.9
Total MUFA	540	550	430	520	500	520	500
C18:2n-6 ³	420	550	590	590 ^b	450 ^a	520	520
C18:3n-6	1.51	2.05	1.81	1.79	1.79	1.59	1.99
C20:2n-6 ³	7.67	7.95	8.94	9.84 ^b	6.53 ^a	9.05	7.33
C20:3n-6 ³	5.08	5.29	5.42	5.75 ^b	4.77 ^a	5.32	5.21
C20:4n-6	37	41	41	43 ^b	36 ^a	39	40
C22:4n-6 ³	3.45	3.91	3.95	5.04 ^b	2.51 ^a	3.81	3.73
C22:5n-6 ³	1.76	2.13	2.22	2.48 ^b	1.61 ^a	1.95	2.13
Total n-6 PUFA ³	470	610	650	650 ^b	500 ^a	580	570
C18:3n-3 ³	26.7 ^a	71.2 ^b	102 ^c	27.8 ^a	105 ^b	70	63
C18:4n-3	N.D.	tr	1.96	tr	tr	tr	tr
C20:3n-3 ³	2.10 ^a	4.11 ^b	6.35 ^c	2.01 ^a	6.36 ^b	4.45	3.93

C20:5n-3 ³	1.00 ^a	1.84 ^b	2.56 ^c	0.69 ^a	2.91 ^b	1.82	1.78
C22:5n-3	2.65	5.19	7.58	2.61 ^a	7.67 ^b	4.97	5.31
C22:6n-3 ³	2.55 ^a	3.02 ^b	3.45 ^c	2.43 ^a	3.58 ^b	3.00	3.02
Total n-3 PUFA ³	38 ^a	85 ^b	121 ^c	36 ^a	126 ^b	85	77
Total PUFA	530	670	790	720	610	680	650
<i>t</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	1.86 ^b	1.58 ^b	1.01 ^a	1.50	1.47	1.44	1.53
<i>c</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	1.82	2.04	1.82	1.91	1.88	1.95	1.84
<i>t</i> 9, <i>c</i> 12-18:2	0.86	1.26	1.36	1.17	1.15	1.12	1.20
Total <i>trans</i> 18:2	4.54 ^b	4.87 ^b	4.19 ^a	4.57	4.50	4.50	4.57
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	1.2 ^b	0.4 ^a	tr	0.7	0.4	0.8	0.4
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA	tr	tr	N.D.	tr	tr	tr	tr
<i>ditrans</i> -CLA ⁴	0.51	0.69	1.12	0.61	0.94	0.82	0.73
Total CLA	1.7	1.1	1.1	1.2	1.3	1.6	1.1
<i>trans</i> -18:1	25.8 ^c	22.3 ^b	10.7 ^a	20.6	18.6	20.5	18.7
Total <i>trans</i> FA	32 ^b	28 ^b	16 ^a	27	24	26	24
Ratio PUFA/SFA	0.74 ^a	0.97 ^b	1.20 ^c	0.97	0.96	0.94	0.99
Ratio n-6/n-3 ³	14.1	11.7	13.7	19.5 ^b	6.8 ^a	13.1	13.0

Abbreviations used: FA; fatty acid; SO, sunflower oil; LO, linseed oil; TA, α -tocopheryl acetate; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; N.D., not detected; tr, traces.

¹ Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=48).

² Interaction between dose of fat x TA supplementation significant at $P \leq 0.05$. P values were obtained from multifactor ANOVA, n=48.

³ Interaction between dose of fat x source of fat significant at $P \leq 0.05$. P values were obtained from multifactor ANOVA, n=48.

⁴ *Ditran*-CLA: mixture of isomers.

^{a,b,c} Within a row, means for a certain factor without a common superscript letter differ ($P \leq 0.05$). P values were obtained from multifactor ANOVA, n=48. Letters were obtained by means of the Scheffé's test ($\alpha=0.05$).

Table 2. Fatty acid composition of liver (mg of FA/100 g) depending on the dose and source of vegetable fat used to replace beef tallow in feeds, and on dietary supplementation with α -tocopheryl acetate¹

	Dose of vegetable fat			Source of fat		TA	
	0%	1.5%	3%	SO	LO	0 mg/kg	100 mg/kg
C12:0	1.29	0.99	0.96	1.15	1.02	1.14	1.02
C14:0	19.4 ^b	13.2 ^a	12.7 ^a	15.5	14.7	16.1	14.1
C15:0	9.8	9.9	10.0	10.5	10.0	10.5	10.0
iso-16:0	48	46	46	46	46	47	46
C16:0	490	440	460	470	460	480	450
C17:0	26	27	28	27	27	28	27
C18:0	470 ^a	530 ^b	570 ^b	530	520	530	520
C20:0	1.91 ^a	1.93 ^a	2.2 ^b	2.01	2.02	2.06	1.96
C24:0	1.83 ^a	2.13 ^b	2.48 ^b	2.19	2.11	2.15	2.15
Total SFA	1070	1070	1130	1110	1080	1110	1080
C16:1n-9	9.8 ^b	7.8 ^a	7.8 ^a	8.7	8.2	8.9	8.1
C18:1n-9	500 ^c	340 ^b	290 ^a	380	390	400 ^b	370 ^a
C20:1n-9	16.1 ^b	9.4 ^a	7.8 ^a	10.9	11.2	11.7	10.5
C22:1n-9	15.0	14.5	13.7	15.1 ^b	13.8 ^a	14.6	14.3
C24:1n-9	18.7 ^b	16.2 ^a	14.5 ^a	16.1	16.8	16.7	16.2
C16:1n-7	21.4 ^b	14.7 ^a	12.0 ^a	15.7	16.4	17.0	15.1
C18:1n-7	38 ^c	28 ^b	25 ^a	29	31	31	29
Total MUFA	620 ^c	430 ^b	370 ^a	470	480	500 ^b	460 ^a
C18:2n-6 ²	680 ^a	780 ^b	910 ^c	850 ^b	730 ^a	800	780
C18:3n-6	1.30 ^a	1.65 ^b	1.83 ^b	1.77 ^b	1.42 ^a	1.56	1.63
C20:2n-6 ²	32	31	37	37 ^b	30 ^a	35	32
C20:3n-6 ²	18.8 ^a	20.9 ^a	23.9 ^b	22.8 ^b	19.5 ^a	21.2	21.2
C20:4n-6 ²	134 ^a	156 ^b	162 ^b	166 ^b	136 ^a	148	153
C22:4n-6 ²	21.0	20.2	21.3	27.2 ^b	14.5 ^a	21.0	20.6
C22:5n-6 ²	12.6	13.1	13.6	16.4 ^b	9.8 ^a	13.0	13.2
Total n-6 PUFA ²	900 ^a	1020 ^b	1170 ^c	1120 ^b	940 ^a	1040	1020
C18:3n-3 ²	28 ^a	71 ^b	111 ^c	25 ^a	115 ^b	71	68
C18:4n-3 ²	0.31	0.31	0.38	0.24 ^a	0.43 ^b	0.34	0.33
C20:3n-3 ²	3.7 ^a	8.9 ^b	13.0 ^c	2.8 ^a	14.3 ^b	8.9	8.2

C20:5n-3 ²	2.2 ^a	4.7 ^b	7.7 ^c	1.5 ^a	8.2 ^b	4.7	5.0
C22:5n-3 ²	10.6 ^a	21.6 ^b	28.0 ^c	8.4 ^a	31.8 ^b	19.4	20.8
C22:6n-3 ²	6.1 ^a	10.2 ^b	13.2 ^c	5.2 ^a	14.5 ^b	9.6	10.1
Total n-3 PUFA ²	51 ^a	116 ^b	173 ^c	43 ^a	184 ^b	114	113
Total PUFA	950 ^a	1140 ^b	1340 ^c	1160	1120	1160	1130
t9,t12-18:2	1.57 ^c	1.15 ^b	0.36 ^a	1.02	1.04	1.02	1.04
c9,t12-18:2	2.90 ^c	2.17 ^b	1.87 ^a	2.29	2.34	2.39	2.23
t9,c12-18:2 ²³	1.79 ^b	1.65 ^b	1.47 ^a	1.57 ^a	1.70 ^b	1.64	1.63
Total <i>trans</i> -18:2 ⁴	6.25 ^c	4.97 ^b	3.69 ^a	4.87	5.08	5.05	4.90
c9,t11-CLA	3.09 ^c	1.74 ^b	0.97 ^a	1.98	1.89	1.94	1.93
t10, c12-CLA ²	0.26 ^a	0.30 ^b	0.31 ^b	0.31 ^b	0.27 ^a	0.29	0.30
<i>ditrans</i> -CLA ⁵	1.55 ^c	0.94 ^b	0.67 ^a	1.02	1.08	1.08	1.02
Total CLA	4.89 ^c	2.98 ^b	1.95 ^a	3.31	3.24	3.31	3.24
<i>trans</i> -18:1	30.0 ^c	22.2 ^b	8.8 ^a	20.6	20.2	20.9	19.8
Total <i>trans</i> FA	41.3 ^c	30.1 ^b	14.5 ^a	28.8	28.5	29.3	28.0
Ratio PUFA/SFA	0.88 ^a	1.06 ^b	1.19 ^c	1.05	1.04	1.04	1.05
Ratio n-6/n-3 ²	17.5 ^a	16.0 ^a	20.7 ^b	27.7 ^b	8.5 ^a	18.2	18.0

Abbreviations used: FA; fatty acid; SO, sunflower oil; LO, linseed oil; TA, α -tocopheryl acetate; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; N.D., not detected.

¹ Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=48).

² Interaction between dose of fat x source of fat significant at $P \leq 0.05$. P values were obtained from multifactor ANOVA, n=48.

³ Interaction between source of fat x TA supplementation significant at $P \leq 0.05$. P values were obtained from multifactor ANOVA, n=48.

⁴ Interaction between dose of fat x source of fat x TA supplementation significant at $P \leq 0.05$. P values obtained from multifactor ANOVA, n=48.

⁵ *Ditrans*-CLA: mixture of isomers.

^{a,b,c} Within a row, means for a certain factor without a common superscript letter differ ($P \leq 0.05$). P values were obtained from multifactor ANOVA, n=48. Letters were obtained by means of the Scheffé's test ($\alpha=0.05$).

Table 3. Effect of the source and dose of unsaturated fat used to replace beef tallow in feeds on the content of n-6 and n-3 FA in plasma (mg of fatty acid/L of plasma) and liver (mg of fatty acid/100 g of liver)¹.

	Plasma						Liver					
	Sig ²	3% BT	1.5% SO ³	3% SO	1.5% LO ³	3% LO	Sig ²	3% BT	1.5% SO ³	3% SO	1.5% LO ³	3% LO
C18:2n-6	*	420	580	760	520	410	**	680	850	1020	710	800
C18:3n-6	ns	1.51	1.85	2.00	2.24	1.62	ns	1.3	1.8	2.2	1.5	1.5
C20:2n-6	*	7.67	9.40	12.4	6.51	5.42	***	32	33	46	30	27
C20:3n-6	*	5.08	5.64	6.56	4.94	4.30	***	19	22	28	20	20
C20:4n-6	ns	37	46	47	35	35	**	134	174	189	138	136
C22:4n-6	***	3.45	5.12	6.54	2.70	1.37	***	21	27	34	13	9.1
C22:5n-6	**	1.76	2.58	3.08	1.69	1.37	***	13	17	20	9.4	7.3
Total n-6 PUFA	*	470	650	840	570	450	**	900	1120	1340	920	1000
C18:3n-3	***	27	28	29	114	174	***	28	24	21	116	200
C18:4n-3	ns	N.D.	0.21	1.17	0.26	2.74	***	0.31	0.23	0.17	0.40	0.60
C20:3n-3	***	2.10	1.61	2.32	6.61	10.3	***	3.7	2.3	2.3	16	24
C20:5n-3	***	1.00	0.73	0.32	2.94	4.79	***	2.2	1.5	0.87	7.9	14.4
C22:5n-3	***	2.65	2.41	2.78	7.97	12.4	***	11	8.2	6.4	35	50
C22:6n-3	***	2.55	2.53	2.21	3.51	4.69	***	6.1	5.1	4.5	15	22
Total n-3 PUFA	***	37	34	36	136	205	***	51	42	35	190	310
Total PUFA	ns	530	710	910	630	660	ns	950	1160	1370	1110	1310

Ratio PUFA/SFA	ns	0.74	0.90	1.25	1.05	1.11	ns	0.88	1.07	1.20	1.05	1.18
Ratio n-6/n-3	***	14.1	19.2	25.2	4.2	2.2	***	17.5	27.2	38.3	4.9	3.2

Abbreviations used: FA; fatty acid; BT, beef tallow; SO, sunflower oil; LO, linseed oil; N.D., not detected; ns, not significant.

¹Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=48 for plasma, n=48 for liver).

²Significance. *P* values obtained from multifactor ANOVA (n=48 for plasma, n=48 for liver). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

³Total fat added to feeds was completed up to 3% (wt/wt) with beef tallow.

Table 4. Content of α -tocopherol, LHP and TBA values of rabbit plasma, liver and meat depending on the dose and source of n-6- or n-3-rich vegetable fat used to replace beef tallow in feeds, and on dietary supplementation with α -tocopheryl acetate (100 mg/kg)¹

	Dose of vegetable fat			Source of fat		TA	
	0%	1.5%	3%	SO	LO	0 mg/kg	100 mg/kg
α -Tocopherol content ²							
Feed	77.69	77.47	79.87	81.06 ^b	75.60 ^a	32.25 ^a	123.44 ^b
Plasma ^{5,6}	4.86 ^b	3.84 ^a	3.76 ^a	4.54 ^b	3.76 ^a	2.50 ^a	5.80 ^b
Liver	9.90 ^b	9.24 ^{ab}	8.48 ^b	9.57 ^b	8.85 ^a	4.55 ^a	13.86 ^b
Meat	3.05	2.95	2.77	3.03	2.82	1.39 ^a	4.46 ^b
LHP value ³							
Plasma	0.041 ^a	0.041 ^a	0.045 ^b	0.042	0.042	0.042	0.042
Liver	2.00 ^a	4.01 ^b	5.02 ^b	3.65	3.70	4.04	3.31
Meat	0.51 ^a	0.73 ^{ab}	0.81 ^b	0.65	0.71	0.71 ^a	0.56 ^b
TBA value ⁴							
Plasma	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Liver	68	72	77	73	73	70	75
Meat ^{5,6,7,8}	28 ^a	29 ^a	52 ^b	30 ^a	43 ^b	41 ^b	31 ^a

Abbreviations used: SO, sunflower oil; LO, linseed oil; TA, α -tocopheryl acetate; LHP, lipid hydroperoxide; TBA, thiobarbituric acid; N.D., not detected.

¹ Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=36 for feeds; n=48 for plasma, liver and meat)

² Content of α -tocopherol in feed, liver and meat expressed as mg α -tocopherol/kg of feed, liver or meat; in plasma expressed as mg α -tocopherol/L of plasma.

³ LHP value of plasma expressed as mmol CHP eq/L of plasma; in liver and meat expressed as mmol CHP eq/kg of liver or meat.

⁴ TBA value in all plasma samples was under the detection limit (13 μ g malondialdehyde/L of plasma). TBA value in liver and meat expressed as μ g malondialdehyde/kg of liver or meat.

⁵ Interaction between dose of fat x TA supplementation significant at $P \leq 0.05$. *P* values were obtained from multifactor ANOVA, n=48.

⁶ Interaction between dose of fat x source of fat significant at $P \leq 0.05$. *P* values were obtained from multifactor ANOVA, n=48.

⁷ Interaction between source of fat x TA supplementation significant at $P \leq 0.05$. *P* values were obtained from multifactor ANOVA, n=48.

⁸ Interaction between dose of fat x source of fat x TA supplementation significant at $P \leq 0.05$. *P* values obtained from multifactor ANOVA, n=48.

^{a,b} Within a row, means for a certain factor without a common superscript letter differ ($P \leq 0.05$). *P* values were obtained from multifactor ANOVA, $n=48$. Letters were obtained by means of the Scheffé's test ($\alpha=0.05$), except in plasma LHP value in which Duncan's test was used ($\alpha=0.05$).

Table 5. Pearson correlation coefficients between α -tocopherol content, TBA value and lipid hydroperoxide value in rabbit plasma, liver and meat.

		Plasma αT^1	Liver αT	Meat αT	Plasma LHP	Liver LHP	Meat LHP	Liver TBA	Meat TBA
Plasma αT	r	1	0.939	0.917	-0.047	-0.415	-0.470	0.095	-0.310
	(P)		(0.000)	(0.000)	(0.750)	(0.003)	(0.001)	(0.522)	(0.032)
	n	48	48	48	48	48	48	48	48
Liver αT	r		1	0.973	-0.064	-0.307	-0.440	0.165	-0.292
	(P)			(0.000)	(0.665)	(0.034)	(0.002)	(0.261)	(0.044)
	n		48	48	48	48	48	48	48
Meat αT	r			1	-0.068	-0.318	-0.359	0.104	-0.255
	(P)				(0.645)	(0.028)	(0.012)	(0.482)	(0.080)
	n			48	48	48	48	48	48
Plasma LHP	r				1	0.198	0.033	0.166	0.227
	(P)					(0.176)	(0.825)	(0.258)	(0.121)
	n				48	48	48	48	48
Liver LHP	r					1	0.480	0.299	0.240
	(P)						(0.001)	(0.039)	(0.164)
	n					48	48	48	48
Meat LHP	r						1	0.120	0.145
	(P)							(0.415)	(0.326)
	n						48	48	48
Liver TBA	r							1	0.216
	(P)								(0.141)
	n							48	48
Meat TBA	r								1
	(P)								
	n								48

¹Abbreviations used: αT , α -tocopherol; LHP, lipid hydroperoxide value; TBA, thiobarbituric acid value. *r* is the Pearson correlation coefficient; the *P* value is stated in parentheses.

Figure captions

Figure 1. Ratio between long-chain n-6 fatty acids synthesized from linoleic acid and linoleic acid (in black), and ratio between long-chain n-3 fatty acids synthesized from linolenic acid and linolenic acid (in white), in rabbit plasma, liver and meat.

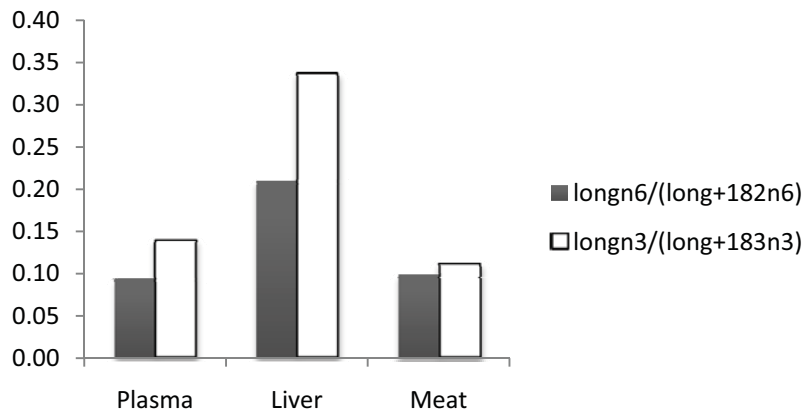


Figure 2. Content of α -tocopherol in plasma depending on the dose of vegetable fat used to replace beef tallow in feeds and dietary supplementation with α -tocopheryl acetate (0 mg/kg, discontinuous line – open symbols, or 100 mg/kg, continuous line, bold symbols).

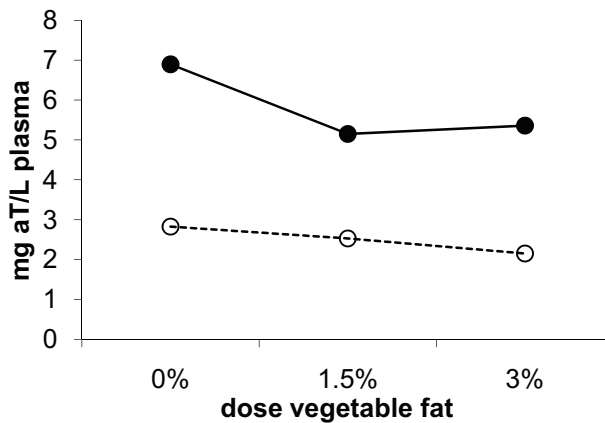
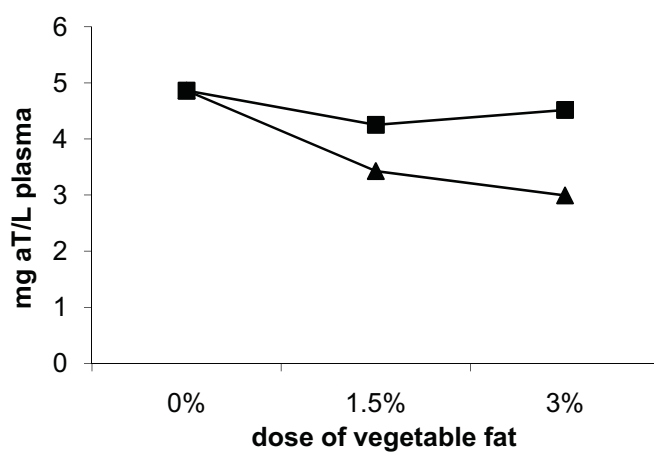
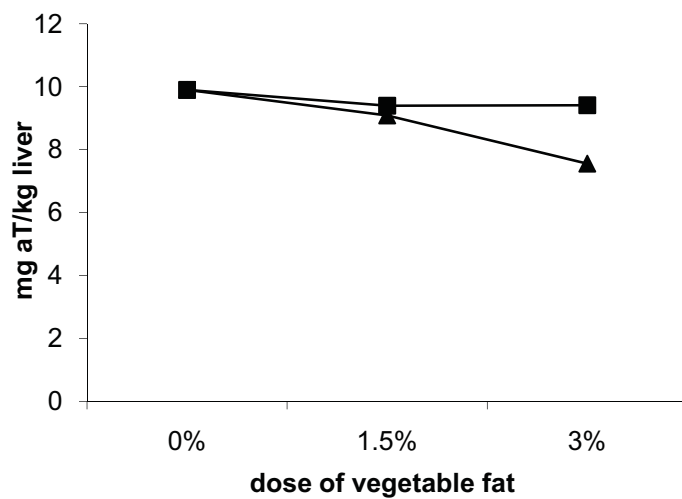


Figure 3. Content of α -tocopherol in plasma ($P<0.05$) (A) and liver (B) ($P=0.080$) depending on the dose of vegetable fat used to replace beef tallow in feeds and the source of n-6- or n-3-rich vegetable fat used (sunflower oil in squares, linseed oil in triangles).

A)



B)



5.3. Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through a ferrous oxidation-xylene orange method.

Título: Evaluación de la susceptibilidad a la oxidación en tejidos de conejo y pollo mediante el método basado en la oxidación de Fe (II) en presencia de naranja de xilenol.

Revista: European Journal of Lipid Science and Technology (En prensa).

Índice de impacto: 0,91; Posición 52 / 103 (Journal Citation Reports, 2007).

Resumen: Se utilizó el método de oxidación de Fe(II) en presencia de naranja de xilenol (índice FOX) en su versión inducida para evaluar la estabilidad oxidativa de carnes.

Hasta el momento, en la versión inducida del método FOX sólo se medían los HPL una vez que la reacción FOX proporcionase un valor de absorbancia estable a 560nm (valor final de HPL). Pero al aplicar este método a las muestras de este estudio se evidenció que valores finales de FOX similares podían haber sido alcanzados siguiendo una diferente evolución a lo largo de la oxidación durante la reacción FOX. Así, al medir únicamente el valor final de HPL en las muestras, podían pasar desapercibidas grandes diferencias en la susceptibilidad a la oxidación entre las diferentes muestras.

En cambio, si en lugar de medir sólo el valor final de HPL durante el transcurso de la reacción FOX se toman valores de HPL en diferentes puntos, sería posible calcular diferentes parámetros como el tiempo de inducción, la velocidad con la que aumenta la oxidación, el valor máximo de HPL alcanzado y el tiempo al que se alcanza, y el área bajo la curva de HPL obtenida. El cálculo de estos parámetros puede aportar un mejor conocimiento acerca de cómo evoluciona la oxidación en cada muestra, que si sólo se

mide el valor final de HPL. Sin embargo, la precisión con la que se calculan estos parámetros depende del número de medidas de HPL realizadas durante el transcurso de la reacción FOX.

Esta mejora del método FOX inducido se aplicó para evaluar la susceptibilidad a la oxidación de muestras de carne.

5.4. Oxidized oils and dietary zinc and α -tocopheryl acetate supplementation: effects on rabbit plasma, liver and meat fatty acid composition and meat mineral content

Título: Incorporación de aceites oxidados a piensos y suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol y zinc: efectos sobre la composición en ácidos grasos de plasma, hígado y carne de conejo, y la composición mineral de la carne.

Revista: Enviado a Journal of Agricultural and Food Chemistry

Índice de impacto: 2,53; Posición 7 / 103 (Journal Citation Reports, 2007)

Resumen: Se han estudiado los efectos de la incorporación de aceites oxidados (3%, p/p) a pienso y la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) y con zinc (200 mg/kg) sobre la composición en ácidos grasos de los tejidos de conejo y la composición mineral (Zn, Se, Fe y Cu) de la carne.

Al calentar un aceite de girasol no refinado a 55°C durante 245 horas aumentó el contenido en compuestos de oxidación primaria, y se redujo su contenido en α -tocoferol. Sin embargo esto no tuvo repercusiones en la composición en ácidos grasos de los tejidos del conejo. En cambio, al calentar el aceite de girasol no refinado a 140°C durante 31 horas aumentaron los compuestos de oxidación secundaria, así como algunos isómeros de ácidos grasos como el 9*c*,11*t*-CLA y los *ditrans* CLA, aunque la cantidad alcanzada fue similar a la encontrada en aceites de girasol refinados no calentados. Esto llevó a un aumento de *ditrans* CLA en el hígado y de 9*t*,12*c*-18:2 en la carne. El 9*c*,11*t*-CLA fue el isómero de CLA más incorporado en los tejidos. La cocción a 78°C durante 5 minutos de la carne de conejo envasada al vacío redujo leve pero significativamente el contenido en AGPI de la carne.

La suplementación de la dieta con zinc (200 mg/kg) no modificó el contenido en Zn, Fe o Se de la carne, sin embargo redujo su contenido en cobre. Por otra parte, aumentó

el contenido en algunos ácidos grasos, cuando la suplementación con zinc se llevó a cabo en piensos que contenían aceites oxidados.

Oxidized oils and dietary zinc and α -tocopheryl acetate supplementation: effects on rabbit plasma, liver and meat fatty acid composition and meat mineral content

Tres A, Bou R, Codony R, Guardiola F.

Nutrition and Food Science Department – XaRTA – INSA
Faculty of Pharmacy, University of Barcelona
Av. Joan XIII s/n, 08028 Barcelona (Spain)

Corresponding author:

Francesc Guardiola

fguardiola@ub.edu

Nutrition and Food Science Department – XaRTA – INSA, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona

Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona (Spain)

Tel: +34-93-4034842

Fax: +34-93-4035931

Running title: Oxidized oils and dietary supplements in rabbit feeding

Keywords: heated oils, zinc supplementation, fatty acid isomers, α -tocopherol, meat oxidation, cooking, tissues, feed

ABSTRACT

The effects of the addition of heated oils to feeds (3%, w/w), and the dietary supplementation with α -tocopheryl acetate (100 mg/kg) and zinc (200 mg/kg) on rabbit tissue FA composition and on meat mineral (Zn, Se, Fe and Cu) content were assessed.

Heating unrefined sunflower oil at 55°C for 245 hours increased its content in primary oxidation products, and reduced its α T content. However, this did not significantly affect tissue FA composition. Heating sunflower oil for 140°C for 31 hours increased its content on secondary oxidation products and on some FA isomers as *c*9,*t*11-CLA and *ditrans* CLA, although the amount reached was similar to that in non heated refined sunflower oil. However, this led to increases in *ditrans* CLA in liver and in *t*9,*c*12-18:2 in meat. The *c*9,*t*11-CLA was the most incorporated CLA isomer in tissues. Cooking vaccum-packed rabbit meat at 78°C for 5 minutes reduced significantly but slightly its PUFA content.

The dietary supplementation with zinc did not modify the content of Zn, Fe or Se in meat, but it reduced its Cu content. On the other hand, it increased the content of some fatty acids in meat when oxidized sunflower oil was added to feeds.

INTRODUCTION

Fatty acid (FA) composition of animal tissues can be modified by the type and amount of dietary fat (1). Dietary recommendations suggest not only to reduce the intake of fat and cholesterol, but also of saturated (SFA) and *trans* FA, and to increase the intake polyunsaturated fatty acids (PUFA), mainly those from the n-3 series (2). Therefore, in order to obtain a more healthy meat, several unsaturated fat sources have been incorporated to feeds to nutritionally improve meat FA composition (1).

Unsaturated fat sources are prone to oxidation, which can occur both at low and high temperatures (3). At low temperatures, lipid hydroperoxides (LHP) increase until they reach a plateau, and then decompose into secondary oxidation compounds. Oxidation at low temperatures occurs for instance during storage of unsaturated fats at ambient temperature.

At high temperatures, decomposition of LHP is faster and isomerization of FA is also favored, leading to the appearance of both geometric and positional FA isomers, as several *trans* FA and conjugated linoleic acid (CLA). Also, some polymerization reactions can occur. Several co- and by-products from the food chain that are used in feeds are obtained through processes involving a high temperature.

Apart from the increase of oxidation compounds, lipid oxidation might reduce the content of some FA, vitamins and antioxidants in fats (3), which in turn can be reflected in tissues from animals fed these fats (4, 5).

Heated oils added to feeds have not led to toxic effects in animals, especially when fat is added to feeds at the usual amounts, and if this fat contains less than 25% of polar compounds (6, 7). However, if the content of *trans* FA in feeds increases, it might affect the *trans* FA content in animal tissues which is not nutritionally interesting (8). In addition, fat digestibility could be altered if it had a high polymer content (9). Also,

several detrimental biological effects have been described for some primary and secondary oxidation compounds (7, 10, 11), some of which could be absorbed from diets (10, 12) or formed in tissues (3, 10, 11).

Thus is essential to evaluate the oxidation and FA composition of fats before they are added to feeds to avoid unexpected alterations in tissues. While several studies have dealt with the addition of abused oils to feeds, the addition of moderately oxidized fats to feeds has been poorly studied, especially in rabbit feeds.

Oxidation occurring in tissues might lead to an impairment of its PUFA and vitamin composition, which could be avoided by the dietary supplementation with antioxidants, for instance α -tocopheryl acetate (TA) (1, 13). The dietary supplementation with TA has been reported to be effective reducing the loss of PUFA also during meat processing, cooking and storage (13).

Meats are a good source of minerals, which show a high bioavailability. As other minerals, zinc and selenium are of nutritional interest because usual intakes of these minerals by some communities, for instance elderly people, are often under the dietary recommendations (14-16). Mineral dietary supplementation has been poorly studied, and even less in rabbit feeding. But it has been shown that it is possible to enrich mineral content of meat and other animal products through the dietary supplementation with minerals. However, several minerals in diet affect the bioavailability of others. For instance regarding Se and Zn, Bou et al. (17, 18) achieved increases in the content of Se in chicken meat after dietary supplementation with zinc, while others have found decreases on the copper content as a result of high dietary zinc (16).

Here, we assessed the effects of the incorporation of oils rich in primary or secondary oxidation compounds to rabbit feeds and the dietary supplementation with TA and zinc, on the FA composition of rabbit plasma, liver and meat, as well as on meat Zn, Cu, Fe and Se content.

MATERIALS AND METHODS

Thermal treatment of oil

An unrefined sunflower oil (SO) was divided in three aliquots to perform the thermal treatment. The first aliquot, named fresh sunflower oil (FSO) did not suffer any thermal treatment. A second aliquot, named peroxidized sunflower oil (PSO), was heated at 55 °C for 245 h in a heat exchanger under agitation, and a third aliquot, named oxidized sunflower oil (OSO) was heated in a direct heating fryer at 140 °C for 31 h. Immediately after the thermal treatments, butyl hydroxytoluene was added to the oils at 100 mg/kg. Several oxidation variables and α -tocopherol (α T) content were measured in the three oils (Table 1).

Animals and diets

The preparation of diets and housing of animals took place in the Animal Science Department at the Polytechnic University of Valencia (Spain). Twelve isocaloric dietary treatments were prepared from a basal diet (Table 2) by the combination of the studied dietary factors, according to a factorial design (3×2×2), replicated four times: 3 types of oxidized sunflower oil (FSO, PSO and OSO) added to feeds at 3% (w/w), 2 doses of TA (0 or 100 mg TA/kg of feed) and 2 doses of Zn (0 or 200 mg/kg, added as zinc oxide).

Samples

Oils were taken immediately after the thermal treatment and Peroxide Value and *p*-Anisidine Value were determined within the following 6 h. Also, oil samples were stored in glass vials closed with Teflon caps, filled with N₂, and frozen at -25 °C until the rest of analysis were performed.

Feed samples were taken at the end of the feeding trial. Feeds were ground and vacuum packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; permeability to O₂ 25 cm³ × m⁻² × day⁻¹ × bar⁻¹ at 23 °C and 0% RH, ASTM D-3985; Cryovac Europe, Sealed Air S. L., Sant Boi de Llobregat, Spain; approximately 15 g feed/bag) and stored at -25 °C until analysis. Feed analysis were performed in triplicate.

Two hundred and eighty eight rabbits (cross of New Zealand and Californian rabbit) were weaned at 28 days, they were randomly divided into forty eight groups (twelve dietary treatments, four replicates, 6 rabbits per cage) and fed *ad libitum* with the corresponding experimental diet. At 63 days of age, rabbits were electrically stunned and killed by cutting carotids and jugulars. From four rabbits in each group, 20 mL of blood per animal was collected in heparinized tubes and immediately centrifuged at 1450 g at 4 °C for 10 min. Plasma samples from each group were mixed and transferred into microtubes and stored at -80 °C until analysis. Livers were immediately removed from carcasses and refrigerated for 5 h. Then, the six livers from each group were mixed, ground and vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; approximately 15 g liver/bag) and stored at -80 °C until analysis. Carcasses were refrigerated for 24 h at 4 °C. One leg was taken from each animal of each group and was hand deboned. Meat from the six legs was mixed, ground and divided into two parts: raw and cooked meat. Raw meat samples were vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; approximately 20 g meat/bag) and stored at -25 °C until analysis. Cooked meat samples were prepared by vacuum packing in high-barrier multilayer bags (Cryovac CN330; permeability to O₂ 15 cm³ × m⁻² × day⁻¹ × bar⁻¹ at 23 °C and 0% RH, ASTM D-3985; approximately 5 mm of meat thickness and 20 g meat/bag) and cooking in a water bath at 78 °C for 5 min. Then cooked meat samples were stored at -25 °C until analysis.

Reagents and standards

Reagents and standards were used as those described in Tres et al. (19).

Analysis of oils

Fatty acid composition of oils was determined by gas chromatography. Fatty acid methyl esters were prepared as described by Guardiola et al. (20) and quantified by means of experimental calibration curves using heneicosanoic acid (C21:0) as internal standard, as described in Tres et al. (19). The α T content of oils was determined after a saponification by HPLC-fluorescence detection (21).

Oxidation of oils was assessed by means of the peroxide value (DGF Method C-VI 6a (22), the ferrous oxidation-xylene orange (FOX) value (23), the *p*-Anisidine value (AOCS Official Method Cd 18-90 (24)) and the polymer content [DGF Method C-III 3d (<3%) (25), IUPAC 2508 (>3%) (26)] (Table 1).

Fatty acid composition of plasma, liver and meat

The FA composition of feed, liver and meat was determined by gas chromatography, as described in Tres et al. (19). Plasma FA composition was also determined by gas chromatography, but the fat extraction procedure used was described in Tres et al. (27). Fatty acid methyl esters were quantified by experimental calibration curves using 25 FA methyl esters as standards and heneicosanoic acid methyl ester (C21:0) as internal standard, as described in Tres et al. (19).

Determination of Zn, Cu, Fe and Se content of meat

The content of Zn, Cu, Fe and Se was determined in raw meat, as described in Bou et al. (28).

Statistics

One-way ANOVA was used to determine whether there were any differences in FA composition, α T content and the oxidation parameters assessed in the oils added to feeds, as a result of heating conditions (n=18). Multifactor ANOVA (n=36) was used to determine whether there were any significant differences in FA composition and α T content between the different feeds due to the addition of oxidized oils, TA and Zn to them. Multifactor ANOVA was used to determine whether there were any significant differences in the FA composition of plasma (n=48), liver (n=48), raw meat (n=48) and cooked meat (n=48) due to the studied dietary factors (levels of oxidation of oil added to feeds, and TA and Zn supplementation). Multifactor ANOVA was used to determine whether there were any significant differences in Zn, Cu, Fe and Se content of raw meat (n=48) due to the addition of oils, TA or Zn to feeds. Multifactor ANOVA was used to determine significant differences in the FA composition meat due to the effect of cooking (n=96). Interactions among more than two factors were ignored. In all cases, least-squares means for the main factors that had a significant effect were separated by the Scheffe's test, considering $\alpha \leq 0.05$ as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Oils and feeds

Thermal treatment of oils altered their oxidation, FA composition and α T content (Table 1). Heating SO at 55 °C, 245 h (PSO) led to an increase in its primary oxidation compounds as it was reflected in both peroxide and LHP value, while secondary oxidation compounds remained at the level found in FSO. However, heating SO at 140 °C for 31 h increased the *p*-Anisidine value and the polymer content, and reduced both peroxide and LHP values due to the high insatibility of primary oxidation compounds at high temperatures and their decomposition into secondary oxidation compounds (3).

The content of α T in PSO oil was significantly reduced as a result of the thermal treatment (Table 1). Oils were directly added to feeds (3%, w/w). This led to PSO feeds with a slightly lower α T content than FSO or OSO feeds (Table 3).

Heating conditions affected the FA composition of OSO oil reducing its content of C18:3n-3 and C18:2n-6 (Table 1). However due to the dilution effect of the addition of a 3% (w/w) of oil to feeds no differences were found in the content of these FA in feeds, although C18:2n-6 maintained the same tendency (Table 3). The content of C18:3n-3 was more affected by the composition of other feed ingredients thus attenuating the differences on its content in feeds due to the addition of heated oils.

The content of *c9,t12-18:2*, *c9,t11-CLA* and *ditrans* CLA (mixture of *ditrans* CLA isomers) increased in OSO oil with respect to FSO oil, but the content of *t10,c12-CLA* was not significantly modified (Table 1). Increases in *trans* FA as a result of heating have been reported (21, 29, 30). Geometric isomerization of linoleic acid (*c9,t12-18:2* and *t9,c12-18:2*) increased with temperatures above 180 °C (after ten heating cycles at 180 °C, each cycle was carried out for 30 min after oil had reached ambient temperature) (29). Also, positional isomerization was encountered above 180 °C (21, 29, 30), and it increased with temperature (180 °C, 200 °C or 220 °C), heating time (24-240 h), presence of oxygen (30) and when polar compounds were over 30% (w/w) (29), being *ditrans* isomers the main CLA formed, although also *monotrans* CLA were formed (29, 30). After heating refined SO for ten cycles of 30 min each at 180 °C, Juaneda et al. (29) found that *ditrans* CLA (as *t9,t11-CLA* and *t10,t12-CLA*) were the main CLA isomers (48.5%), followed by *c9,t11-CLA* (14.6%) and *t10,c12-CLA* (11.9%), but the percentage of *t10,c12-CLA* was almost not modified with respect to fresh SO.

Although the heating temperature applied to our OSO oil was milder than in those studies, and also our heating time was shorter in comparison to some studies, it led to a significant isomerization of linoleic acid. *Ditrans* CLA showed the highest increase (Table 1). But it should be taken into account that our FSO had not been refined. Increases in *trans* FA content of oils (*c9,t12-18:2*, *t9,c12-18:2*, *t11-18:1*) have been

encountered after refining, mainly depending on the temperature used in the deodorization step (29). Although the content in *trans* FA increased significantly when oil was heated at 140 °C for 31 h, it was much lower than when refined SO was heated above 180 °C (21, 29). For instance, our FSO had 0.13 g *ditrans* CLA/kg, that increased to 0.64 g/kg in OSO oil (Table 1), which was similar to the amount found in refined FSO (0.6 g *ditrans* CLA/kg), that after heating at 190-195 °C for 28 h increased to 1.4 g/kg (21).

These effects of heating conditions on *trans* FA composition of oils, were partially reflected in feed FA composition (Table 3). The contents of *c9,t12-18:2* and *ditrans* CLA were higher in OSO feeds with respect to FSO and PSO feeds, as it was found in the corresponding oils. But although the content of *c9,t11-CLA* was higher in OSO oil, it did not significantly differ between feeds, fact that might be due to the dilution effect of adding only a 3% (w/w) of oil to feeds, which affected more this *trans* FA that was in very low amounts in OSO oil.

Fatty acid composition of plasma, liver and raw meat

Rabbit plasma, liver and meat FA composition (Table 4) reflected the FA composition of feeds (Table 3). As the content of C18:2n-6 and C18:3n-3 was similar among the feeds containing FSO, PSO or OSO oil, the content of these FA in plasma, liver and meat was not modified by the addition of heated oils to feeds, according to results in chicken meat (31). However, in studies in which the heating conditions led to a more pronounced decrease on the content of C18:2n-6 and C18:3n-3, and moreover higher amounts of oils were added to feeds, the FA composition of meat presented a reduction on the content of these FA (4, 18).

The addition of heated oils to feeds only affected significantly the content of *ditrans* CLA in liver and of *t9,c12-18:2* in meat, while the rest of *trans* FA in plasma, liver and meat followed the same tendency encountered in oils and feeds (Tables 1, 3 and 4). Thus, the different amount of primary and secondary oxidation products in oils added to

feeds did not alter FA composition of plasma, liver and meat (Table 4), although some studies showed that some oxidation products could be absorbed in the gastrointestinal tract (12, 32, 33) and alter tissue stability (31, 34). Also digestibility could be reduced if the polymeric fraction of dietary fat was high (9), but although in our study it increased in OSO oil, it did not reach extreme levels (Table 1).

Ditrans CLA content in chicken meat has been reported to be a good marker of the addition of heated SO at high temperatures to feeds (6%, w/w) (21) because *ditrans* CLA are formed mainly during heating fats at high temperatures, while other *trans* FA are formed preferentially during biohydrogenation, fat hydrogenation and refining (29, 30, 35). However in that study, the content of *ditrans* CLA in meat (plus skin) was higher than in our rabbit meat because oil was added at a higher amount to feeds (6%, w/w), a higher temperature was used to oxidize refined SO (190-195 °C for 28 h) and, chicken meat (plus skin) had a higher fat content (18, 21).

The different CLA isomers quantified in our study did not show a substantial preference for being accumulated in plasma, liver or meat. The content of *c9,t11*-CLA and *ditrans* CLA isomers with respect to tissue fat content were similar in liver than in meat. Only *t10,c12*-CLA showed a subtle tendency to be less accumulated in liver than in meat (Table 4).

Among the different CLA isomers quantified, *c9,t11*-CLA was more incorporated into liver and meat than *ditrans* CLA and *t10,c12*-CLA, although *ditrans* CLA isomers were more abundant in feeds than *monotrans* CLA. This is according with results reported in other animal species (18, 36, 37). In turn, the incorporation of *ditrans* CLA isomers in liver and meat seemed to be slightly higher than that of *t10,c12*-CLA. In rat liver, Yang et al. (38) reported a preferential incorporation of *ditrans* CLA isomers whereas for the incorporation of *monotrans* CLA isomers there was a partial discrimination.

But the content of the different CLA isomers in rabbit tissues could not be attributed only to a direct incorporation from diet. In fact, *c9,t11*-CLA in tissues can be synthesized

from *t*11-18:1 by Δ 9-desaturase (39-42). Furthermore, this is the main CLA isomer formed during rumen partial biohydrogenation (40, 43), but it could be also synthesized by bacteria in the large intestine and then absorbed through cecotrophy (40, 41, 44). In fact, Gomez-Conde et al. (45) detected *c*9,*t*11-CLA in rabbit faeces, being its content higher in soft than in hard faeces.

On the other hand, the content of the different CLA isomers in tissues could not only be related to a preferential uptake, absorption or deposition, but also to other mechanisms as metabolism. It has been described that *monotrans* CLA isomers could be elongated and desaturated to long-chain metabolites (46), which would also be involved in some of the biological effects attributed to CLA (47). Also the content of *t*10,*c*12-CLA could be reduced in favor of its higher β -oxidation than *c*9,*t*11-CLA (48).

Regarding the non-conjugated isomers of linoleic acid, only *ditrans* 18:2 and *9c,12t*-18:2 were detected in feeds (Table 3), but in plasma, liver and meat *t*9,*c*12-18:2 was also encountered (Table 4). This FA has been reported to be a product of a minor pathway during FA metabolism by rumenic bacteria (49). Thus, it could also be formed by intestinal bacteria and then absorbed by rabbits through cecotrophy (44), which could explain the occurrence of this *trans* FA in plasma and tissues but not in feeds.

In liver and meat, *9c,12t*-18:2 was similarly incorporated as linoleic acid, while *ditrans*-18:2 was more incorporated (Table 4). These results are according with the incorporation of these isomers in chicken meat, and might be related to the higher metabolism of 18:2 isomers with a *cis* instead of a *trans* double bond in 9 position (21). Moreover, *ditrans*-18:2 showed a preference to be accumulated in liver than in meat. In fact, in order to maintain the fluidity of its membranes muscle tissue has a lower content of SFA and is richer in MUFA. Thus, similarly to SFA, the uptake of *ditrans*-18:2 might be lower in muscle than in liver.

On the other hand, while the proportion of linoleic acid in liver and meat was similar, the content of linolenic acid in liver was lower than in meat, according to previously

reported results (27). This was attributed to preference of liver to accumulate linoleic acid, or to a higher use of linolenic acid for β -oxidation or for biosynthesis of long-chain PUFA.

Dietary supplementation with 100 mg of TA/kg of feed did not modify the content of any of the quantified FA in plasma, liver or meat (Table 4). Either Haak et al. (50) did not find differences in pork meat FA composition due to TA supplementation when feeds contained 2% (w/w) heated linseed oil (at 50 °C for 4 days with aeration and addition of CuSO₄). However, in other studies increases on liver and meat PUFA content due to supplementation with TA in feeds have been reported (18, 19, 51-53), which were related to a protection effect of α T against FA oxidation and to an enhancement of biosynthesis of long-chain PUFA.

The dietary supplementation with Zn did not led to differences in the liver FA content (Table 4), but in plasma a significant increase in the content of C20:5n-3 and total PUFA was observed (Table 4), and although it was not significant the same tendency could be observed in other FA.

In meat, the addition of 200 mg of Zn/kg of feed affected its FA composition in a different way depending on the type of oxidized oil added to feeds (Table 5). The dietary supplementation with Zn increased the content of some FA (C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C16:1n-9, C18:2n-6, C18:3n-3 or *t*9,*t*12-18:2, among others) in OSO meats, but decreased their content in PSO meats. Although these differences were statistically significant, the variations in the content of those FA were slight. The same interaction was also found for *trans*-18:1 in chicken meat after Zn supplementation in diets containing heated oils (21).

Our study does not allow us to determine the mechanisms by which oxidized oils and Zn supplementation produce these effects on meat FA content. In fact, little research has been done until now focusing on animal feeding with heated oils, or on dietary supplementation with Zn, and even less on the effects of the addition of both dietary

factors. Some hypothesis could be raised for the mechanisms involved in this interaction including alterations of the digestion process, fat absorption, distribution, deposition or metabolism. In fact, several of those or other mechanisms could occur simultaneously. Zinc interacts with several proteins, regulates several biological functions, and has a well regulated homeostasis (54). As meat Zn content was not modified by dietary Zn supplementation or by the addition of heated oils to feeds, it rules out that the effects on FA content were due to some direct effect of Zn in the FA metabolism (Table 6). Thus, the origin of this interaction could be in the gastrointestinal tract, during fat digestion and absorption, where Zn and/or oxidation compounds in diet could alter the activity of some enzymes, the enterocyte function, the formation of micelles and the transformations suffered by oxidation compounds in the gastrointestinal tract. Conversely, plasma FA composition was not evidently affected by both dietary factors (data not shown). As the origin of this effect of Zn supplementation is unknown, and multiple mechanisms could be involved, further studies are needed to determine how these dietary factors interact.

Content of Zn, Cu, Fe and Se of raw meat

Raw meat content of Zn, Cu, Fe and Se was not affected by type of oxidized oil added to feeds or by TA supplementation (Table 6). Similar results were found in studies with chickens (18, 55).

The dietary supplementation with 200 mg Zn/kg did not modify the content of Zn, Fe and Se of raw rabbit meat (Table 6). A balance between absorption and excretion of Zn maintains Zn homeostasis (14). Also cellular Zn is regulated by many proteins (16). In humans, Zn supplementation has led to controversial results on reestablishing Zn content, and on the incidence and severity of some diseases depending on the Zn status of the individuals (16, 56).

The content of Cu in meat was reduced by the dietary supplementation with 200 mg Zn/kg (Table 6). Reductions on the Cu status have been described in rats and humans

as a result of diets with moderate or high doses of Zn and normal or marginal Cu doses (14, 16, 57, 58). Zn supplementation has also led to alterations of the activity of Cu-dependent enzymes as ceruloplasmine or Cu-Zn superoxide dismutase (14, 58, 59). In fact, this effect has been used as a treatment for Wilson's disease, a disorder of copper metabolism that results into copper toxicity (16, 57). This effect of dietary Zn on copper status has been attributed to an induction of metallothionein by Zn in the intestinal cells, which might retain copper within the enterocytes (57). However, the effect of Zn on Cu status might also be related to other mechanisms (57), for instance, to an alteration of the expression or the activities of copper transport proteins in the enterocytes (60).

In chicken meat, neither the Zn nor the Cu content was modified by supplementing feeds with 200 or 600 mg Zn/kg, but it led to a higher content of Se in meat, which could be attributed to an alteration of the metabolism of metallothioneins and selenoproteins by the increase in dietary Zn (17, 18). This effect of Zn supplementation on Se content was not observed in our study with rabbits maybe due to the lower doses of Zn added to our feeds (200 mg/kg). Also, differences between species should also be taken into account, because it seems that some proteins, for instance glutathione peroxidase, that depend on Se in other species (as chickens and humans) do not depend on Se in rabbit (61). In our study, Se was added to the basal diet as sodium selenite (0.1 mg/kg). Increases in Se content in rabbit tissues have been achieved by dietary supplementation with higher doses of Se (0.5 mg/kg, added as Se-enriched yeast), compared with basal diets containing 0.1 mg of Se/kg, but the activity of glutathione peroxidase was not modified (62). Further studies are needed to determine the different Se forms present in rabbit, and how they are absorbed, metabolized and affected by dietary factors, for instance by the different Se forms.

Effect of cooking on meat fatty acid composition

Cooking vacuum-packed raw rabbit meat in a water bath at 78 °C for 5 min, altered meat FA composition (Table 7). Cooking led to a loss in the content of some PUFA

because they are more prone to oxidation than other FA, as it has been reported in other studies (19, 51-53). Although it was significant, the reductions on the amount of each FA were not as pronounced as in other studies in which meat presented a more unsaturated FA profile, and was cooked at higher temperature or for a longer time (19, 51).

Apart from meat composition, also time and temperature conditions during cooking determine the extent of PUFA losses in meat. For instance, Dal Bosco et al. (52) when boiled vacuum-packed rabbit meat at higher temperature and time than us found higher decreases in n-3 PUFA content. On the contrary, to what was found in some studies using more unsaturated fat sources in feeds, in our case the supplementation with TA (100 mg/kg) did not prevent the loss of PUFA during cooking, (51, 52). However, the loss of PUFA in our meats was slight, which could be related to the mild temperature and short heating time applied (Table 7).

Therefore, as the changes in FA composition after cooking were minimal in our study, the FA content of cooked meat was affected similarly as in raw meat. No differences were encountered in meat FA composition as a result of TA supplementation. The interaction between the type of oxidized oil added to feeds and Zn supplementation was significant in C10:0, C12:0 and C18:0, although in the rest of FA the same tendency as in raw meat was observed (19, 51-53).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and by a research grant from Instituto Danone to A. Tres.

The authors thank “Frit Ravich” and “Laboratorios Salvat” for allowing us to use their facilities for oxidizing the experimental oils. The authors would like to thank the

Department of Animal Science of the Polytechnic University of Valencia for the housing of animals and slaughtering facilities, and E. Carmona for her help in the analyses.

REFERENCES

1. Wood, J.D.; Enser, M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br. J. Nutr.* **1997**, *78*, S49-S60.
2. Food and Nutrition Board *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids (macronutrients)*. The National Academies Press: Washington, DC, 2005.
3. Frankel, E.N. *Lipid oxidation*, The Oily Press LTD: Dundee, UK, 1998.
4. Sheehy, P.J.A.; Morrissey, P.A.; Flynn, A. Influence of heated vegetable oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on alpha-tocopherol, fatty acids and lipid peroxidation in chicken muscle. *Br. Poult. Sci.* **1993**, *34*, 367-381.
5. Engberg, R.M.; Lauridsen, C.; Jensen, S.K.; Jakobsen, K. Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets: Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. *Poult. Sci.* **1996**, *75*, 1003-1011.
6. Billek, G. Health aspects of thermoxidized oils and fats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 587-593.
7. Marquez-Ruiz, G.; Dobarganes, M.C. Nutritional and physiological effects of used frying fats, In *Deep Frying: Chemistry, Nutrition and Practical Applications*, Perkins, E.G.; Erickson, M.D., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL., 1996.
8. Combe, N.; Clouet, P.; Chardigny, J.-.; Lagarde, M.; Léger, C.L. Trans fatty acids, conjugated linoleic acids, and cardiovascular diseases. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 945-953.

9. Marquez-Ruiz, G.; Garcia-Martinez, M.C.; Holgado, F. Changes and effects of dietary oxidized lipids in the gastrointestinal tract. *Lipids Insights* **2008**, *2*, 11-19.
10. Guardiola, F.; Dutta, P.C.; Codony, R.; Savage, G.P. *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*. AOCS Press: Champaign, IL, 2002.
11. Spitteller, G. Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biol. Med.* **2006**, *41*, 362-387.
12. Kanazawa, K.; Ashida, H. Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1393*, 349-361.
13. Gray, J.I.; Gomaa, E.A.; Buckley, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci.* **1996**, *43*, S111-S123.
14. Food and Nutrition Board *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*, The National Academies Press: Washington, DC, 2000.
15. Food and Nutrition Board *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. The National Academies Press: Washington, DC, 2000.
16. Maret, W.; Sandstead, H.H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2006**, *20*, 3-18.
17. Bou, R.; Guardiola, F.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effect of dietary fat sources and zinc and selenium supplements on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1129-1140.

-
18. Bou, R.; Codony, R.; Baucells, M.D.; Guardiola, F. Effect of heated sunflower oil and dietary supplements on the composition, oxidative stability, and sensory quality of dark chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7792-7801.
19. Tres, A.; Bou, R.; Codony, C.; Guardiola, F. Influence of different dietary doses of n-3- or n-6-rich vegetable fats and alpha-tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7243-7253.
20. Guardiola, F.; Codony, R.; Rafecas, M.; Boatella, J.; Lopez, A. Fatty acid composition and nutritional value of fresh eggs, from large- and small-scale farms. *J. Food Compos. Anal.* **1994**, *7*, 171-188.
21. Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Baucells, M.D.; Guardiola, F. Increase of geometrical and positional fatty acid isomers in dark meat from broilers fed heated oils. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1942-1954.
22. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) DGF method C-VI 6a. **2002**
23. Navas, J.A.; Tres, A.; Codony, R.; Boatella, J.; Bou, R.; Guardiola, F. Modified ferrous oxidation-xylenol orange method to determine lipid hydroperoxides in fried snacks. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 688-696.
24. AOCS *Official methods and recommended practices of the American Oils Chemists Society*, AOCS Press: Champaign, IL, 1998-2008.
25. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) DGF Method C-III 3d. **2000**
26. IUPAC Standard method 2508, In *IUPAC Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. 1st supplement to the 7th Ed. ed.; Anonymous ; Blackwell Science: Oxford, UK, 1992.

27. Tres, A.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and antioxidants: effects on fatty acid composition and stability of plasma, liver and meat. *Animal under review*
28. Bou, R.; Guardiola, F.; Padró, A.; Pelfort, E.; Codony, R. Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 1361-1369.
29. Juanéda, P.; Brac De la Périère, S.; Sébédio, J.L.; Grégoire, S. Influence of Heat and Refining on Formation of CLA Isomers in Sunflower Oil. *JAOCs J Am Oil Chem Soc* **2003**, *80*, 937-940.
30. Destailats, F.; Angers, P. Thermally induced formation of conjugated isomers of linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 167-172.
31. Sheehy, P.J.A.; Morrissey, P.A.; Flynn, A. Consumption of thermally-oxidized sunflower oil by chicks reduces alpha-tocopherol status and increases susceptibility of tissues to lipid oxidation. *Br. J. Nutr.* **1994**, *71*, 53-65.
32. Suomela, J.P.; Ahotupa, M.; Kallio, H. Triacylglycerol oxidation in pig lipoproteins after a diet rich in oxidized sunflower seed oil. *Lipids* **2005**, *40*, 437-444.
33. Staprans, I.; Rapp, J.H.; Pan, X.M.; Feingold, K.R. Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *Journal of Lipid Research* **1996**, *37*, 420-430.
34. Galvin, K.; Morrissey, P.A.; Buckley, D.J.; Frigg, M. Influence of oil quality and alpha-tocopheryl acetate supplementation on alpha-tocopherol and lipid oxidation in chicken tissues. **1993**, *Proceedings of the 11th European Symposium on the Quality of the Poultry Meat*, 423-429.
35. Ledoux, M.; Juanéda, P.; Sébédio, J.L. Trans fatty acids: Definition and occurrence in foods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 891-900.

36. Kramer, J.K.G.; Sehat, N.; Dugan, M.E.R.; Mossoba, M.M.; Yurawecz, M.P.; Roach, J.A.G.; Eulitz, K.; Aalhus, J.L.; Schaefer, A.L.; Ku, Y. Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* **1998**, *33*, 549-558.
37. Ostrowska, E.; Cross, R.F.; Muralitharan, M.; Bauman, D.E.; Dunshea, F.R. Dietary conjugated linoleic acid differentially alters fatty acid composition and increases conjugated linoleic acid content in porcine adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **2003**, *90*, 915-928.
38. Yang, L.; Yeung, S.Y.V.; Huang, Y.; Wang, H.Q.; Chen, Z.Y. Preferential incorporation of trans, trans-conjugated linoleic acid isomers into the liver of suckling rats. *Br. J. Nutr.* **2002**, *87*, 253-260.
39. Griinari, J.M.; Corl, B.A.; Lacy, S.H.; Chouinard, P.Y.; Nurmela, K.V.V.; Bauman, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2285-2291.
40. Palmquist, D.L.; Lock, A.L.; Shingfield, K.J.; Bauman, D.E. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. *Adv. Food Nutr. Res.* **2005**, *50*, 179-217.
41. Lo Fiego, D.P.; Macchioni, P.; Santoro, P.; Rossi, R.; Pastorelli, G.; Corino, C. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on intramuscular fatty acid composition in rabbit. *Ital.J.Anim.Sci.* **2005**, *4*, 553-555.
42. Corino, C.; Lo Fiego, D.P.; Macchioni, P.; Pastorelli, G.; Di Giancamillo, A.; Domeneghini, C.; Rossi, R. Influence of dietary conjugated linoleic acids and vitamin E on meat quality, and adipose tissue in rabbits. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 19-28.
43. Griinari, J.M.; Bauman, D.E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk ruminants, In *Advances in conjugated linoleic acid research*, Yurawecz, M.P.; Mossoba, M.M.; Kramer, J.K.G.; Pariza, M.W.; Nelson, G.J., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL, 1999; Vol.1, pp. 180-200.

44. Chin, S.F.; Storkson, J.M.; Liu, W.; Albright, K.J.; Pariza, M.W. Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 694-701.
45. Gómez-Conde, M.S.; Menoyo, D.; Chamorro, S.; Lopez-Bote, C.J.; García-Rebollar, P.; De Blas, J.C. Conjugated linoleic acid content in cecotrophes, suprarenal and intramuscular fat in rabbits fed commercial diets. *World Rabbit Sci.* **2006**, *14*, 95-99.
46. Banni, S. Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr.Opin.Lipidology* **2002**, *13*, 261-266.
47. Evans, M.E.; Brown, J.M.; McIntosh, M.K. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 508-516.
48. Martin, J.C.; Grégoire, S.; Siess, M.H.; Genty, M.; Chardigny, J.M.; Berdeaux, O.; Juanéda, P.; Sébédio, J.L. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids* **2000**, *35*, 91-98.
49. Shingfield, K.J.; Ahvenjärvi, S.; Toivonen, V.; Vanhatalo, A.; Huhtanen, P.; Griinari, J.M. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 971-983.
50. Haak, L.; Raes, K.; Van Dyck, S.; De Smet, S. Effect of dietary rosemary and α -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 239-247.
51. Castellini, C.; Dal Bosco, A.; Bernardini, M.; Cyril, H.W. Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability of raw and cooked rabbit meat. *Meat Sci.* **1998**, *50*, 153-161.
52. Dal Bosco, A.; Castellini, C.; Bernardini, M. Nutritional quality of rabbit meat as affected by cooking procedure and dietary vitamin E. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 1047-1051.
53. Bou, R.; Grimpa, S.; Guardiola, F.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effects of various fat sources, alpha-tocopheryl acetate and ascorbic acid supplements on fatty acid composition and alpha-

tocopherol content in raw and vacuum-packed, cooked dark chicken meat. *Poult. Sci.* **2006**, *85*, 1472-1481.

54. Maret, W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: Redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals* **2009**, *22*, 149-157.

55. Bou, R.; Guardiola, F.; Tres, A.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effect of dietary fish oil, alpha-tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 282-292.

56. Haase, H.; Overbeck, S.; Rink, L. Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: Current status and future perspectives. *Exp. Gerontol.* **2008**, *43*, 394-408.

57. Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Grider, A.; Nostrant, T.; Cousins, R.J.; Brewer, G.J. Treatment of Wilson's disease with zinc: X. Intestinal metallothionein induction. *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *120*, 380-386.

58. Sundaresan, P.R.; Kaup, S.M.; Wiesenfeld, P.W.; Chirtel, S.J.; Hight, S.C.; Rader, J.I. Interactions in indices of vitamin A, zinc and copper status when these nutrients are fed to rats at adequate and increased levels. *Br. J. Nutr.* **1996**, *75*, 915-928.

59. L'Abbe, M.R.; Fischer, P.W.F. The effects of high dietary zinc and copper deficiency on the activity of copper-requiring metalloenzymes in the growing rat. *J. Nutr.* **1984**, *114*, 813-822.

60. Reeves, P.G.; Briske-Anderson, M.; Johnson, L. Physiologic concentrations of zinc affect the kinetics of copper uptake and transport in the human intestinal cell model, Caco-2. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1794-1801.

61. De Blas, C.; Wiseman, J. *The nutrition of the rabbit*, CABI Publishing: Cambridge, MA, 1998;

62. Dokoupilová, A.; Marounek, M.; Skřivanová, V.; Březina, P. Selenium content in tissues and meat quality in rabbits fed selenium yeast. *Czech J. Anim. Sci.* **2007**, *52*, 165-169.

Table 1. Assessment of oxidation, α -tocopherol content (mg α -tocopherol/kg) and fatty acid composition (g of fatty acid/kg) of oils after heating three aliquots of the same unrefined sunflower oil under different conditions of time and temperature¹.

	FSO	PSO	OSO
Thermal treatment	No treatment	55°C, 245 h	140°C, 31 h
Assessment of oxidation			
Peroxide value	10.4 y	83.0 z	9.8 x
LHP value	10.5 y	89.0 z	5.84 x
<i>p</i> -Anisidine value	2.8 x	2.7 x	124.5 y
Polymer content	0.09 x	0.25 y	9.9 z
α -Tocopherol content	621.54 y	510.57 x	605.06 xy
FA composition ^a			
SFA ^a	110	108	106
MUFA ^a	188	189	184
C18:2n-6	630 y	620 y	580 x
C20:2n-6	0.43	0.34	0.36
C18:3n-3	1.50 y	1.50 y	1.33 x
<i>c</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	0.60 x	0.61 x	0.70 y
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	0.17 x	0.17 x	0.3 y
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA	0.16	0.17	0.23
<i>ditrans</i> CLA ^b	0.13 x	0.14 x	0.64 y
Total <i>trans</i> FA	1.06 x	1.08 x	1.87 y

Abbreviations: FSO, fresh sunflower oil; PSO, peroxidized sunflower oil; OSO, oxidized sunflower oil; FA, fatty acid; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; CLA, conjugated linoleic acid.

¹ Values correspond to least-square means obtained from ANOVA (n=18).

^a SFA: sum of C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0; MUFA, sum of C16:1n-9, C18:1n-9, C20:1n-9, C16:1n-7 and C18:1n-7.

^b *Ditran*-CLA, mixture of isomers.

x,y,z Values in the same row bearing no common letters are statistically different (P \leq 0.05). Letters were obtained by means of the Scheffé's test (α =0.05).

Table 2. Ingredients and composition of the basal diet.

Ingredient	Percentage
Beet pulp	28
Alfalfa	25
Sunflower meal	20
Wheat Bran	15
Soybean meal	6
Fat ^a	3
Dicalcium phosphate	1.2
Trace mineral-vitamin mix L-510 ^b	0.5
Sodium chloride	0.5
L-Lysine	0.3
Calcium carbonate	0.2
DL-Methionine	0.1
L-Threonine	0.1
Robenidine ^c	0.1
Sodium selenite ^d	
Calculated composition	
Dry matter	91.3
Crude protein ^e	19.4
Crude fat ^e	5.2
Crude fiber ^e	17.9
Energy (cal/g)	4423

^a The basal diet was supplemented with 3% (w/w) of fat. The type of fat added in each treatment depended on the experimental design.

^b Supplied the following per kilogram of feed: 290 mg of magnesium oxide; 330 mg of sodium; 275 mg of sulfur; 700 µg of cobalt carbonate monohydrate; 10 mg of copper sulfate pentahydrate; 76 mg of ferrous sulfate monohydrate; 20 mg of manganese oxide; 59.2 mg of zinc oxide; 1.25 mg of potassium iodide; 8375 IU of vitamin A; 750 IU of vitamin D3; 20 mg of α-tocopherol; 1 mg of vitamin B1; 2 mg of vitamin B2; 1 mg of vitamin B6; 1 mg of vitamin K; 20 mg of niacin; 250 mg of choline chloride; 4 mg of butylated hydroxyanisol + ethoxyquin; 2.5 mg of flavophospholipol (80 mg/kg) (Trouw Nutrition, Spain).

^c Robenidine was not included in feeds given to the rabbits during their last week of life.

^d Sodium selenite was added at 0.1 mg/kg of feed.

^e Crude protein, crude fat and crude fiber expressed as percentage of dry matter.

Table 3. Fatty acid composition and α -tocopherol content of feeds depending on the oxidation of the oil added to feeds (3%, w/w), and on the supplementation with α -tocopheryl acetate (0 or 100 mg/kg) and Zn (0 or 200 mg/kg; added as zinc oxide).

	Added oil			TA		Zn	
	FSO	PSO	OSO	0	100	0	200
FA composition ^a							
C12:0	3.5	3.8	3.7	3.8	3.6	3.5	3.8
C14:0	5.5	5.3	5.3	5.6 b	5.1 a	5.4	5.3
C15:0	2.75	2.36	2.32	2.78	2.18	2.26	2.70
C16:0	300	295	296	310	287	296	299
C17:0	3.1	2.9	2.9	3.1	2.9	3.0	3.0
C18:0	117	116	116	120	112	115	117
C20:0	9.3	9.3	9.6	9.8	9.1	9.3	9.6
C22:0	23	23	24	24	22	23	24
C24:0	13.0	13.2	13.9	13.6	13.1	13.1	13.6
SFA	480	470	470	490	460	470	480
C16:1n-9	0.76	0.72	0.70	0.76	0.70	0.72	0.74
C18:1n-9	550	540	540	560	530	540	550
C20:1n-9	8.6	8.7	8.6	8.9	8.4	8.5	8.8
C24:1n-9	1.26	1.28	1.34	1.31	1.28	1.27	1.32
C16:1n-7	3.6	3.5	3.5	3.7	3.4	3.5	3.5
C18:1n-7	24	24	23	24	23	23	24
MUFA	590	580	580	600	560	580	590
C18:2n-6	1800	1800	1700	1800	1700	1800	1800
C20:2n-6	2.15	2.57	1.91	2.35	2.07	2.04	2.38
C20:4n-6	2.74	2.74	3.77	3.41	2.75	3.30	2.86
n-6 PUFA ^b	1800	1800	1700	1800	1700	1800	1800
C18:3n-3	89	90	88	93	85	89	89
C20:3n-3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C20:5n-3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
n-3 PUFA ^b	91	92	90	95	87	91	91
Total PUFA	1900	1900	1800	1900	1800	1900	1900
t9,t12-18:2	0.98	0.54	1.15	0.84	0.95	0.70	1.08
c9,t12-18:2	2.17 x	2.16 x	2.53y	2.35	2.23	2.24	2.33
Total <i>trans</i> 18:2	3.2 xy	2.7 x	3.7 y	3.2	3.2	2.9	3.4
c9,t11-CLA	0.75	0.73	0.72	0.76	0.71	0.73	0.74
10t,12c-CLA	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
<i>ditrans</i> CLA ^c	1.16 x	1.39 x	2.15y	1.62	1.50	1.55	1.58
Total CLA	1.96 x	2.32 x	3.24 y	2.54	2.48	2.44	2.58
<i>trans</i> 18:1	1.96	1.26	1.64	1.83	1.41	1.81 y	1.43 x
Total <i>trans</i> FA	7.1 x	6.3 x	8.6 y	7.6	7.1	7.2	7.4
α -tocopherol content ^a	74.5 xy	67.6 x	77.4 y	33.7 x	112.6 y	75.0	71.3

Abbreviations: FSO, fresh sunflower oil; PSO, peroxidized sunflower oil; OSO, oxidized sunflower oil; TA, α -tocopheryl acetate; FA, fatty acids; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; CLA, conjugated linoleic acid; tr, traces.

^a Fatty acid composition expressed as mg FA/100 g feed; α -tocopherol content expressed as mg α -tocopherol/kg feed. Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=36).

^b 18:3n-6; 20:3n-6; 22:4n-6, 22:5n-6, 18:4n-3; 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3 and t9, c12-18:2 were not detected in feeds.

^c *Ditrans*-CLA: mixture of isomers.

x,y Values in the same row for a certain factor bearing no common letters are statistically different ($P \leq 0.05$). Letters were obtained by means of the Scheffé's test ($\alpha = 0.05$).

Table 4. Fatty acid composition of rabbit plasma, liver and raw meat depending on the level of oxidation of the sunflower oil added to feeds, and on the supplementation with α -tocopheryl acetate (0 or 100 mg/kg of feed) and Zn (0 or 200 mg/kg of feed)¹.

	Plasma ^a								Liver ^a								Meat ^a							
	Added oil			TA		Zn			Added oil			TA		Zn			Added oil			TA		Zn		
	FSO	PSO	OSO	0	100	0	200	FSO	PSO	OSO	0	100	0	200	FSO	PSO	OSO	0	100	0	200			
C12:0 ^{bc}	10.1	10.8	10.6	10.6	10.4	10.6	10.4	1.36	1.09	1.28	1.25	1.23	1.26	1.22	5.9	5.8	5.7	6.1	5.5	5.9	5.7			
C14:0 ^c	22.1	23.3	24.4	23.7	22.9	23.2	23.4	13.0	10.9	12.4	11.8	12.4	12.3	11.9	39	42	39	40	40	40	39			
C15:0 ^c	10.2	9.0	11.7	11.6	9.0	10.8	9.8	10.5	9.4	9.8	9.8	9.9	9.8	10.0	12.8	13.5	12.6	13.0	12.9	13.1	12.9			
iso-16:0 ^c	13.9	14.0	14.2	14.1	14.0	14.1	14.0	1.47	1.43	1.46	1.40	1.51	1.45	1.46	3.2	3.3	3.1	3.2	3.2	3.2	3.2			
C16:0 ^c	276	257	284	290	255	264	281	520	480	500	500	500	500	500	520	550	520	530	530	530	520			
C17:0 ^c	13.0	12.8	13.5	13.8	12.4	13.1	13.1	29.2	28.5	28.4	29.1	28.3	28.9	28.5	15.6	16.4	15.6	16.0	15.7	16.0	15.7			
C18:0 ^c	155	148	158	162	146	151	156	590	570	550	580	560	570	570	187	198	187	191	190	191	190			
C20:0 ^c	1.74	1.77	2.12	1.94	1.81	1.75	2.00	0.26	0.36	0.32	0.30	0.33	0.30	0.32	0.83	0.98	0.93	0.90	0.93	0.97	0.86			
C22:0 ^c	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1.92	1.98	2.09	1.92	2.08	1.95	2.04	1.45	1.53	1.53	1.48	1.52	1.53	1.48			
C24:0 ^c	2.80	2.59	2.82	2.81	2.66	2.79	2.68	2.78	2.80	2.84	2.77	2.85	2.84	2.78	1.12	1.14	1.19	1.14	1.16	1.16	1.14			
SFA ^c	520	480	530	530	490	490	520	1170	1110	1110	1140	1120	1130	1130	790	830	790	800	800	810	800			
C16:1n-9 ^c	6.3	6.0	6.8	6.7	6.0	6.0	6.7	6.2	5.5	5.9	5.7	6.0	5.7	6.0	7.3	7.6	7.3	7.4	7.4	7.5	7.4			
C18:1n-9 ^c	287	256	326	310	269	263	317	280	274	286	275	284	278	281	470	480	470	470	480	480	470			
C20:1n-9 ^c	3.5	3.8	4.3	4.0	3.8	3.7	4.1	7.9	8.8	8.5	8.0	8.8	8.5	8.3	5.8	6.0	5.8	5.8	5.9	5.9	5.8			
C24:1n-9	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1.74	1.66	1.69	1.70	1.70	1.71	1.68	0.71	0.82	0.82	0.79	0.78	0.83y	0.74x			
C16:1n-7	11.3	8.4	11.9	12.1	9.0	9.0	12.1	11.6	11.0	11.9	11.0	12.0	11.6	11.4	45	42	42	44	43	45	42			
C18:1n-7 ^c	10.7	9.2	12.5	11.8	9.8	9.5	12.1	24	23	24	23	24	23	24	25	26	25	25	25	26	25			
MUFA ^c	319	283	362	345	298	291	352	330	330	340	330	340	330	330	560	570	550	560	560	570	550			
C18:2n-6 ^c	510	480	560	540	490	490	550	1040	1000	990	1020	1000	1000	1020	980	1030	970	990	1000	1000	990			
C18:3n-6 ^c	1.87	1.58	1.84	1.90	1.63	1.63	1.89	2.51	2.25	2.12	2.37	2.22	2.26	2.33	2.03	2.10	1.94	2.01	2.04	2.03	2.02			
C20:2n-6	15.8	8.3	8.6	8.4	13.4	8.2	13.6	44	47	45	45	46	45	46	12.0	12.7	11.8	12.0	12.4	12.3	12.0			
C20:3n-6	5.4	5.4	5.4	5.6	5.2	5.4	5.5	28	29	38	28	35	35	28	6.55 x	6.95y	6.48x	6.58	6.74	6.67	6.65			
C20:4n-6	49	42	43	46	43	43	46	217	202	199	210	201	202	210	51 x	54 y	51 x	52	52	52	52			
C22:4n-6	5.4	5.2	5.0	5.3	5.1	5.2	5.2	35	34	32	34	34	34	34	18.2 x	19.0y	18.2x	18.3	18.6	18.4	18.5			
C22:5n-6	2.54	2.49	2.34	2.44	2.48	2.40	2.52	22 y	21 xy	19 x	21	20	20	21	6.5	6.8	6.6	6.6	6.7	6.6	6.7			
n-6 PUFA ^c	590	540	620	610	560	550	620	1390	1330	1330	1360	1340	1340	1360	1080	1140	1060	1090	1100	1100	1090			

C18:3n-3 ^c	14.5	12.2	27.1	15.5	20.4	12.7	23.2	17.0	16.5	16.5	17.0	16.4	16.4	16.9	46	51	48	49	48	49	48
C18:4n-3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.14	0.23	0.05	0.09	0.19	0.11	0.17	0.42	0.47	0.28	0.37	0.41	0.39	0.39
C20:3n-3 ^c	0.55	0.55	0.72	0.67	0.54	0.57	0.65	1.89	2.22	2.12	2.03	2.12	2.09	2.06	1.25	1.37	1.28	1.29	1.31	1.31	1.29
C20:5n-3	0.45	tr	0.44	0.33	0.31	0.13 x	0.51 y	0.90	0.74	0.72	0.82	0.76	0.78	0.79	0.80	0.89	0.81	0.87	0.79	0.82	0.85
C22:5n-3	1.64	1.39	1.66	1.62	1.51	1.37	1.76	6.48	6.23	6.12	6.44	6.12	6.20	6.43	5.5	5.8	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
C22:6n-3	2.39	2.63	2.18	2.19	2.61	2.43	2.37	3.43	3.15	2.99	3.25	3.12	3.05	3.32	1.82	1.98	1.86	1.89	1.88	1.83	1.95
n-3 PUFA ^c	19.0	15.4	31.8	19.8	24.4	16.2	28.0	30	29	29	30	29	29	30	56	62	58	59	58	59	58
Total PUFA ^c	610	530	660	630	570	550 x	650 y	1420	1360	1360	1390	1370	1370	1390	1140	1200	1120	1150	1150	1160	1150
<i>t</i> 9, <i>t</i> 12-18:2 ^c	0.99	1.02	1.15	1.06	1.05	1.06	1.05	10.3	10.8	10.5	10.7	10.4	10.6	10.5	2.41	2.35	2.44	2.33	2.47	2.44	2.36
<i>c</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	1.28	0.93	1.35	1.41	0.96	1.02	1.35	1.48	1.48	1.49	1.50	1.46	1.49	1.48	1.64	1.73	1.69	1.66	1.71	1.69	1.68
<i>t</i> 9, <i>c</i> 12-18:2	0.79	0.50	0.84	0.91	0.51	0.59	0.83	0.83	0.88	0.88	0.89	0.84	0.89	0.84	0.23xy	0.08x	0.36y	0.18	0.26	0.26	0.18
Total <i>trans</i> 18:2 ^c	3.00	2.42	3.26	3.33	2.45	2.65	3.14	12.6	13.1	12.9	13.1	12.7	12.9	12.8	4.3	4.2	4.5	4.2	4.4	4.4	4.2
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	tr	n.d.	0.8	0.3	0.3	0.5	tr	1.06	0.89	0.84	0.89	0.97	0.89	0.97	0.89	0.80	0.74	0.82	0.80	0.82	0.80
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA ^{bd}	n.d.	tr	0.2	n.d.	0.2	0.1	tr	0.13	0.17	0.20	0.17	0.16	0.14	0.19	0.25	0.24	0.26	0.26	0.25	0.24	0.26
<i>ditrans</i> CLA ^e	0.40	0.38	0.73	0.50	0.50	0.28	0.73	0.64x	0.66x	0.83y	0.70	0.73	0.71	0.72	0.62	0.65	0.70	0.65	0.66	0.65	0.66
Total CLA	0.41	0.39	1.15	0.52	0.78	0.52	0.78	1.83	1.72	1.87	1.75	1.86	1.74	1.87	1.57	1.61	1.71	1.60	1.66	1.63	1.63
<i>trans</i> 18:1	9.2	7.5	11.4	10.3	8.4	8.2	10.5	10.0	9.4	9.3	9.4	9.8	9.7	9.5	7.4	7.6	6.7	7.3	7.1	7.5	7.0
Total <i>trans</i> FA ^c	12.6	10.3	15.6	14.2	11.5	11.4	14.3	24	24	24	24	24	24	24	13.2	13.3	12.9	13.1	13.2	13.5	12.8

Abbreviations: FSO, fresh sunflower oil; PSO, peroxidized sunflower oil; OSO, oxidized sunflower oil; TA, α -tocopheryl acetate; FA, fatty acids; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; CLA, conjugated linoleic acid; n.d., not detected; tr, traces.

¹ Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=48 for plasma, n=48 for liver and n=48 for raw meat).

^a Fatty acid composition expressed as mg FA/L plasma, mg of FA/100 g of liver or mg of FA/100 g of meat.

^b In liver, interaction between added oil x Zn supplementation was significant at P \leq 0.05.

^c In meat, interaction between added oil x TA supplementation was significant at P \leq 0.05.

^d In liver, interaction between added oil x TA supplementation was significant at P \leq 0.05.

^e *Ditrans*-CLA: mixture of isomers.

x,y Values in the same row for a certain factor for the same sample bearing no common letters are statistically different (P \leq 0.05). P values were obtained from multifactor ANOVA, n=48. Letters were obtained by means of the Scheffé's test (α =0.05).

Table 5. Effect of the level of oxidation of the oil added to feeds and the dietary supplementation with Zn (0 or 200 mg/kg) on the fatty acid composition of raw rabbit meat (mg of fatty acid/100 g of meat)¹

	P	FSO ^a		PSO ^a		OSO ^a	
		0 Zn	200 Zn	0 Zn	200 Zn	0 Zn	200 Zn
C10:0	0.002	5.2	5.0	5.9	4.2	4.1	5.6
C12:0	0.004	6.0	5.8	6.6	5.1	5.0	6.3
C14:0	0.012	42	37	44	39	34	43
C15:0	0.003	13.4	12.2	14.2	12.8	11.5	13.7
iso-16:0	0.016	3.3	3.0	3.5	3.2	2.7	3.5
C16:0	0.013	550	490	580	510	470	560
C17:0	0.006	16.2	15.0	17.2	15.6	14.5	16.6
C18:0	0.005	195	178	206	189	173	201
C20:0	0.029	1.01	0.65	1.11	0.86	0.78	1.08
C22:0	0.032	1.53	1.37	1.59	1.47	1.47	1.59
C24:0	0.053	1.18	1.06	1.19	1.10	1.12	1.26
SFA	0.008	830	750	880	780	720	860
C16:1n-9	0.005	7.5	7.1	8.1	7.1	6.7	8.0
C18:1n-9	0.026	490	450	510	450	440	500
C20:1n-9	0.030	6.12	5.46	6.30	5.79	5.35	6.19
C24:1n-9	0.645	0.77	0.64	0.88	0.77	0.83	0.80
C16:1n-7	0.156	50	41	47	38	38	47
C18:1n-7	0.023	26	24	27	25	23	27
MUFA	0.032	580	530	600	530	510	590
C18:2n-6	0.016	1020	950	1080	990	900	1030
C18:3n-6	0.019	2.06	2.0	2.21	2.0	1.82	2.06
C20:2n-6	0.095	12.6	11.4	13.1	12.3	11.3	12.3
C20:3n-6	0.088	6.71	6.39	7.02	6.87	6.27	6.69
C20:4n-6	0.383	51	51	54	53	50	52
C22:4n-6	0.290	18.4	18.1	19.0	18.9	17.9	18.5
C22:5n-6	0.448	6.57	6.51	6.78	6.74	6.47	6.72
n-6 PUFA	0.016	1120	1050	1180	1090	990	1130
C18:3n-3	0.007	48	44	55	48	44	52
C18:4n-3	0.687	0.44	0.39	0.44	0.51	0.29	0.27
C20:3n-3	0.036	1.36	1.15	1.40	1.33	1.17	1.39
C20:5n-3	0.312	0.85	0.75	0.84	0.93	0.76	0.86
C22:5n-3	0.270	5.5	5.5	5.9	5.7	5.6	5.8
C22:6n-3	0.606	1.84	1.80	1.89	2.08	1.76	1.96
n-3 PUFA	0.009	58	54	65	58	54	62
Total PUFA	0.016	1180	1100	1240	1150	1050	1190
<i>t</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	0.001	2.66	2.15	2.50	2.20	2.16	2.72
<i>c</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	0.056	1.67	1.60	1.81	1.64	1.58	1.81
<i>t</i> 9, <i>c</i> 12-18:2	0.734	0.31	0.14	0.08	0.08	0.38	0.34
Total <i>trans</i> 18:2	0.006	4.6	3.9	4.4	3.9	4.1	4.9
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	0.067	0.92	0.86	0.87	0.73	0.68	0.81
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA	0.087	0.24	0.26	0.25	0.23	0.24	0.28
<i>ditrans</i> CLA ^b	0.159	0.65	0.58	0.65	0.64	0.66	0.75
Total CLA	0.114	1.67	1.48	1.65	1.57	1.58	1.83
<i>trans</i> 18:1	0.145	7.9	6.8	7.9	7.2	6.6	6.9
Total <i>trans</i> FA	0.017	14.3	12.2	14.0	12.7	12.3	13.6

¹ Interaction between oil added to feeds and Zn supplementation significant at $P \leq 0.05$. Values given are least-square means obtained from multifactor ANOVA, $n=48$.

^a Oil added to feeds (3%, w/w): FSO – fresh sunflower oil; PSO – peroxidized sunflower oil; OSO – oxidized sunflower oil.

^b *Ditran*-CLA: mixture of isomers.

Table 6. Element content (Zn, Cu, Fe and Se) in 100 g of raw rabbit meat as affected by the studied dietary factors (oxidation of the oil added to feeds and supplementation with α -tocopheryl acetate (0 or 100 mg/kg of feed) and Zn (0 or 200 mg Zn/kg, added as zinc oxide)¹.

	Added oil			TA		Zn	
	FSO	PSO	OSO	0	100	0	200
Zn (mg)	1.20	1.20	1.20	1.19	1.21	1.21	1.19
Cu (μ g)	50.5	51.5	50.5	50.2	51.4	51.5 y	50.1 x
Fe (mg)	0.55	0.53	0.54	0.53	0.55	0.54	0.54
Se (μ g)	9.11	9.44	9.43	9.26	9.40	9.35	9.33

¹ Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=48).

Table 7. Changes in fatty acid composition (mg of fatty acid/100 g of meat) after cooking vacuum-packed rabbit meat¹.

	Raw meat	Cooked meat
SFA	800	790
MUFA	560	550
C18:2n-6	990 y	940 x
C18:3n-6	2.02 y	1.85 x
C20:2n-6	12.2 y	11.5 x
C20:3n-6	6.7 y	6.0 x
C20:4n-6	52 y	45 x
C22:4n-6	18.5 y	15.9 x
C22:5n-6	6.6 y	5.5 x
n-6 PUFA	1090 y	1020 x
C18:3n-3	49 y	44 x
C18:4n-3 ^a	0.39 x	0.50 y
C20:3n-3	1.30 y	1.14 x
C20:5n-3	0.83 y	0.78 x
C22:5n-3	5.66 y	4.64 x
C22:6n-3	1.89 y	1.47 x
n-3 PUFA	59 y	53 x
Total PUFA	1150 y	1070 x
<i>t</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	2.40	2.40
<i>c</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	1.69	1.69
<i>t</i> 9, <i>c</i> 12-18:2	0.22 x	0.62 y
Total <i>trans</i> 18:2	4.31	4.54
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	0.81 y	0.74 x
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA ^b	0.25 y	0.16 x
<i>ditrans</i> CLA ^c	0.66 x	1.01 y
Total CLA	1.63	1.77
<i>trans</i> 18:1	7.23	7.01
Total <i>trans</i> FA	13.2	13.3

Abbreviations: SFA, saturated fatty acids (sum of C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, iso-16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0 and C24:0); MUFA, monounsaturated fatty acids (sum of C16:1n-9, C18:1n-9, C20:1n-9, C22:1n-9, C24:1n-9, C16:1n-7 and C18:1n-7); PUFA, polyunsaturated fatty acids; CLA, conjugated linoleic acid.

¹ Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=96).

^a Interaction between cooking x added oil significant at P≤0.05.

^b Interaction between cooking x TA supplementation significant at P≤0.05.

^c *Ditrans*-CLA, mixture of isomers.

x,y Values in the same row for a certain factor bearing no common letters are statistically different (P≤0.05). P values were obtained from multifactor ANOVA, n=96. Letters were obtained by means of the Scheffé's test ($\alpha=0.05$).

5.5. Oxidized oils and dietary zinc and α -tocopheryl acetate supplementation: effects on rabbit plasma, liver and meat oxidative stability.

Título: Incorporación de aceites oxidados en pienso, y suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol y zinc: efectos sobre la estabilidad oxidativa del plasma, hígado y carne de conejo

Revista: Enviado a Journal of Agricultural and Food Science

Índice de impacto: 2,53; Posición 7 / 103 (Journal Citation Reports, 2007)

Resumen: Se estudiaron los efectos de la incorporación de aceites de girasol calentados a piensos sobre el contenido en α -tocoferol y la oxidabilidad de plasma, hígado y carne de conejo. También, se estudiaron los efectos que tiene la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) y zinc (200 mg/kg) sobre estos parámetros, así como los efectos de la cocción de la carne y su posterior almacenamiento a refrigeración.

La incorporación de aceite de girasol calentado a 55°C durante 245 horas (alto contenido en compuestos de oxidación primaria) a pienso de conejo se redujo el contenido en α -tocoferol en los tejidos y aumentó la susceptibilidad a la oxidación de la carne de conejo. Cuando el aceite calentado incorporado al pienso presentaba un elevado contenido en compuestos de oxidación secundaria (calentado a 140°C durante 31 horas) aumentó la susceptibilidad a la oxidación de la carne cruda, aunque ésta presentaba un contenido en α -tocoferol similar a cuando se incorporó aceite no calentado a los piensos.

La suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) aumentó el contenido en α -tocoferol en los tejidos del conejo y produjo una mejora en la susceptibilidad a la oxidación en el hígado. Sin embargo en carne fue más efectiva

cuando el aceite incorporado no había sido calentado o cuando fue calentado a 140°C durante 31 horas, que cuando se calentó a 55°C, 245 horas.

Tras cocer la carne, la oxidación aumentó aunque fue reducida por la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol. Tras refrigerar la carne cocida, la oxidación alcanzó valores mayores. La determinación de la susceptibilidad a la oxidación en carne cruda mediante el índice de naranja de xilenol, fue efectiva para predecir la oxidación en carne cocida.

Oxidized oils and dietary zinc and α -tocopheryl acetate supplementation: effects on rabbit plasma, liver and meat oxidative stability

Tres A, Bou R, Codony R, Guardiola F

Nutrition and Food Science Department – XaRTA – INSA, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona

Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona (Spain)

Corresponding author:

Francesc Guardiola fguardiola@ub.edu

Nutrition and Food Science Department – XaRTA – INSA, Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona

Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona (Spain)

Tel: +34-93-4034842

Fax: +34-93-4035931

Running title: Oxidized oils and dietary supplements on rabbit tissue oxidative stability

Keywords: heated oils, zinc supplementation, α -tocopherol, meat oxidation, cooking, TBA value, FOX, lipid hydroperoxide

ABSTRACT

The effects of the addition of heated sunflower oils to feeds on rabbit plasma, liver and meat α -tocopherol content and oxidability were studied. Also, the effects of the dietary supplementation with α -tocopheryl acetate (100 mg/kg) and zinc (200 mg/kg) on these parameters were assessed, as well as the effects of cooking and the refrigerated storage of cooked meat. The incorporation of heated oil (55°C, 245 h, high content of primary oxidation compounds) to rabbit feeds reduced tissue α -tocopherol content and increased raw meat susceptibility to oxidation. When the heated oil added to feeds had a higher content of secondary oxidation compounds (heated at 140°C, 31 h) it also led to an increase in meat susceptibility to oxidation, although it presented a similar α -tocopherol content as when non heated oil was added to feeds. The supplementation with α -tocopheryl acetate increased tissue α -tocopherol content and improved liver and meat oxidative stability. However in meat, it was more effective when non heated sunflower oil, or heated sunflower oil at 140°C for 31 h were added to feeds.

INTRODUCTION

Nowadays there is an interest in incorporating unsaturated fats to animal feeds in order to improve the nutritional value of meat and other animal products not only by increasing the content of polyunsaturated fatty acids (PUFA), but also by reducing their n-6/n-3 ratio (1).

However feed and animal producers should not only pay attention to fatty acid (FA) composition of fat ingredients but also to their oxidative quality since unsaturated fats are prone to oxidation (2). At low temperature, for instance during fat transport and storage, lipid hydroperoxides (LHP) increase until they reach a plateau and then decompose into secondary oxidation compounds. At high temperatures, the formation and degradation of LHP is accelerated, so mostly secondary oxidation compounds are found in the fat, as well as some polymeric compounds (2). Such high temperatures could be achieved during the normal production of some fats, during refining or frying. In fact, nowadays some fat co- and by-products from the food chain are used as feed ingredients.

The addition of heated oils to animal feeds did not lead toxic effects when fat was added in normal amounts to feeds, and when it contained less than 25% of polar compounds (3, 4). Only some effects on digestibility were encountered when the polymer content of fats was high (5). But it should be taken into account that several detrimental biological effects have been reported for some oxidation compounds (3, 6-8). These effects can be encountered as a result of the presence of these compounds in the gastrointestinal tract (5, 7), or in tissues, both if they are formed in vivo or if they are absorbed from diet (5-7, 9). Absorption of intact LHP seems to be limited, because it has been reported that they are decomposed in the gastrointestinal tract (10-12), while the absorption of some secondary oxidation compounds seems to be more effective (5, 10).

Therefore, the evaluation of oxidative quality of fats is essential before they are added to feeds, since otherwise a high amount of primary and/or secondary oxidation compounds would be incorporated in feeds and some of them absorbed by the animal. This would alter its tissue composition and favor its oxidability which, apart from the negative biological effects related to oxidation compounds, has great influence on meat stability and shelf-life (13). In several studies in which heated oils were added to chicken feeds, reductions on the oxidative stability of tissues were encountered (14, 15).

Furthermore, the development of oxidation in feeds and in tissues could lead to a reduction on their PUFA content and to a loss of some antioxidants as α -tocopherol (α T), which diminishes meat nutritional quality and shelf-life. Several studies attributed the increases on tissue oxidability to the reductions on tissue α T content due to its reaction with oxidation compounds in diets, in the gastrointestinal tract or in tissues (14-16).

Dietary supplementation with α -tocopheryl acetate (TA) has been recommended to protect meats from oxidation, also during their processing, cooking and storage, especially when unsaturated fats are added to feeds (13).

Meats are a source of minerals with a high bioavailability. Furthermore, some minerals are involved in the oxidation processes. For instance, Fe might act as a prooxidant in tissues and foods, especially in cooked meats (17). Others, as Se or Zn might act as antioxidants because they are part of some antioxidant enzymes, as superoxide dismutase and glutathione peroxidase in some animal species.

Here, we studied the effect of the incorporation of sunflower oil (SO) with a different content of primary and secondary oxidation compounds to rabbit feeds, and the dietary supplementation with TA (100 mg/kg) and Zn (200 mg/kg) on the α T content, the oxidation and the susceptibility to oxidation of rabbit plasma, liver and meat. Also, we

studied how these dietary factors affected meat α T content and oxidation after cooking, and after refrigerated storage of cooked meat.

MATERIALS AND METHODS

Thermal treatment of oil

A non-refined SO was divided in three aliquots to perform the thermal treatment. The first aliquot, named fresh sunflower oil (FSO) did not suffer any thermal treatment. A second aliquot, named peroxidized sunflower oil (PSO), was heated at 55 °C for 245 h in a heat exchanger under agitation, and a third aliquot, named oxidized sunflower oil (OSO) was heated in a direct heating fryer at 140 °C for 31 h. Immediately after the thermal treatments butyl hydroxytoluene was added to the oils at 100 mg/kg. Several oxidation variables and α T content were measured in the three oils (Table 1).

Animals and diets

The preparation of diets and housing of animals took place in the Animal Science Department at the Polytechnic University of Valencia (Spain). Twelve isocaloric dietary treatments were prepared from a basal diet by the combination of the studied dietary factors, according to a factorial design (3×2×2), replicated four times: 3 types of oxidized sunflower oil (FSO, PSO and OSO) added to feeds at 3% (w/w), 2 doses of TA (0 or 100 mg TA/kg of feed) and 2 doses of Zn (0 or 200 mg/kg, added as zinc oxide). The composition of the basal diet was reported in Tres et al. (18).

Samples

Oils were taken immediately after the thermal treatment and oxidation parameters were determined within the following 6 h. Also, oil samples were stored in glass vials closed with Teflon caps, filled with N₂, and frozen at -25 °C until the rest of analysis were performed.

Feed samples were taken at the end of the feeding trial. Feeds were ground and vacuum packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; permeability to O₂ 25 cm³ × m⁻² × day⁻¹ × bar⁻¹ at 23 °C and 0% RH, ASTM D-3985; Cryovac Europe, Sealed Air S. L., Sant Boi de Llobregat, Spain; approximately 15 g feed/bag) and stored at -25 °C until analysis. Feed analysis were performed in triplicate.

Two hundred and eighty eight rabbits (cross of New Zealand and Californian rabbit) were weaned at 28 days, they were randomly divided into forty eight groups (twelve dietary treatments, four replicates, 6 rabbits per cage) and fed *ad libitum* with the corresponding experimental diet. At 63 days of age, rabbits were electrically stunned and killed by cutting carotids and jugulars. From four rabbits in each group, 20 mL of blood per animal was collected in heparinized tubes and immediately centrifuged at 1450 g at 4 °C for 10 min. Plasma samples from each group were mixed and transferred into microtubes and stored at -80 °C until analysis. Livers were immediately removed from carcasses and refrigerated for 5 h. Then, the six livers from each group were mixed, ground and vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; approximately 15 g liver/bag) and stored at -80 °C until analysis. Carcasses were refrigerated for 24 h at 4 °C. One leg was taken from each animal from each dietary treatment and was hand deboned. Meat from the six legs was mixed, ground and divided into three parts: raw meat, cooked meat and refrigerated cooked meat. Raw meat samples were vacuum-packed in high-barrier multilayer bags (Cryovac BB325; approximately 20 g meat/bag) and stored at -25 °C until analysis. Cooked meat samples were prepared by vacuum packing in high-barrier multilayer bags (Cryovac CN330; permeability to O₂ 15 cm³ × m⁻² × day⁻¹ × bar⁻¹ at 23 °C and 0% RH, ASTM D-3985; approximately 5 mm of meat thickness and 20 g meat/bag) and cooking in a water bath at 78 °C for 5 min. Then cooked meat samples were stored at -25 °C until analysis while refrigerated cooked meat samples were stored at 5 °C for 62 days and then frozen at -25 °C until analysis.

Reagents and standards

Reagents and standards were used as those described in Tres et al. (19).

Analysis of oils

Fatty acid composition of oils was determined by gas chromatography as described in Tres et al. (18). The α T content of oils was determined after a saponification step by HPLC-fluorescence detection (20).

Oxidation of oils was assessed by means of the peroxide value (DGF Method C-VI 6a (21), the ferrous oxidation-xylene orange (FOX) value (22), the *p*-Anisidine value (AOCS Official Method Cd 18-90 (23)) and the polymer content (DGF Method C-III 3d (<3%) (24), IUPAC 2508 (>3%) (25)) (Table 1).

Determination of α -tocopherol in plasma, liver and meat

The content of α T in feed and meat was determined, after a saponification step, by HPLC-fluorescence detection (26). However, one gram of feed was used as the sample amount for the feed analysis. The procedure for determining α T in liver was the same as that used for meat samples.

Plasma α T content was determined also by HPLC-UV detection, without a previous saponification step, as described in Tres et al. (27).

Lipid hydroperoxide determination in plasma, liver and meat

In order to assess the susceptibility of plasma, liver and meat to lipid oxidation, LHP were measured by the induced FOX method. The procedure used for plasma and liver samples was the same as used in Tres et al. (27). In this method, the methanolic

extract of liver samples was mixed with the FOX reagents in glass cuvettes capped with Teflon caps, and then the mixture (the final volume of the reaction mixture was always 2 mL) was incubated in the dark to induce LHP formation until absorbance at 560 nm was steady (90 h). The final LHP reached, quantified with a calibration curve using cumene hydroperoxide (CHP) as standard, was used to compare among samples.

For plasma samples, the methanolic extract of samples was incubated for 30 min with and without triphenylphosphine (a specific reducing agent of organic hydroperoxides) and then mixed with FOX reagent. These mixtures were incubated in the dark for 116 h, and the difference of both absorbance values was used to quantify the final LHP reached (27).

For meat samples, the method described by Grau et al. (29) and modified by Tres et al. (28) was used. The FOX reaction was conducted as with plasma and liver samples, but measurements of absorbance were taken at several time intervals during the FOX reaction (first, at 30 min then every 24 h, until 216 h of FOX reaction). With these absorbance measurements the parameters proposed in Tres et al. (28) were calculated: induction time (IT, h), maximum LHP reached (MAXLHP, mmol CHP eq/kg of meat), time to reach the MAXLHP (TMAX, h), final LHP reached after incubation (mmol CHPeq/kg of meat) and area under the curve (AUC, [mmol CHPeq/kg of meat] × h).

Determination of TBA value

The thiobarbituric acid (TBA) value in rabbit meat was determined by an acid aqueous extraction method with third derivative spectrophotometry (30). This method was also used to determine the TBA value in liver and plasma samples, with the modifications described in Tres et al. (27).

Statistics

One-way ANOVA was used to determine whether there were differences in the peroxide value, FOX value, *p*-Anisidine value, polymer content, α T content and FA composition of oils due to the thermal treatment. Multifactor ANOVA was used to determine significant differences due to the dietary factors (level of oil oxidation, TA and Zn supplementation) in the α T content of feeds (n=36), and the α T content, FOX and TBA values in rabbit plasma (n=48), liver (n=48), raw meat (n=48), cooked meat (n=48) and refrigerated cooked meat (n=48). Multifactor ANOVA was used to determine whether the α T content, FOX and TBA value differed between plasma, liver and raw meat samples due to the studied dietary factors (n=144). Multifactor ANOVA was used to determine whether there were significant differences due to the effect of cooking (n=96) and due to the effect of refrigerating cooked meat (n=96) in the α T content, FOX and TBA values of meat. Interactions among more than two factors were ignored. Least-square means for the main factors that had a significant effect were separated by the Scheffé's test. Pearson correlation coefficients were calculated among α T content, FOX and TBA values in plasma, liver and meat, and among raw, cooked and refrigerated cooked meat. In all cases, $P \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Oxidation of the oils used to prepare the feeds

Thermal treatment of oil altered its oxidation, FA composition and α T content (Table 1). Heating the oil at 55 °C for 245 h (PSO) led to an increase in its primary oxidation compounds as it was reflected in both peroxide and LHP values, while secondary oxidation compounds remained at the level found in FSO. However, heating SO at 140 °C for 31 h increased *p*-Anisidine value and its polymer content, since at this temperature the formation of secondary oxidation compounds containing carbonyl groups was favored, as well as polymerization reactions (2). Both peroxide and LHP

values were reduced due to the instability of primary oxidation compounds at high temperatures (2).

The content of α T in PSO oil was significantly reduced as a result of the thermal treatment (Table 1), because α T in oil scavenged radicals and other primary oxidation compounds formed during heating conditions of PSO oil (2). Oils were directly added to feeds (3%, w/w). This led to PSO feeds with a slightly lower α T content than FSO or OSO feeds (Table 2).

Oxidation and susceptibility to oxidation of rabbit plasma, liver and meat

In this study, plasma, liver and meat oxidation was assessed by means of TBA value (30), which measures their malondialdehyde (MDA) content, a secondary oxidation compound. It was also assessed their susceptibility to oxidation using the FOX method, which consists of an induced method that measures the LHP formed in the FOX reaction media over time (28, 29, 31).

Oxidation and susceptibility to oxidation decreased in the order liver, meat and plasma (Table 2), which corresponds to the same order of fat content in these samples. In fact, plasma TBA was below the detection limit in all samples (13 μ g of MDA/L plasma) (Table 2), which might be related to its high α T/fat content ratio (data not shown). This low plasma oxidation was according with results from other studies in which rabbits received more unsaturated feeds (27).

The α T contents in plasma, liver and rabbit meat were positively correlated among them, which indicates that plasma α T content is a good indicator of α T content in tissues (Table 3), according to what has been reported in rabbit and other animal species (16, 27, 32-36).

Furthermore, the α T contents of plasma, liver and meat were also negatively correlated with FOX values of plasma and meat (positive correlations with meat IT and TMAX, and negative correlations with MAXLHP, AUC and final LHP value) (Table 3), which indicates that the plasma α T content is an indicator of rabbit meat susceptibility to oxidation (27). Also, negative correlations were found among the content of α T in liver with meat oxidation (TBA value) (Table 3). This might be related to the liver implications in the metabolism of fat soluble vitamins as α T.

The addition of PSO to feeds at 3% (w/w) favored meat susceptibility to oxidation and reduced the α T content of rabbit plasma, liver and meat (Table 2). But during the thermal treatment the α T content of PSO was reduced, so feeds containing 3% (w/w) PSO oil had a lower α T content than feeds containing FSO or OSO oil. Therefore, as in other studies (15, 16, 33, 37) the effects on meat susceptibility to oxidation of the inclusion of heated PSO oil on rabbit or chicken feeds could be related to the lower α T supply from diet. In some of these studies oils were oxidized under extreme time and temperature conditions which led to a substantial reduction, or indeed to the absence, of α T in the oils (15, 16, 33, 38).

However, this might not be the only factor affecting both the lower α T content of plasma, liver and meat from animals on diets containing heated oils, and tissue susceptibility to oxidation. Although in some studies no differences in the α T content, oxidation (TBA value) and oxidative stability (LHP value) of raw chicken meat were observed when animals received feeds containing fresh or heated SO under different time and temperature conditions, the same tendency was encountered (39-41). Furthermore, reductions on chicken meat α T content and increases in its susceptibility to oxidation were even evident when fresh and heated oils (containing a high amount of primary oxidation compounds) with similar α T content were compared (14-16, 38). Thus, apart from the lower α T in PSO oil and consequently in PSO feeds, other mechanisms might be involved in the lower plasma, liver and meat α T content and in the higher susceptibility to oxidation of liver and meat.

Reductions on α T content in PSO tissues could be also a consequence of a reduction on the amount of α T absorbed due to the lower α T content in feeds and to a loss of α T in the gastrointestinal tract because of its reaction with radicals and other oxidation compounds in which PSO oil was richer than FSO and OSO oils (Table 1). Furthermore, α T might react with oxidation compounds absorbed from diets or formed *in vivo* or *post mortem* in meat. While it seems that secondary oxidation compounds and cholesterol oxidation products are absorbed in the gastrointestinal tract (5, 42), LHP are not likely to be absorbed in their intact form because of previous modifications occurring in the stomach and in the intestinal epithelium (5, 10, 11). Suomela et al. (12, 43) after feeding pigs with a diet rich in LHP were unable to find LHP in intestinal cells or in lipoproteins but instead they found triglycerides with hydroxy, epoxy or keto groups. In our study, OSO meats tended to be more susceptible to oxidation than FSO meats, as it was indicated by the IT, MAXLHP, TMAX and AUC in the FOX reaction (Tables 2 and 4). As the α T content of OSO and FSO meats was similar, this higher susceptibility to oxidation could be related to some absorbed oxidation compounds from feeds.

But as the α T content in our oils and feeds from fresh and heated oils was not the same, we were unable to attribute the observed effects on rabbit liver and meat α T content and susceptibility to oxidation to all or to only some of these factors. In fact, all of them could contribute to some extent to the observed effects.

The dietary supplementation with TA partially counteracted these effects. It is recommended to supplement diets with TA to improve meat oxidative stability, shelf life and quality, especially when unsaturated fat sources are added to feeds (13). In our study, the dietary supplementation with 100 mg TA/kg led to a reduction of liver TBA values, and in liver and meat susceptibility to oxidation (FOX values) as a result of the increase in plasma, liver and meat α T content (Table 2). Similar increases in α T content of meat with concomitant decreases in meat oxidation and susceptibility to oxidation (measured by means of LHP value as in our study, or by the TBA value after the induction of oxidation under standard conditions) have been reported in rabbit and

other animal species (19, 34-36, 38-40, 44-47). In some of these studies, significant reductions of meat oxidation by dietary TA supplementation were observed when feeds contained heated oils, or fats with a more unsaturated FA profile than those used in our study (19, 32, 36, 38-40, 45, 47-49). But in our study, the supplementation with TA (100 mg/kg) did not reduce meat TBA values significantly (Table 2). The lower oil content in rabbit feeds, the low fat content of rabbit meat with respect to meat from other animal species, and its low content of FA with more than two double bonds from which MDA is produced (50), might account for the absence of the effect of TA reducing meat TBA values in our study, as well as in others (15, 16).

Nevertheless in our study, the protection effect against oxidation of TA supplementation was reflected in the reduction of the susceptibility to oxidation of liver (final LHP values were reduced) and raw meat (Table 2). Dietary supplementation with TA (100 mg/kg) delayed the onset of oxidation in meats (longer IT and TMAX) and lowered the MAXLHP and AUC (Table 2). However, this improvement on meat oxidation was different depending on the level of oxidation of the oil added to feeds, being less effective when feeds contained PSO oil (Table 4). Among meats from TA-supplemented diets, those from PSO diets were more susceptible to oxidation than those from FSO and OSO diets, showing shorter IT and TMAX, and higher MAXLHP, AUC and final LHP value (Table 4). Although TA supplementation delayed the onset of oxidation in PSO meats and reduced their MAXLHP and AUC, the final LHP values reached by TA-PSO meats were close to final LHP of meats from non-TA supplemented PSO diets (Table 4). Meats from feeds containing FSO and supplemented with 100 mg of TA/kg were the most stable, because oxidation was not increased in them after 216 h of reaction with FOX reagent. Thus, it is shown that if low quality oils are added to feeds, the TA supplementation is necessary to reduce tissue susceptibility to oxidation, but it might need to be adjusted depending on the level of oxidation of oil added to feeds.

The supplementation with 200 mg of Zn/kg of feed did not alter neither the α T content of rabbit tissues, nor meat TBA value (Table 2), according to what was found in chicken

meat (26, 40, 51), although in our study it led to a slight decrease in Cu content (18). In some studies, decreases in the Cu content of tissues as a result of an increase in dietary Zn led to decreases in the activities of some antioxidant enzymes as copper-zinc superoxide dismutase (52).

However, a significant interaction was found between the level of oxidation of oils added to feeds and Zn supplementation for the susceptibility to oxidation of raw meat (Table 5). When Zn was added to PSO feeds at 200 mg/kg it decreased the susceptibility to oxidation of raw meat, as it was indicated by the longer IT and TMAX, and lower MAXLHP, final LHP and AUC. On the contrary, when the oil added to feeds was OSO oil, the dietary supplementation with Zn (200 mg/kg) favored meat oxidability. In meats from FSO diets, Zn supplementation did not modify their oxidability. This interaction was according with the interaction between the level of oxidation of the oil added to feeds and Zn supplementation observed for the FA content of meats (Table 5) (18). Since meat susceptibility to oxidation depends on the balance between antioxidants, pro-oxidants and substrates (2, 17), and OSO meat α T content was not modified by Zn supplementation, the slight increase in the FA content observed in meat when 200 mg of Zn/kg was added to feeds containing OSO oil (18) might explain the encountered increase of its susceptibility to oxidation. Conversely, Zn supplementation in feeds containing PSO oils led to a slight decrease in meat FA content (18) and thus in meat susceptibility to oxidation (Table 5). As the FA composition of plasma and liver was not affected by the interaction between the level of oxidation of oil added to feeds and Zn supplementation, it did not affect either their susceptibility to oxidation.

On the other hand, an interaction between dietary supplementation with TA and Zn was observed in liver oxidation. The highest TBA values were found in liver from animals that did not receive either TA or Zn supplementation. The lowest TBA values were encountered when 100 mg of TA/kg of feed was added without Zn supplementation (Figure 1), thus it seemed that Zn supplementation diminished somehow the protective effect of TA supplementation against oxidation in liver.

Effect of cooking and refrigeration of cooked meat on oxidation and oxidative stability of meat

Neither cooking nor the refrigeration of cooked meat affected meat α T content (Table 6). However, cooked meat showed significantly but slightly higher TBA values than raw meat, and a slightly lower susceptibility to oxidation (longer IT, TMAX and reduced AUC) (Table 6).

The determination of the susceptibility to oxidation (FOX values) of raw meat was an indicator of meat oxidation (TBA value) after cooking, because they were positively correlated (Table 7).

Increases on meat oxidation have been reported after cooking meat from rabbit or other animal species (19, 38, 39, 46, 47, 53, 54), although as in our study, it was not always accompanied by a decrease in meat α T content (45).

The effects of cooking on meat oxidation have been related with protein denaturation (loss of antioxidant enzyme activity and release of prooxidant metal ions as non-heme iron), myoglobin oxidation or with disruption of cell membranes which might bring into contact PUFA with prooxidant compounds (17, 39). These factors together with the time, temperature and cooking rate conditions used (55) might increase meat oxidation. In our study, cooking conditions were mild and caused a slight reduction in meat susceptibility to oxidation and a slight increase in meat TBA values (Table 6). Furthermore, FA with more than two double bonds, which are prone to oxidation (2, 17), were not very abundant in our rabbit meat due to its low fat content and the type of oil added to feeds (18). Conchillo et al. (54) after roasting chicken meat reported increases in meat TBA value, but not in its peroxide content. Similar results on meat oxidation and oxidability were found by Grau et al. (39) after cooking chicken meat, but the differences between raw and cooked meat were more pronounced due to the higher fat content and unsaturation on their meat (plus skin), and the cooking conditions applied in their study (80 °C, 35 min in a pressure cooker).

Apart from cooking conditions and their effects on meat structure, oxidation in meat and other foods is also affected by the storage conditions, including type of packaging, presence of oxygen, illumination and temperature (17, 55). In our study, although meat oxidation was slightly increased as a result of cooking, it reached much higher TBA values after its refrigerated storage. In spite of this, these TBA values were below or close to the threshold for rancid flavor in a trained panelist reported for other meats (51, 56).

Meat oxidation has been reported to increase during storage both of raw (34, 36, 53, 57, 58) or cooked meat (15, 19, 38, 53-55) but the values reached depended on the storage conditions (54, 55). The mild cooking conditions applied in our study (vacuum-packed meat, at 80 °C, for 5 min) were only able to produce a slight increase on oxidation, however, when they were combined with a refrigerated storage for 62 days, they promoted meat oxidation reaching higher TBA values (Table 6). However FOX values (IT, TMAX, AUC, MAXLHP) were not modified with respect of cooked meat. Vacuum-packed meat was cooked and then refrigerated, without removing the packaging. Therefore, the low oxygen availability might have slowed the rate of formation of LHP, which once formed might have been decomposed faster into secondary oxidation products as MDA, thus leading to an increase in TBA value but not in FOX values. Conversely, Grau et al. (39) and Conchillo et al. (54) found that LHP value or peroxide content increased after 3 months of frozen storage of vacuum-packed cooked meat due to the prooxidant conditions induced by cooking. Although in both studies and in ours vacuum-packed cooked meat was studied, which has been reported to protect meat from oxidation (54, 55), they used higher time and temperature than us in cooking, they stored cooked meat frozen and for a longer time, and their meat had a higher fat content than ours. All these factors might have induced the higher development of LHP in their meat during the first 3 months of storage.

Susceptibility to oxidation was assessed in cooked meat by means of FOX values. However, FOX values of cooked meat did not correlate with TBA values after refrigerated storage (Table 7). This might indicate that the onset and development of

oxidation in our refrigerated cooked meats was much more dependent on the storage conditions than on the changes that cooking conditions produced in meat.

The dietary supplementation with 100 mg TA/kg of feed increased the α T content both in cooked and in refrigerated cooked meat, as it did in raw meat (Table 2). This led to a 35% reduction on TBA values of cooked meat due to the protection effect of α T against oxidation (Table 2). However, TA supplementation was not effective in reducing TBA values after refrigeration of cooked meat, although the same tendency was observed (Table 2). Neither Haak et al. (47) found lower TBA values as a result of TA supplementation after refrigerated storage of cooked pork meat, and similar findings were encountered after refrigerated storage of cooked rabbit meat from animals fed with different fat sources and TA supplementation (19). In several studies, the dietary supplementation with TA reduced meat oxidation after cooking or after storage of raw and cooked meat, although oxidation increased in both TA-supplemented and non-TA supplemented meats compared with the corresponding raws (15, 19, 34, 36, 38-41, 45, 46, 55). In our study, apart from the effects of TA supplementation on cooked meat TBA value, the protection effect of α T against oxidation after cooking was evident when the susceptibility to oxidation of cooked and refrigerated cooked meat was assessed using FOX values. All the parameters measured in these meats (IT, TMAX, MAXLHP, AUC and final LHP value) highlighted a reduction on meat oxidability as a result of the increase of meat α T content due to TA supplementation (Table 2). Also, the α T content of all raw, cooked and refrigerated cooked meat were negatively correlated with the parameters that measure the susceptibility to oxidation of meat after cooking and after refrigeration of cooked meat (Table 7).

The lower α T content in meat as a result of the addition of PSO oils to feeds at 3% (w/w) instead of FSO or OSO oil was still significant in cooked and in refrigerated cooked meat (Table 2). But as in raw meat, it did not lead to alterations on their TBA values, although it modified their susceptibility to oxidation as it was shown by the FOX parameters (Table 2). In some studies with chickens, differences on meat oxidation

after cooking or after storage as a result of feeding animals with diets containing oxidized oils were encountered (38) but not in others (39, 40).

The dietary supplementation with Zn (200 mg/kg) did not affect TBA values of refrigerated cooked meat, but it slightly increased the TBA value in cooked meat. The same tendency, although it was not significant, was observed in raw meat (Table 2). No differences in the TBA value were observed after cooking and after storage of meat from chickens fed with diets supplemented with Zn (26, 40).

CONCLUSIONS

When SO was heated at 55 °C for 245 h increased its content on primary oxidation compounds and decreased its α T content. Its addition to rabbit feeds at 3% (w/w) reduced meat α T content and increased its susceptibility to oxidation. But as FSO and PSO feeds did not present a similar α T content we could not discern if these effects were due to the lower feed α T content, its destruction in the gastrointestinal tract by radicals and other compounds present in PSO oil, or its reaction with oxidation compounds formed *in vivo* or absorbed from diets. However it is proved that the addition of PSO to feeds (3%, w/w) reduced the α T status of rabbit tissues and increased the susceptibility to oxidation of meat. Therefore, the basal α T amount in feeds was not enough to protect rabbit meat from oxidation. Plasma α T content was an indicator of meat susceptibility to oxidation. The dietary supplementation with 100 mg of TA/kg of feed increased the α T content in rabbit plasma, liver and meat, and reduced oxidation in liver and meat susceptibility to oxidation which varied depending on the level of oxidation of the oil added to feeds. Therefore, the supplementation with TA should be adapted depending on the oxidation of the oil added to feeds.

Furthermore, cooking slightly decreased the susceptibility of meat to oxidation and slightly increased the TBA values, which were reduced by TA supplementation. However, after refrigerated storage, oxidation in meat reached much higher levels,

regardless to the dietary supplementation with TA. But in spite of this increase, TBA values were below the threshold for the detection of rancid flavor by consumers.

Heating SO at 140 °C for 31 h increased its content on secondary oxidation compounds. The addition of this heated oil to rabbit feeds at 3% (w/w) did not affect either the α T content of plasma, liver and meat, or their oxidation (TBA value), and only modified meat susceptibility to oxidation (FOX values) compared with the addition of FSO, which could be due to some absorbed compounds from diet. It should be taken into account that OSO oil might contain some oxidation products that might be absorbed and could present some negative biological effects (3).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and by a research grant from Instituto Danone to A. Tres.

The authors thank “Frit Ravich” and “Laboratorios Salvat” for allowing us to use their facilities for heating the experimental oils. The authors would like to thank the Department of Animal Science of the Polytechnic University of Valencia for the housing of animals and slaughtering facilities, and E. Carmona, M. Redecker and M. Gonzalo for their help in the analyses.

LITERATURE CITED

1. Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 21-32.
2. Frankel, E.N. *Lipid oxidation*, The Oily Press LTD: Dundee, UK, 1998.
3. Marquez-Ruiz, G.; Dobarganes, M.C. Nutritional and physiological effects of used frying fats, In *Deep Frying: Chemistry, Nutrition and Practical Applications*, Perkins, E.G.; Erickson, M.D., Eds.; AOCS Press: Champaign, IL., 1996.
4. Billek, G. Health aspects of thermoxidized oils and fats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 587-593.
5. Marquez-Ruiz, G.; Garcia-Martinez, M.C.; Holgado, F. Changes and effects of dietary oxidized lipids in the gastrointestinal tract. *Lipids Insights* **2008**, *2*, 11-19.
6. Guardiola, F.; Dutta, P.C.; Codony, R.; Savage, G.P. *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*. AOCS Press: Champaign, IL, 2002.
7. Spitteller, G. Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biol. Med.* **2006**, *41*, 362-387.
8. Esterbauer, H. Cytotoxicity and Genotoxicity of Lipid-Oxidation Products. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, S779-S786.

-
9. Staprans, I.; Rapp, J.H.; Pan, X.M.; Hardman, D.A.; Feingold, K.R. Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscl, Throm.Vasc.* **1996**, *16*, 533-538.
10. Kanazawa, K.; Ashida, H. Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1393*, 349-361.
11. Aw, T.Y. Intestinal glutathione: Determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 320-328.
12. Suomela, J.P.; Ahotupa, M.; Kallio, H. Triacylglycerol hydroperoxides not detected in pig small intestinal epithelial cells after a diet rich in oxidized triacylglycerols. *Lipids* **2005**, *40*, 349-353.
13. Gray, J.I.; Gomaa, E.A.; Buckley, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci.* **1996**, *43*, S111-S123.
14. Sheehy, P.J.A.; Morrissey, P.A.; Flynn, A. Influence of heated vegetable oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on alpha-tocopherol, fatty acids and lipid peroxidation in chicken muscle. *Br. Poult. Sci.* **1993**, *34*, 367-381.
15. Galvin, K.; Morrissey, P.A.; Buckley, D.J.; Frigg, M. Influence of oil quality and alpha-tocopheryl acetate supplementation on alpha-tocopherol and lipid oxidation in chicken tissues. **1993**, *Proceedings of the 11th European Symposium on the Quality of the Poultry Meat*, 423-429.
16. Sheehy, P.J.A.; Morrissey, P.A.; Flynn, A. Consumption of thermally-oxidized sunflower oil by chicks reduces alpha-tocopherol status and increases susceptibility of tissues to lipid oxidation. *Br. J. Nutr.* **1994**, *71*, 53-65.

17. Erickson, M.C. Lipid oxidation of muscle foods, In *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, Akoh, C.C.; Min, D.B., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2007.
18. Tres, A.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Oxidized oils and dietary zinc and alpha-tocopheryl acetate supplementation: effects on rabbit plasma, liver and meat fatty acid composition and meat mineral content. *J. Agric. Food Chem.* **Under review**
19. Tres, A.; Bou, R.; Codony, C.; Guardiola, F. Influence of different dietary doses of n-3- or n-6-rich vegetable fats and alpha-tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7243-7253.
20. Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Baucells, M.D.; Guardiola, F. Increase of geometrical and positional fatty acid isomers in dark meat from broilers fed heated oils. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1942-1954.
21. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) DGF method C-VI 6a. **2002**
22. Navas, J.A.; Tres, A.; Codony, R.; Boatella, J.; Bou, R.; Guardiola, F. Modified ferrous oxidation-xyleneol orange method to determine lipid hydroperoxides in fried snacks. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 688-696.
23. AOCS *Official methods and recommended practices of the American Oils Chemists Society*, AOCS Press: Champaign, IL, 1998-2008.
24. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) DGF Method C-III 3d. **2000**
25. IUPAC Standard method 2508, In *IUPAC Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. 1st supplement to the 7th Ed. ed.; Anonymous ; Blackwell Science: Oxford, UK, 1992.

26. Bou, R.; Guardiola, F.; Tres, A.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effect of dietary fish oil, alpha-tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult. Sci.* **2004**, *83*, 282-292.
27. Tres, A.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and antioxidants: effects on fatty acid composition and stability of plasma, liver and meat. *Animal under review*
28. Tres, A.; Nuchi, C.D.; Bou, R.; Codony, R.; Guardiola, F. Assessing rabbit and chicken tissue susceptibility to oxidation through the ferrous oxidation-xylenol orange method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **In Press**
29. Grau, A.; Codony, R.; Rafecas, M.; Barroeta, A.C.; Guardiola, F. Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xylenol orange method. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4136-4143.
30. Grau, A.; Guardiola, F.; Boatella, J.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1155-1159.
31. Bou, R.; Codony, R.; Tres, A.; Decker, E.A.; Guardiola, F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* **2008**, *377*, 1-15.
32. Monahan, F.J.; Buckley, D.J.; Gray, J.I.; Morrissey, P.A.; Asghar, A.; Hanrahan, T.J.; Lynch, P.B. Effect of dietary Vitamin E on the stability of raw and cooked pork. *Meat Sci.* **1990**, *27*, 99-108.
33. Sheehy, P.J.A.; Morrissey, P.A.; Buckley, D.J.; Frigg, M. Modification of alpha-tocopherol concentration, fatty acid composition and oxidative stability of chick tissues

by consumption of fresh or heated sunflower and linseed oils. **1993**, *Proceedings of the 11th European Symposium on the Quality of the Poultry Meat*, 448-454.

34. Castellini, C.; Dal Bosco, A.; Bernardini, M. Improvement of lipid stability of rabbit meat by vitamin E and C administration. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 46-53.

35. Oriani, G.; Corino, C.; Pastorelli, G.; Pantaleo, L.; Ritieni, A.; Salvatori, G. Oxidative status of plasma and muscle in rabbits supplemented with dietary vitamin E. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, *12*, 138-143.

36. Lo Fiego, D.P.; Santoro, P.; Macchioni, P.; Mazzoni, D.; Piattoni, F.; Tassone, F.; De Leonibus, E. The effect of dietary supplementation of vitamins C and E on the α -tocopherol content of muscles, liver and kidney, on the stability of lipids, and on certain meat quality parameters of the longissimus dorsi of rabbits. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 319-327.

37. Engberg, R.M.; Lauridsen, C.; Jensen, S.K.; Jakobsen, K. Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets: Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. *Poult. Sci.* **1996**, *75*, 1003-1011.

38. Galvin, K.; Morrissey, P.; Buckley, D.J. Influence of dietary vitamin E and oxidised sunflower oil on the storage stability of cooked chicken muscle. *Br. Poult. Sci.* **1997**, *38*, 499-504.

39. Grau, A.; Guardiola, F.; Grimpa, S.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poult. Sci.* **2001**, *80*, 1630-1642.

40. Bou, R.; Codony, R.; Baucells, M.D.; Guardiola, F. Effect of heated sunflower oil and dietary supplements on the composition, oxidative stability, and sensory quality of dark chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7792-7801.

41. Bou, R.; Grimpa, S.; Guardiola, F.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effects of various fat sources, alpha-tocopheryl acetate and ascorbic acid supplements on fatty acid composition and alpha-tocopherol content in raw and vacuum-packed, cooked dark chicken meat. *Poult. Sci.* **2006**, *85*, 1472-1481.
42. Guardiola, F.; Tres, A.; Codony, R.; Addis, P.B.; Bergmann, S.D.; Zavoral, J.H. Lack of effect of oral supplementation with antioxidants on cholesterol oxidation product concentration of human plasma, as revealed by an improved gas chromatography method. *Anal.Bioanal.Chem.* **2007**, *389*, 277-289.
43. Suomela, J.P.; Ahotupa, M.; Kallio, H. Triacylglycerol oxidation in pig lipoproteins after a diet rich in oxidized sunflower seed oil. *Lipids* **2005**, *40*, 437-444.
44. Bou, R.; Grimpa, S.; Baucells, M.D.; Codony, R.; Guardiola, F. Dose and duration effect of alpha-tocopheryl acetate supplementation on chicken meat fatty acid composition, tocopherol content, and oxidative status. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5020-5026.
45. Castellini, C.; Dal Bosco, A.; Bernardini, M.; Cyril, H.W. Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability of raw and cooked rabbit meat. *Meat Sci.* **1998**, *50*, 153-161.
46. Dal Bosco, A.; Castellini, C.; Bernardini, M. Nutritional quality of rabbit meat as affected by cooking procedure and dietary vitamin E. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 1047-1051.
47. Haak, L.; Raes, K.; Van Dyck, S.; De Smet, S. Effect of dietary rosemary and α -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 239-247.
48. Hoz, L.; Lopez-Bote, C.J.; Cambero, M.I.; D'Arrigo, M.; Pin, C.; Santos, C.; Ordonez, J.A. Effect of dietary linseed oil and alpha-tocopherol on pork tenderloin (Psoas major) muscle. *Meat Sci.* **2003**, *65*, 1039-1044.

49. Surai, P.F.; Sparks, N.H.C. Tissue-specific fatty acid and α -tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poult. Sci.* **2000**, *79*, 1132-1142.
50. Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* **1991**, *11*, 81-128.
51. Bou, R.; Guardiola, F.; Barroeta, A.C.; Codony, R. Effect of dietary fat sources and zinc and selenium supplements on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 1129-1140.
52. Sundaresan, P.R.; Kaup, S.M.; Wiesenfeld, P.W.; Chirtel, S.J.; Hight, S.C.; Rader, J.I. Interactions in indices of vitamin A, zinc and copper status when these nutrients are fed to rats at adequate and increased levels. *Br. J. Nutr.* **1996**, *75*, 915-928.
53. Russell, E.A.; Lynch, P.B.; O'Sullivan, K.; Kerry, J.P. Dietary supplementation of α -tocopheryl acetate on α -tocopherol levels in duck tissues and its influence on meat storage stability. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, *39*, 331-340.
54. Conchillo, A.; Ansorena, D.; Astiasaran, I. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 141-146.
55. Kingston, E.R.; Monahan, F.J.; Buckley, D.J.; Lynch, P.B. Lipid oxidation in cooked pork as affected by vitamin E, cooking and storage conditions. *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 386-389.
56. Campo, M.M.; Nute, G.R.; Hughes, S.I.; Enser, M.; Wood, J.D.; Richardson, R.I. Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Sci.* **2006**, *72*, 303-311.

57. Corino, C.; Lo Fiego, D.P.; Macchioni, P.; Pastorelli, G.; Di Giancamillo, A.; Domeneghini, C.; Rossi, R. Influence of dietary conjugated linoleic acids and vitamin E on meat quality, and adipose tissue in rabbits. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 19-28.

58. Zsedely, E.; Toth, T.; Eiben, C.; Virag, G.; Fabian, J.; Schmidt, J. Effect of dietary vegetable oil (sunflower, linseed) and vitamin E supplementation on the fatty acid composition, oxidative stability and quality of rabbit meat. *9th World Rabbit Congress 2008, Book of Abstracts*, 1473-1477.

Figure 1. Interaction of dietary supplementation with α -tocopheryl acetate (100 mg/kg) and zinc (200 mg/kg) on liver oxidation (TBA value).

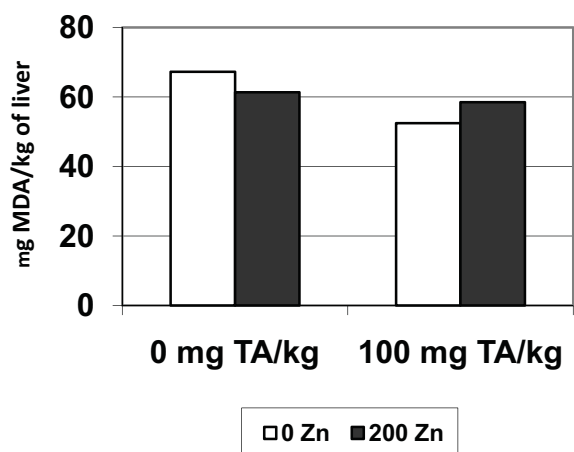


Table 1. Assessment of oxidation, α -tocopherol content and fatty acid composition of oils after heating three aliquots of the same non-refined sunflower oil under different conditions of time and temperature^a.

	FSO	PSO	OSO
Thermal treatment	No treatment	55°C, 245 h	140°C, 31 h
Assessment of oxidation ^b			
Peroxide value	10.4 y	83.0 z	9.8 x
LHP value	10.5 y	89.0 z	5.84 x
<i>p</i> -Anisidine value	2.8 x	2.7 x	124.5 y
Polymer content	0.09 x	0.25 y	9.9 z
α -Tocopherol content ^c	621.54 y	510.57 x	605.06 xy
FA composition ^d			
SFA ^d	110	108	106
MUFA ^d	188	189	184
C18:2n-6	630 y	620 y	580 x
C20:2n-6	0.43	0.34	0.36
C18:3n-3	1.50 y	1.50 y	1.33 x
<i>c</i> 9, <i>t</i> 12-18:2	0.60 x	0.61 x	0.70 y
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	0.17 x	0.17 x	0.3 y
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA	0.16	0.17	0.23
<i>ditrans</i> CLA ^e	0.13 x	0.14 x	0.64 y
Total <i>trans</i> FA	1.06 x	1.08 x	1.87 y

Abbreviations used: FSO, fresh sunflower oil; PSO, peroxidized sunflower oil; OSO, oxidized sunflower oil; FA, fatty acid; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; CLA, conjugated linoleic acid.

^a Values correspond to least-square means obtained from ANOVA (n=18).

^b Peroxide Value, mEq O₂/kg; LHP value, mmol CHP eq/kg; Polymer content, % w/w.

^c α -Tocopherol content, mg α -tocopherol/kg.

^d Fatty acid composition, g of fatty acid/kg. SFA, sum of C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0; MUFA, sum of C16:1n-9, C18:1n-9, C20:1n-9, C16:1n-7 and C18:1n-7.

^e *Ditran*-CLA, mixture of isomers.

x,y,z Values in the same row bearing no common letters are statistically different (P \leq 0.05). Letters were obtained by means of the Scheffé's test (α =0.05).

Table 2. Content of α -tocopherol in feeds, plasma, liver and meats (raw, cooked and refrigerated cooked meat), and oxidation (TBA value) and susceptibility to oxidation (FOX values) of plasma, liver and meats due to the addition of sunflower oil of different levels of oxidation, and supplementations with α -tocopheryl acetate (0 or 100 mg/kg) and Zn (0 and 200 mg/kg)^a.

	Added oil			TA (mg/kg)		Zn (mg/kg)	
	FSO	PSO	OSO	0	100	0	200
α -Tocopherol content ^b							
Feeds	74.5 xy	67.6 x	77.4y	33.7 x	112.6 y	75.0	71.3
Plasma ^e	4.21 y	3.59 x	4.02 xy	2.40 x	5.48 y	3.98	3.90
Liver	10.1y	8.0 x	8.9 xy	4.6 x	13.5 y	8.8	9.2
Raw meat	2.82 y	2.18 x	2.72 y	1.27 x	3.88 y	2.61	2.53
Cooked meat	2.89 y	2.23 x	2.77 y	1.33 x	3.93 y	2.68	2.58
Refrigerated cooked meat	2.80 y	2.07 y	2.65 y	1.27 x	3.75 y	2.53	2.48
Oxidation (TBA value) ^c							
Plasma	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Liver ^f	64	59	57	64 y	55 x	60	60
Raw meat	21	21	23	25	21	22	24
Cooked meat ^g	29	33	27	36 y	23 x	27 x	32 y
Refrigerated cooked meat	778	787	783	808	758	814	751
Susceptibility to oxidation (FOX values) ^d							
Plasma (final LHP) ^d	0.044	0.048	0.045	0.047	0.044	0.046	0.045
Liver (final LHP) ^d	5.72	6.59	5.60	9.23 y	2.71 x	6.24	5.70
Raw meat							
IT ^{eh}	118 [†] z	38 x	89 [†] y	10 x	153 [†] y	88 [†]	75 [†]
MAXLHP ^{eh}	0.41 x	0.71 z	0.55 y	0.84 y	0.28 x	0.55	0.56
TMAX ^e	144 [†] y	96 x	129 [†] y	58 x	188 [†] y	119 [†] x	127 [†] y
AUC ^h	62.2 x	101.4 y	81.4 y	130 y	33.2 x	82.7	80.6
Final LHP ^{eh}	0.29 x	0.52 z	0.41 y	0.56 y	0.25 x	0.39	0.42
Cooked meat							
IT ^{eg}	121.5 [†] y	64.8 [†] x	114 [†] y	16 x	184 [†] y	100 [†]	100 [†]
MAXLHP ^j	0.44 x	0.65 y	0.48 x	0.84 y	0.20 x	0.52	0.52
TMAX ^{gi}	135 [†]	129 [†]	135 [†]	51 x	215 [†] y	132 [†]	134 [†]
AUC ^j	66.5 x	88 y	69 x	130 y	19 x	74	75
Final LHP ^{eg}	0.35 x	0.50 y	0.37 y	0.61 y	0.20 x	0.40	0.41
Refrigerated cooked meat							
IT ^{ef}	120 [†]	61.7	109.6 [†]	14.2 x	180 [†] y	86 [†] x	108 [†] y
MAXLHP	0.38 x	0.63 y	0.43 x	0.79 y	0.17 x	0.51	0.45
TMAX ^g	138 [†] y	109.5 x	135 [†] x	56 x	199 [†] y	123 [†]	132 [†]
AUC	54.4 x	95 y	61.7x	119 y	21.4 x	73.6	67.3
Final LHP	0.25 x	0.47 y	0.29 x	0.54 y	0.14 x	0.37	0.31

Abbreviations used: FSO, fresh sunflower oil; PSO, peroxidized sunflower oil; OSO, oxidized sunflower oil; TA, α -tocopheryl acetate; TBA, thiobarbituric acid; LHP, lipid hydroperoxide; IT, induction time; MAXLHP, maximum LHP value; TMAX, time to reach the MAXLHP; AUC, area under the curve; MDA, malondialdehyde; n.d., not detected.

^a Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (n=36 for feeds, n=48 for plasma, liver and meats).

^b Content of α -tocopherol in feed, liver and meat expressed as mg of α -tocopherol/kg of feed, liver or meat; in plasma expressed as mg of α -tocopherol/L of plasma.

^c TBA value in all plasma samples was under the detection limit (13 μ g of MDA/L of plasma). TBA in liver and meat was expressed as μ g of MDA/kg of liver or meat.

^d FOX values determined in plasma and liver were their final LHP values expressed as mmol CHP eq/L of plasma, or mmol of CHP eq/kg of liver. FOX values determined in meats were their IT (h), MAXLHP (mmol CHP eq/kg of meat), TMAX (h), AUC ([mmol CHP eq/kg of meat] \times h), final LHP value (mmol CHP eq/kg of meat).

^e Interaction between added oil \times TA supplementation significant at $P \leq 0.05$.

^f Interaction between TA \times Zn supplementation significant at $P \leq 0.05$.

^g Interaction between cooking or refrigeration \times TA supplementation significant at $P \leq 0.05$ (n= 96, for the effect of cooking (raw + cooked meats); n=96 for the effect of refrigeration of cooked meat (cooked + refrigerated cooked meats).

^h Interaction between added oil \times Zn supplementation significant at $P \leq 0.05$.

ⁱ Interaction between cooking \times added oil significant at $P \leq 0.05$ (n=96, including raw and cooked meats).

[†] If oxidation had not increased in the samples by the end of reaction time, the final time (216 h) was considered to be the TMAX for these samples. Therefore, some values could be underestimated.

Table 3. Pearson correlation coefficients among the α -tocopherol content, oxidation (TBA value) and susceptibility to oxidation (FOX values) of rabbit plasma (n=48), liver (n=48) and meat (n=48).

	α T plasma	α T liver	α T meat	TBA liver	TBA meat	Final LHP plasma	Final LHP liver	FOX values meat					
								IT meat	MAXLHP meat	TMAX meat	Final LHP meat	AUC meat	
α T plasma	1	0.899**	0.953**	-0.448**	-0.149	-0.307*	0.022	0.802**	-0.816**	0.865**	-0.722**	-0.857**	
α T liver		1	0.916**	-0.226	-0.280*	-0.292*	-0.104	0.810**	-0.830**	0.849**	-0.750**	-0.853**	
α T meat			1	-0.322*	-0.211	-0.311*	-0.003	0.878**	-0.875**	0.896**	-0.803**	-0.887**	
TBA liver				1	-0.075	-0.153	-0.233	-0.216	0.184	-0.260	0.125	0.228	
TBA meat					1	0.165	-0.072	-0.059	0.120	-0.032	0.098	0.125	
Final LHP plasma						1	-0.047	-0.221	0.312*	-0.229	0.265	0.319*	
Final LHP liver							1	-0.031	-0.041	-0.059	-0.047	-0.071	
FOX values meat													
IT meat								1	-0.952**	0.934**	-0.938**	-0.911**	
MAXLHP meat									1	-0.923**	0.977**	0.984**	
TMAX meat										1	-0.850**	-0.934***	
Final LHP meat											1	0.933**	
AUC meat													1

Abbreviations used: TBA, thiobarbituric acid; FOX, ferrous oxidation-xylenol orange; α T, α -tocopherol content; IT, induction time; MAXLHP, maximum LHP value; TMAX, time to reach the MAXLHP; AUC, area under the curve. * P value ≤ 0.05 ; ** P value ≤ 0.001 .

Table 4. Content of α -tocopherol and FOX values of feeds and rabbit plasma, liver and meat depending on the oil added to feeds and supplementation with α -tocopheryl acetate (0 or 100 mg/kg of feed).^a

Added oil ^b	P ^c	0 mg TA/kg			100 mg TA/kg		
		FSO	PSO	OSO	FSO	PSO	OSO
Feed α -tocopherol ^c	0.792	35.2	26.9	38.9	113.7	108.3	115.9
Plasma							
α -tocopherol ^c	0.056	2.82	1.77	2.61	5.60	5.40	5.43
Final LHP ^d	0.233	0.044	0.052	0.045	0.043	0.044	0.045
Liver							
α -tocopherol ^c	0.683	5.65	3.23	4.82	14.6	12.7	13.0
Final LHP ^d	0.672	8.66	10.32	8.72	2.77	2.87	2.48
Raw meat							
α -tocopherol ^c	0.847	1.49	0.90	1.49	4.26	3.55	4.07
IT ^d	0.000	21	0.5	9	216 [†]	75	168 [†]
MAXLHP ^d	0.000	0.74	0.88	0.86	0.08	0.53	0.22
TMAX ^d	0.013	72	45	57	216 [†]	147	201 [†]
AUC ^d	0.057	111	141	138	13	62	24
Final LHP ^d	0.000	0.50	0.58	0.61	0.08	0.46	0.21
Cooked meat							
α -tocopherol ^c	0.520	1.59	0.86	1.56	4.19	3.61	3.98
IT ^d	0.000	27	0.5	21	216 [†]	129 [†]	207 [†]
MAXLHP ^d	0.222	0.79	0.92	0.81	0.10	0.38	0.14
TMAX ^d	0.602	54	45	54	216 [†]	213 [†]	216 [†]
AUC ^d	0.718	119	145	126	14	31	13
Final LHP ^d	0.013	0.59	0.63	0.60	0.10	0.38	0.14
Refrigerated cooked meat							
α -tocopherol ^c	0.669	1.51	0.81	1.48	4.09	3.33	3.81
IT ^d	0.010	24	0.5	18	216 [†]	123	201 [†]
MAXLHP ^d	0.974	0.69	0.94	0.74	0.07	0.32	0.11
TMAX ^d	0.222	60	48	60	216 [†]	171	209 [†]
AUC ^d	0.099	98	152	108	11	38	15
Final LHP ^d	0.922	0.45	0.68	0.48	0.06	0.27	0.10

^a Values given are least square means obtained from multifactor ANOVA (n=48). Interaction between oil added to feeds and α -tocopheryl acetate supplementation significant at $P \leq 0.05$.

^b Oil added to feeds (3%, w/w): FSO – fresh sunflower oil; PSO – peroxidized sunflower oil; OSO – oxidized sunflower oil; TA: α -tocopheryl acetate dietary supplementation (0 or 100 mg/kg of feed).

^c Content of α -tocopherol in feed, liver and meat expressed as mg of α -tocopherol/kg of feed, liver or meat; in plasma expressed as mg of α -tocopherol/L of plasma

^d FOX values determined in plasma and liver were their final LHP values expressed as mmol CHP eq/L of plasma, or mmol of CHP eq/kg of liver. FOX values determined in meats were their IT (h), MAXLHP (mmol CHP eq/kg of meat), TMAX (h), AUC ([mmol CHP eq/kg of meat] \times h), final LHP value (mmol CHP eq/kg of meat).

[†] If oxidation had not increased in the samples by the end of reaction time, the final time (216 h) was considered to be the TMAX for these samples. Therefore, some values could be underestimated.

Table 5. Effect of the level of oxidation of the oil added to feeds and the dietary supplementation with Zn (0 or 200 mg/kg) on the fatty acid composition of raw rabbit meat, its α -tocopherol content and its susceptibility to oxidation^a.

	P	FSO ^b		PSO ^b		OSO ^b	
		0 Zn	200 Zn	0 Zn	200 Zn	0 Zn	200 Zn
Fatty acid composition ^c							
SFA	0.008	830	750	880	780	720	860
MUFA	0.032	580	530	600	530	510	590
n-6 PUFA	0.016	1120	1050	1180	1090	990	1130
n-3 PUFA	0.009	58	54	65	58	54	62
total PUFA	0.016	1180	1100	1240	1150	1050	1190
total <i>trans</i> FA	0.017	14.3	12.2	14.0	12.7	12.3	13.6
α -tocopherol content ^c	0.328	3.05	2.70	2.22	2.23	2.72	2.84
Susceptibility to oxidation (FOX values) ^c							
IT	0.003	120 [†]	117 [†]	30	45	114 [†]	63 [†]
MAXLHP	0.001	0.41	0.42	0.78	0.63	0.46	0.65
TMAX	0.000	147 [†]	141 [†]	72	120	138 [†]	120 [†]
Final LHP	0.000	0.29	0.29	0.56	0.47	0.33	0.49
AUC	0.001	62	63	117	86	69	93

^a Values given are least square means obtained from multifactor ANOVA (n=48). Interaction between oil added to feeds and Zn supplementation significant at P \leq 0.05.

^b Oil added to feeds (3%, w/w): FSO – fresh sunflower oil; PSO – peroxidized sunflower oil; OSO – oxidized sunflower oil.

^c Fatty acid composition (mg of fatty acid/100 g of meat); α -Tocopherol content (mg of α -tocopherol/kg of meat); Susceptibility to oxidation: IT, induction time (h); MAXLHP, maximum LHP value (mmol CHP eq/kg meat); TMAX, time to reach MAXLHP (h); Final LHP, LHP value after 216 h of FOX reaction (mmol CHP eq/kg meat); AUC, area under the curve ([mmol CHP eq/kg of meat] \times h).

[†] If oxidation had not increased in samples by the end of the FOX reaction time, the final time (216 h) was considered the TMAX for these samples. Therefore, some values could be overestimated.

Table 6. Effect of cooking and refrigeration of cooked meat on meat α -tocopherol content, oxidation (TBA value) and oxidative stability (FOX values)^a.

	Raw meat	Cooked meat	Refrigerated cooked meat
α -tocopherol content ^b	2.63	2.63	2.51
Oxidation ^b			
TBA value	23 x	29 y	783 z
Susceptibility to oxidation ^b			
IT	81.7 x	100.1 y	97 y
MAXLHP	0.56	0.52	0.48
TMAX	123 x	133 y	128 y
Final LHP	0.41 y	0.41 y	0.34 x
AUC	82 y	74 x	70 x

^a Values correspond to least-square means obtained from multifactor ANOVA (raw meat vs cooked meat, n=96; cooked meat vs refrigerated cooked meat, n=96).

^b α -Tocopherol content (mg of α -tocopherol/kg of meat); Oxidation assessed by TBA value (μ g MDA/kg of meat); Susceptibility to oxidation assessed by the FOX value: IT, induction time (h); MAXLHP, maximum LHP value (mmol CHP eq/kg meat); TMAX, time to reach MAXLHP (h); Final LHP, LHP value after 216 h of FOX reaction (mmol CHP eq/kg meat); AUC, area under the curve ([mmol CHP eq/kg] \times h).

x,y,z Values in the same row bearing no common letters are statistically different ($P \leq 0.05$). Letters were obtained by means of the Scheffé's test ($\alpha=0.05$).

Table 7. Pearson correlation coefficients among raw meat α T content, TBA and FOX values of raw (n=48), cooked (n=48) and refrigerated cooked meat (n=48).

	α T RM	TBA RM	TBA CM	TBA RCM	FOX values raw meat				FOX values cooked meat				FOX values refrigerated cooked meat			
					IT	TMAX	Final LHP	AUC	IT	TMAX	Final LHP	AUC	IT	TMAX	Final LHP	AUC
α T RM	1	-0.211	-0.614**	-0.179	0.878**	0.896**	-0.803**	-0.887**	0.918**	0.935**	-0.840**	-0.913**	0.887**	0.904**	-0.849**	-0.901**
TBA RM		1	0.109	0.295*	-0.059	-0.032	0.098	0.125	-0.190	-0.257	0.259	0.267	-0.148	-0.171	0.043	0.113
TBA CM			1	-0.085	-0.522**	-0.553**	0.440**	0.539**	-0.603**	-0.580**	0.542**	0.598**	-0.531**	-0.586**	0.542**	0.589**
TBA RCM				1	-0.052	-0.039	0.083	0.050	-0.142	-0.115	0.053	0.016	-0.212	-0.152	0.186	0.153
FOX values RM																
IT					1	0.934**	-0.938**	-0.911**	0.811**	0.818**	-0.819**	-0.824**	0.868**	0.846**	-0.828**	-0.832**
TMAX						1	-0.850**	-0.934***	0.884**	0.882**	-0.797**	-0.869**	0.922**	0.907**	-0.879**	-0.895**
Final LHP							1	0.933**	-0.814**	-0.742**	0.760**	0.734**	-0.807**	-0.786**	0.763**	0.776**
AUC								1	-0.872**	-0.877**	0.792**	0.854**	-0.885**	-0.889**	0.845**	-0.911**
FOX values CM																
IT									1	0.929**	-0.895**	-0.929**	0.912**	0.928**	-0.874**	-0.911**

TMAX	1	-0.811 **	-0.947 **	0.872 **	0.923 **	-0.818 **	-0.903 **
Final LHP		1	0.788 **	-0.856 **	-0.864 **	0.747 **	0.784 **
AUC			1	-0.876 **	-0.912 **	0.805 **	0.883 **
FOX values RCM							
IT				1	0.963 **	-0.912 **	-0.915 **
TMAX					1	-0.890 **	-0.932 **
Final LHP						1	0.970 **
AUC							1

Abbreviations used: RM, raw meat; CM, cooked meat; RCM, refrigerated cooked meat, α T, α -tocopherol content; TBA, thiobarbituric acid; FOX, ferrous oxidation-xylenol orange; LHP, lipid hydroperoxide; IT, induction time; TMAX, time to reach the maximum LHP value; AUC, area under the curve.

* P value ≤ 0.05 ; ** P value ≤ 0.001 .

6. Resultados y Discusión General

6.1. Efectos de la incorporación de diferentes dosis de grasas vegetales ricas en ácidos grasos de la serie n-6 o de la serie n-3 y de la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol sobre la composición en ácidos grasos de plasma, hígado y carne de conejo.

La composición en AG de plasma, hígado y carne de conejo fue modificada según la composición del pienso, tanto por la incorporación de AG procedentes de la dieta como por la alteración de la biosíntesis de determinados AG.

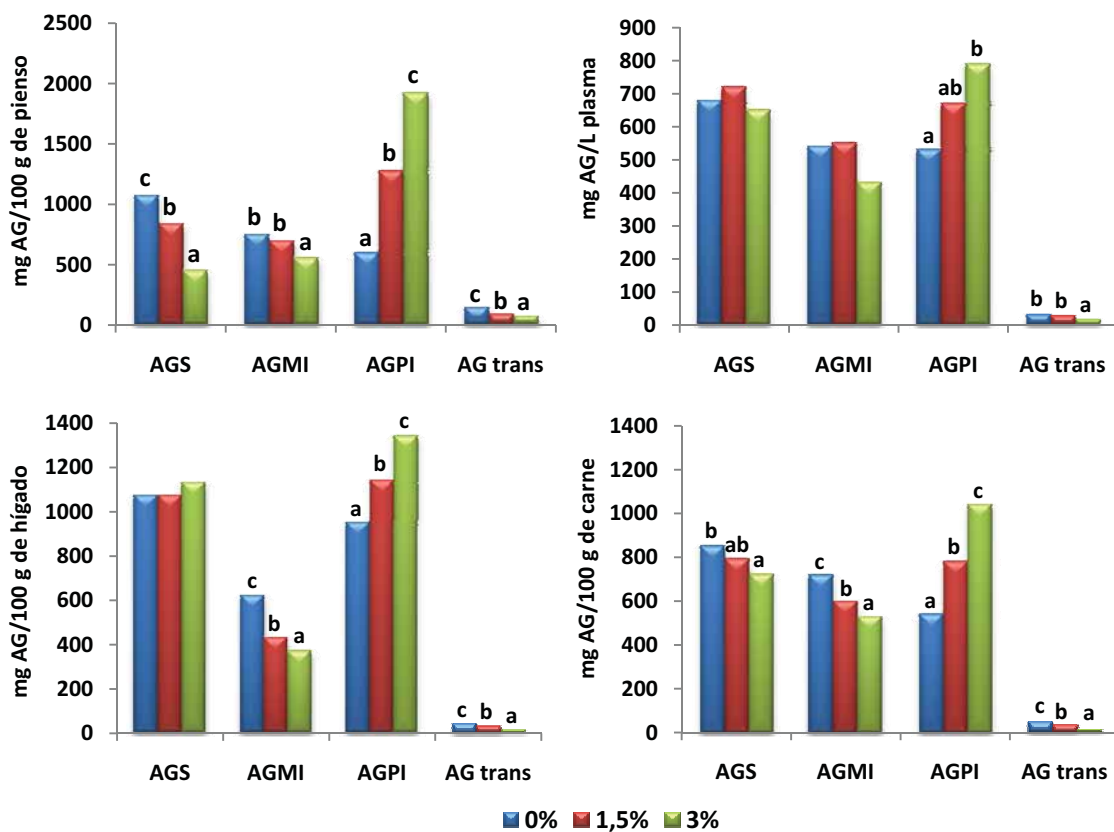


Figura 9. Efecto de la incorporación de aceite vegetal al pienso [0%, 1,5% o 3% (p/p), complementado con grasa animal hasta el 3% (p/p)] sobre el perfil de ácidos grasos de plasma, hígado y carne.

Debido a la función de los diferentes tejidos en el metabolismo del animal, los factores dietéticos estudiados afectaron de forma diferente a la composición de plasma, hígado y carne.

El contenido total de AGMI y AG *trans* (*trans* 18:1, *ditrans*-18:2, *monotrans*-18:2, *ditrans*-CLA y *monotrans*-CLA) en plasma, hígado y carne de conejo se redujo, y el total de AGPI aumentó al ir incorporando aceite vegetal en los piensos en lugar de grasa animal, reflejando así el contenido de estos AG en el pienso (Figura 9). Pero mientras que la reducción en AG *trans* se produjo de forma similar en plasma, hígado y carne, los AGMI en se redujeron de forma más pronunciada en el hígado (40%) que en el plasma (20%) o en la carne (26%).

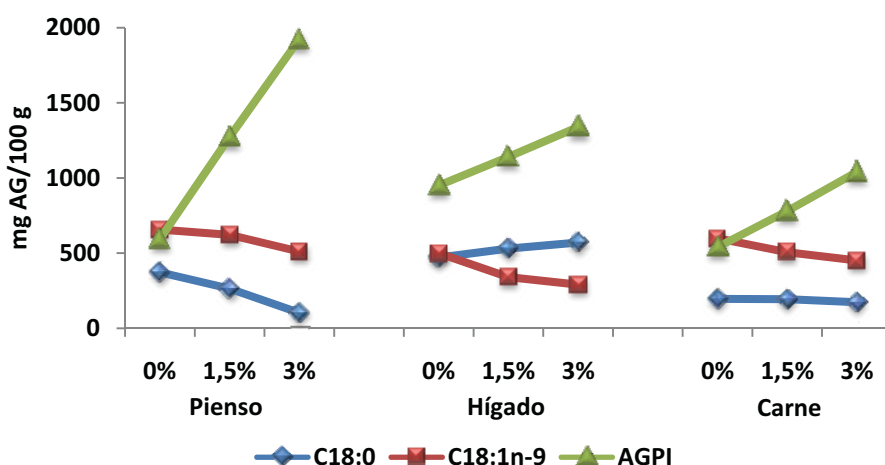


Figura 10. Contenido de C18:0, C18:1n-9 y AGPI en pienso, hígado y carne de conejo según la dosis de aceite vegetal incorporado en pienso (0%, 1,5% o 3% (p/p), complementado con grasa animal hasta el 3%, p/p).

Por otro lado, el contenido en AGS siguió un comportamiento diferente en cada tejido (Figura 9). Al incorporar dosis mayores de aceite vegetal en lugar de grasa animal a los piensos se redujo el total de AGS en carne, tal como lo hacía en los piensos, pero no se modificó ni en plasma ni en hígado. De hecho, el contenido en ácido esteárico varió de forma contraria en hígado que en pienso y carne, aumentando en el hígado y reduciéndose en pienso y carne (Figura 10). Como paralelamente se encontró un

aumento en el contenido de AGPI en el hígado, éstos podrían haber regulado la expresión de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa de acuerdo con lo que han descrito algunos autores (Ntambi, 1992), aumentado así el contenido en ácido esteárico y reduciendo el contenido en ácido oleico. Esta regulación enzimática en el hígado explicaría también que la reducción en el contenido de AGMI en el hígado fuera más pronunciada que en la carne, en la que los AGMI se redujeron en la misma magnitud en que lo hacen en el pienso. El hecho que el hígado esté más implicado en la biosíntesis de los AG que la carne puede haber producido esta alteración en el hígado pero no en la carne. La composición del plasma fue intermedia entre hígado y carne, al ser éste el encargado del transporte y distribución de los AG hacia los tejidos.

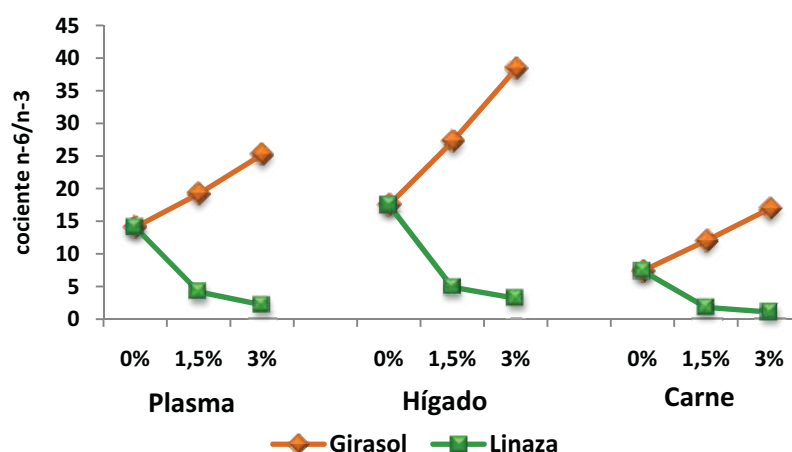


Figura 11. Modificación del cociente n-6/n-3 en plasma, hígado y carne de conejo según la dosis (0%, 1,5% o 3%, complementada con grasa animal hasta el 3%, p/p) y tipo de aceite vegetal (girasol o linaza) incorporado al pienso.

Al no ser detectados los AGPI de cadena larga en los piensos, su presencia en plasma, hígado y carne de conejo se debió a la biosíntesis de estos AG en el animal, a su vez modificada por el tipo de dieta que recibieron los conejos ya que, no sólo el total de AGPI de cadena larga varió al modificar la cantidad de aceite vegetal añadido a los piensos, sino que según la composición de este aceite vegetal (rico en ácido linoleico o en ácido linolénico) también se modificó el tipo de AGPI de cadena larga y así el cociente n-6/n-3 (Figura 11). Este efecto se debe a la modificación de la

biosíntesis de AG por la dieta. La enzima $\Delta 6$ -desaturasa puede desaturar los AG esenciales linoleico y linolénico para dar lugar a AGPI de cadena larga de las series n-6 y n-3 respectivamente. Linoleico y linolénico compiten por esta enzima, que tiene mayor afinidad por el segundo (Burdge et al., 2005b; Arterburn et al., 2006).

Así, el cociente linoleico/linolénico en pienso hizo que el cociente n-6/n-3 en plasma, hígado y carne aumentara a medida que la grasa animal en pienso se reemplazaba por mayores dosis de aceite de girasol, y que se redujera a medida que aumentaba la cantidad de aceite de linaza añadido (Figura 11). La mayor afinidad de la enzima por el linolénico queda demostrada al reemplazar la grasa animal por aceite de linaza cuando se obtuvieron aumentos en el contenido en AGPI n-3 de cadena larga (como el EPA y el DHA) en plasma, hígado y carne de conejo, y reducciones en el contenido de AGPI n-6 de cadena larga (como C22:4n-6 o C22:5n-6), aunque la incorporación de aceite de linaza implicara un aumento en la cantidad de ácido linoleico tanto en pienso como en los tejidos (Figura 12).

Al comparar el contenido de los AGPI en plasma, hígado y carne, se observó que las proporciones de los diferentes AGPI variaban en función del tejido. Mientras que el contenido de ácido linoleico en hígado era 1,5 veces más alto que en carne, el contenido de ácido linolénico era mucho menor en hígado (Figura 12). Este hecho fue encontrado en ambas pruebas en este estudio, y podría atribuirse a una preferencia del hígado para acumular ácido linoleico, a una reducción en el contenido de ácido linolénico debido a su mayor utilización en el hígado para la biosíntesis de AGPI de cadena larga por la $\Delta 6$ -desaturasa (Burdge et al., 2005b), o a una preferente β -oxidación del ácido linolénico frente al linoleico en el hígado (McCloy et al., 2004).

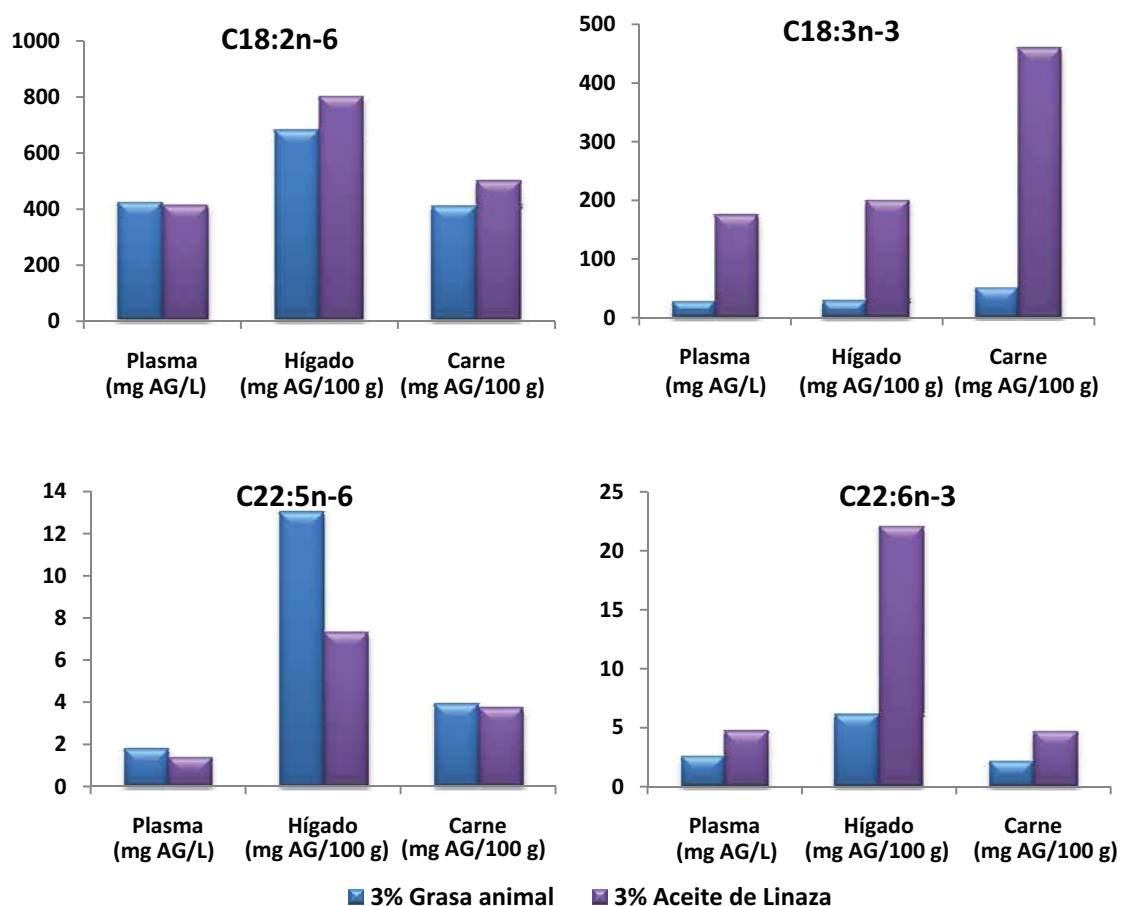


Figura 12. Contenido de C18:2n-6, C18:3n-3, C22:5n-6 y C22:6n-3 en plasma, hígado y carne de conejo según la incorporación de 3% (p/p) de grasa animal o de aceite de linaza al pienso.

En la carne, el contenido de AGPI no sólo se modificó por la dosis y tipo de aceite vegetal añadido a los piensos, sino también por la suplementación de la dieta con AT (Figura 13). Cuando se incorporó simultáneamente un 3% (p/p) de aceite de linaza y 100 mg de AT/kg a los piensos, la carne se enriqueció en AGPI n-3 de cadena larga, pero se redujo el contenido de ácido linolénico. Algunos autores han descrito un incremento en AGPI en carne tras suplementar piensos con AT gracias al papel antioxidante del α T en la carne (Cherian et al., 1996; Castellini et al., 1998; Surai et al., 2000; Dal Bosco et al., 2001; Bou et al., 2006a).

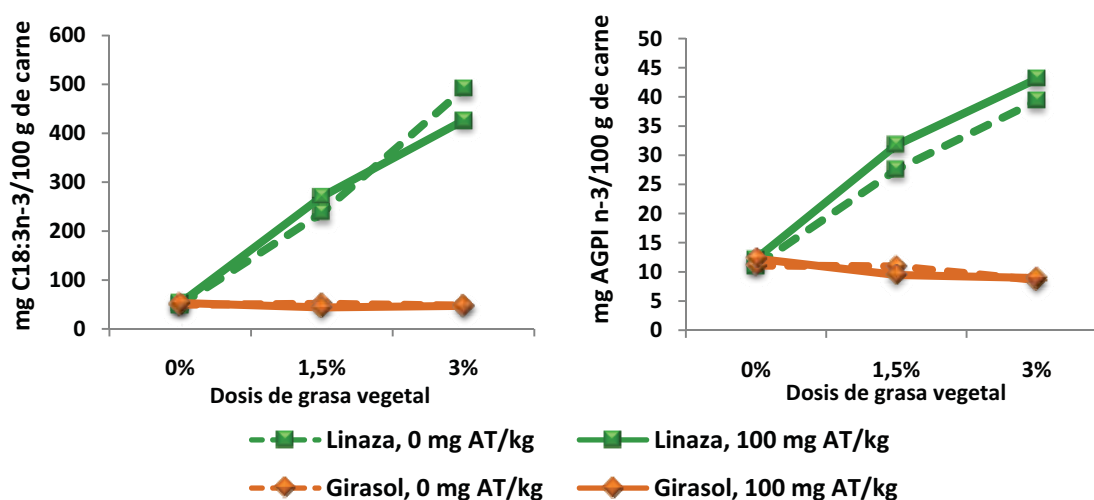


Figura 13. Contenido en ácido linolénico y en ácidos grasos de cadena larga sintetizados a partir de él en carne de conejo según la dosis (0%, 1,5% o 3%, p/p, complementada con grasa animal hasta el 3%, p/p) y tipo de aceite (girasol o linaza) incorporados al pienso, y la suplementación con acetato de α -tocoferol (AT, 0 o 100 mg/kg de pienso).

Esta reducción en el contenido de ácido linolénico indica que este efecto también puede deberse a un aumento de la biosíntesis de los AGPI n-3 de cadena larga. De hecho, la tocoferil quinona, un producto de la degradación del α T, ha sido descrita como cofactor de la enzima Δ 6-desaturasa (Infante, 1999; Surai et al., 2000). La mayor cantidad de α T en la carne tras la suplementación de la dieta con AT proporcionaría mayor cantidad de tocoferil quinona, que junto con el menor cociente linoleico/linolénico cuando se incorpora aceite de linaza en pienso en lugar de girasol o grasa animal, habría favorecido la inducción de la biosíntesis de AGPI n-3 de cadena larga por medio de la Δ 6-desaturasa. Este efecto no se observó ni para los AGPI n-3 de cadena larga ni para los n-6 cuando se incorporó aceite de girasol a los piensos (Figura 13), posiblemente debido a la mayor afinidad de la enzima por el linolénico, y a la menor degradación del α T debido a la menor insaturación en esta carne respecto a la procedente de piensos con aceite de linaza añadido.

Este efecto de la suplementación con AT simultáneamente a la incorporación de aceite de linaza sobre el contenido de AG n-3 en carne (Figura 13) no fue significativo ni en

plasma ni en hígado, aunque se observó la misma tendencia. El hecho que el hígado de los conejos que recibieron piensos sin suplementación con AT tuviera ya un gran contenido en α T y superior que en la carne, junto con que la biosíntesis de AG es en sí misma un proceso metabólico favorecido en el hígado, explicaría la ausencia de esta interacción en el hígado. Otros autores al aumentar la vitamina E en pienso para gallo encontraron aumentos en los AG n-3 en ciertos tejidos pero no en hígado (Surai et al., 2000).

6.2. Efectos de la incorporación de aceites de diferentes niveles de oxidación en pienso de conejo sobre la composición en ácidos grasos de plasma, hígado y carne de conejo.

Los tratamientos térmicos a los que se sometió el aceite de girasol (no refinado) produjeron cambios en la composición y oxidación del aceite (Tabla 7). Así, al calentar el aceite de girasol a 55°C durante 245 horas (aceite peroxidado), aumentó el contenido en compuestos de oxidación primaria, se redujo el contenido en α T y no se modificó su composición en AG.

En cambio, calentar el aceite a 140°C durante 31 horas (aceite oxidado) aumentó el contenido en compuestos de oxidación secundaria, disminuyó de forma significativa la cantidad de linoleico y linolénico, y se formaron algunos AG *trans* como el *c9,t12-18:2*, el *c9,t11-CLA* y *ditrans CLA* (cuantificados como mezcla de isómeros *ditrans*) (Tabla 7). La formación de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico ha sido descrita al calentar aceites por encima de 180°C (Juanéda et al., 2003; Bou et al., 2005b; Destailats et al., 2005). Sin embargo, el aceite de girasol utilizado en este estudio no había sido refinado, por lo que el contenido de estos AG *trans* en el aceite inicial era extremadamente bajo, ya que durante la refinación también se produce la formación de AG *trans*, principalmente durante la desodorización (Schwarz, 2000; Juanéda et al., 2003). De hecho, aunque tras el tratamiento térmico aplicado en este estudio (140°C, 31 horas) aumentara el contenido en AG *trans*, las cantidades

alcanzadas fueron similares a las encontradas por Bou et al. (Bou et al., 2005b) en aceite de girasol refinado antes de ser calentado.

A pesar de que las diferencias encontradas en la composición en AG entre los aceites fueron estadísticamente significativas, no fueron sustanciales en magnitud, lo que llevó a que quedaran atenuadas por la composición de los otros ingredientes del pienso, y por la poca cantidad (3%, p/p) de aceite añadido, obteniéndose así una composición en AG similar entre los piensos ensayados. Esto hizo que, a diferencia de la prueba 1 en la que se consiguió modificar la composición en AG de los tejidos del conejo mediante la utilización de piensos de composición en AG variable, en la prueba 2 no se modificara de forma sustancial la composición en AG en plasma, hígado y carne, aunque se encontraron diferencias significativas para el contenido de *ditrans* CLA en hígado (Tabla 9) y de *t9,c12-18:2* en carne.

Tabla 9. Contenido en *t9,c12-18:2* y de isómeros conjugados del ácido linoleico según la oxidación del aceite incorporado al pienso*

	Aceite		Pienso		Plasma		Hígado		Carne	
	GFR	GOX	GFR	GOX	GFR	GOX	GFR	GOX	GFR	GOX
<i>t9,c12-18:2</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,79	0,84	0,83	0,88	0,23	0,36
<i>c9,t11-CLA</i>	0,17 a	0,30 b	0,75	0,72	tr	0,8	1,06	0,84	0,89	0,74
<i>t10,c12-CLA</i>	0,16	0,23	tr	tr	n.d.	0,2	0,13	0,2	0,25	0,26
<i>ditrans</i> CLA	0,13 a	0,64 b	1,16 a	2,15 b	0,4	0,73	0,64 a	0,83 b	0,62	0,70

Abreviaturas: GFR, Aceite de girasol fresco; GOX, Aceite de girasol oxidado (calentado a 140°C, 31 horas); CLA, ácido linoleico conjugado; *ditrans* CLA, mezcla de isómeros; tr, trazas; n.d., no detectado.

* Aceite, pienso, hígado y carne: mg AG/100 g de muestra; plasma: mg AG/L plasma; en todos los casos los valores corresponden a las medias cuadráticas obtenidas en ANOVA multifactorial (aceite n=18, pienso n=36, plasma, hígado y carne n=48)

a,b Letras diferentes en una fila para un mismo tipo de muestra (aceite, pienso, plasma, hígado o carne) indican diferencias estadísticamente significativas según un ANOVA multifactorial (n=18 para aceites, n= 36 para pienso, n=48 para plasma, hígado y carne).

Esto además indica que la presencia de compuestos de oxidación primaria o secundaria en los aceites añadidos a los piensos al 3% (p/p) no modificó la composición en AG de plasma, hígado o carne de conejo. Pero hay que tener en cuenta que la oxidación alcanzada en el aceite oxidado aunque alta (índice de *p*-Anisidina 124,5, 9,9% polímeros), fue inferior al máximo legal permitido para aceites

calentados en España (25% compuestos polares según B.O.E. 26/1989 de 31 de Enero, que equivaldría aproximadamente a un índice de *p*-Anisidina entre 150-160 y a un 16-18% de polímeros (Boatella et al., 2000)).

Por otro lado, a pesar que el contenido de *ditrans* CLA en pienso fuera superior al de *c9,t11*-CLA y de *t10,c12*-CLA, el *c9,t11*-CLA fue el isómero posicional del ácido linoleico más incorporado en hígado y carne, seguido por el *ditrans* CLA (Tabla 9). Estos resultados concuerdan con el contenido de estos isómeros en hígado y carne de la prueba 1 (Tabla 10), en los que también el *c9,t11*-CLA fue el más incorporado entre los CLA aunque no en todos los piensos fuera el que se encontraba en mayor contenido, como por ejemplo en los tratamientos en los que se incorporó un 3% (p/p) de aceite de linaza.

Tabla 10. Contenido en $t9,c12$ -18:2 y CLA en pienso, hígado y carne según el tipo de grasa incorporada al pienso*

	Pienso (mg AG/100 g)			Hígado (mg AG/100 g)			Carne (mg AG/100 g)		
	ANI	GIR	LIN	ANI	GIR	LIN	ANI	GIR	LIN
$9t12c$ -18:2	1,29	n.d.	n.d.	1,79	1,3	1,7	1,36	0,75	0,9
<i>c9,t11</i> -CLA	3,74	0,93	0,44	3,08	1,1	0,8	2,5	0,96	0,77
<i>t10,c12</i> -CLA	0,66	0,45	0,36	0,26	0,35	0,27	0,39	tr	n.d.
<i>ditrans</i> CLA	2,17	0,9	1,02	4,89	0,61	0,73	0,9	0,5	0,51

Abreviaturas: ANI, 3% (p/p) de grasa animal; GIR, 3% (p/p) de aceite de girasol; LIN, 3% (p/p) de aceite de linaza; CLA, ácido linoleico conjugado; *ditrans* CLA, mezcla de isómeros; n.d., no detectado; tr, trazas.

*Los valores en la tabla corresponden a las medias cuadráticas obtenidas en ANOVA multifactorial (n=36 para pienso, n=48 para hígado y carne).

Esta mayor incorporación de *c9,t11*-CLA puede deberse a una acumulación preferente de este isómero en los tejidos debido a su estructura geométrica ya que, a diferencia de los otros isómeros, posee un doble enlace en la posición $\Delta 9$. Pero también hay que tener en cuenta otros factores como por ejemplo la posible biosíntesis de este isómero por la $\Delta 9$ -desaturasa en los tejidos (Griinari et al., 2000; Gläser et al., 2002; Ostrowska et al., 2003; Lo Fiego et al., 2005; Corino et al., 2007) o por las bacterias intestinales del conejo (de forma similar a como lo sintetizan las bacterias del rumen en rumiantes), pudiendo ser absorbido posteriormente por el conejo gracias a la práctica

de la cecotrofia. De hecho, este isómero ha sido detectado en cecotrofos de conejos alimentados con piensos comerciales (Gómez-Conde et al., 2006). La biosíntesis por las bacterias intestinales y la cecotrofia explicarían también el origen del isómero geométrico *t*9,*c*12-18:2 que pese a no encontrarse ni en los piensos de la prueba 2 (Tabla 9), ni en los piensos que contenían un 3% de aceite vegetal en la prueba 1 (Tabla 10), sí se encontró en plasma, hígado y carne de animales que recibieron dichos piensos. Por otro lado, el contenido preferente de *c*9,*t*11-CLA frente a otros isómeros como el *t*10,*c*12-CLA también se ha relacionado con una mayor β -oxidación de este último (Martin et al., 2000).

La suplementación con AT (100 mg/kg) no modificó la composición en AG en plasma, hígado o carne de conejo. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la prueba 1, en la cual la suplementación con AT sólo afectó al contenido de AGPI de cadena larga cuando el aceite añadido al pienso fue linaza, pero no cuando fue aceite de girasol.

6.3. Composición en Zn, Se, Fe y Cu en carne de conejo tras la suplementación de la dieta con zinc.

La suplementación de la dieta con 200 mg de zinc/kg de pienso no modificó el contenido de Zn, Fe o Se en la carne de conejo (Tabla 11). Hay que tener en cuenta que la dieta basal fue diseñada para cubrir las necesidades nutritivas del animal, incluyendo el Zn, por lo que la suplementación con 200 mg Zn/kg no conllevó un aumento en la concentración de Zn en la carne, ya que éste mineral presenta una homeóstasis regulada por un balance entre absorción y excreción (Food and Nutrition Board, 2000a; Hambidge et al., 2001). Al suplementar pienso de pollo con dosis mayores de Zn tampoco se obtuvieron incrementos en la cantidad de Zn en carne de pollo aunque sí aumentó el Se (Bou et al., 2005a; Bou et al., 2005). A parte de las diferencias entre especies, el hecho que el Zn no modificara el contenido en Se en los conejos puede también estar relacionado con que el pienso base se había suplementado con 0,1 mg/kg de selenito sódico, mientras que en esos estudios en

pollo se utilizó una suplementación con formas orgánicas de Se, que se absorben y se distribuyen de forma más eficiente que el Se inorgánico (Swanson et al., 1991). Incrementos en la concentración de selenio en tejidos animales se han logrado tras suplementar las dietas con selenio orgánico (0,5 mg/kg), sin embargo esto no produjo mejoras en la actividad de la GPx ni en los valores de ATB (Dokoupilová et al., 2007), ya que parece ser que la actividad de la GPx en conejos no deficientes ni en selenio no es tan dependiente de este elemento mineral como en otros animales como las ratas (Cheeke, 1995). De hecho el Se o bien no se añade en el pienso para conejo (Cheeke, 1995), o bien se añade en cantidades muy pequeñas (0,05 mg/kg) para evitar deficiencias en conejos alimentados con pienso durante largos períodos de tiempo (De Blas, 1998).

Tabla 11. Concentración de Zn, Fe, Se y Cu en 100 g de carne de conejo según la suplementación de la dieta con zinc (0 o 200 mg Zn/kg de pienso)

	0 mg Zn/kg	200 mg Zn/kg
Zn (mg)	1,21	1,19
Fe (mg)	0,54	0,54
Se (mg)	9,35	9,33
Cu (µg)	51,5 b	50,1 a

Los valores incluidos en la tabla corresponden a medias cuadráticas obtenidas en un ANOVA multifactorial, n=48.

a,b Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas.

En cambio, la suplementación de la dieta con 200 mg de Zn/kg de pienso redujo de forma significativa el contenido de Cu en la carne de conejo (Tabla 11). Estos resultados concuerdan con reducciones el contenido de Cu y en la actividad de enzimas dependientes de Cu como la ferroxidasa (o ceruloplasmina) o la Cu-Zn superóxido dismutasa, a raíz de la suplementación de la dieta con zinc en dietas que presentan niveles normales de Cu (Fischer et al., 1983; L'Abbe et al., 1984; Yuzbasiyan-Gurkan et al., 1992; Sundaresan et al., 1996; Food and Nutrition Board, 2000a). El origen de este efecto del Zn sobre el Cu se ha atribuido a una inducción de la síntesis de metalotioneína en las células intestinales por el Zn. Esta enzima tiene más afinidad por el Cu, que no pudiendo ser transferido al plasma unido a ella, queda retenido en el enterocito hasta su descamación (Fischer et al., 1981; Yuzbasiyan-

Gurkan et al., 1992). También se han descrito posibles alteraciones en la expresión o en la actividad de las proteínas transportadoras de Cu en los enterocitos por el Zn (Reeves et al., 1998).

6.4. Efecto de la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol sobre el contenido de α -tocoferol en plasma, hígado y carne de conejo.

Al suplementar los piensos con 100 mg de AT por kilo aumentó unas 2,3 veces el contenido de α T en plasma, y unas 3 veces el contenido de α T en hígado y carne de conejo, tanto cuando el pienso llevaba incorporados aceites vegetales de diferente composición (prueba 1), como cuando se habían incorporado aceites de girasol de diferente nivel de oxidación (prueba 2). Además, los hígados procedentes de animales que recibieron suplementación de la dieta con AT presentaron un mayor contenido en α T (alrededor de 13,5 mg α T/kg de hígado) que las carnes (alrededor de 4 mg α T/kg de carne) o el plasma (alrededor de 5,5 mg α T/L de plasma), lo que refleja la capacidad del hígado para almacenarlo.

6.5. Relaciones entre el contenido en α -tocoferol, oxidación y susceptibilidad a la oxidación entre plasma, hígado y carne de conejo.

El contenido de α T varió entre las diferentes muestras biológicas estudiadas, siendo mayor en el hígado, seguido por el plasma y la carne. Este orden se conservó en ambas pruebas, tanto cuando se incorporaron diferentes dosis de aceite vegetal en pienso (prueba 1), como cuando se añadieron aceites oxidados (prueba 2).

Además, en ambas pruebas, el contenido de α T en plasma se correlacionó positiva y significativamente con el contenido de α T en hígado y carne, lo que sugiere que el contenido de α T en plasma de conejo es indicativo del contenido de α T en tejidos.

En este estudio la oxidación en plasma, hígado y carne de conejo se evaluó mediante el índice del ATB, índice con el que se cuantifica la cantidad de MDA presente en las muestras. Por otro lado, se utilizó el índice del naranja de xilenol (conocido como índice FOX), método inducido para evaluar la susceptibilidad a la oxidación de plasma, hígado y carne de conejo.

Los valores del índice de ATB como del índice FOX aumentaron, en ambas pruebas, de acuerdo al contenido de grasa de los tejidos estudiados: plasma, carne e hígado. De hecho en todos los tratamientos el índice del ATB en el plasma fue inferior al límite de detección del método utilizado (13 μ g de MDA/L), lo que puede relacionarse con el elevado contenido en α T en plasma respecto a su contenido en grasa, lo que la protege frente a la oxidación.

Por otro lado, el contenido de α T en plasma mostró correlación negativa en ambas pruebas con el índice FOX en carne, así como con el índice FOX en hígado y el índice del ATB en carne de la prueba 1. Esto sugiere que el contenido de α T en plasma es indicativo del estado oxidativo y de la estabilidad de los tejidos.

Además, en ambas pruebas el contenido de α T en hígado también mostró correlación negativa con el índice del ATB y el índice de FOX en carne. Del mismo modo, el contenido de α T en carne mostró correlación negativa con el índice FOX en carne en ambas pruebas.

En ninguna de las pruebas de este estudio el índice FOX en plasma mostró correlación significativa con el de la carne cruda, ni con el índice del ATB en carne. Tampoco mostró correlación el índice FOX en carne con los índices del ATB en hígado y carne, aunque mantuvieron la misma tendencia unos respecto a los otros en ambas pruebas.

6.6. Contenido en α -tocoferol, oxidación y susceptibilidad a la oxidación de plasma, hígado y carne de conejo según la dosis y tipo de grasa incorporada al pienso.

La incorporación de dosis crecientes de aceite vegetal a los piensos en lugar de grasa animal produjo un aumento en la susceptibilidad a la oxidación de plasma, hígado y carne (índice FOX), y en la oxidación (índice del ATB) de la carne (Figura 14). El índice del ATB en el hígado siguió la misma tendencia. Esto coincidió con una reducción en el contenido de α T en plasma, hígado y carne de conejo (Figura 14).

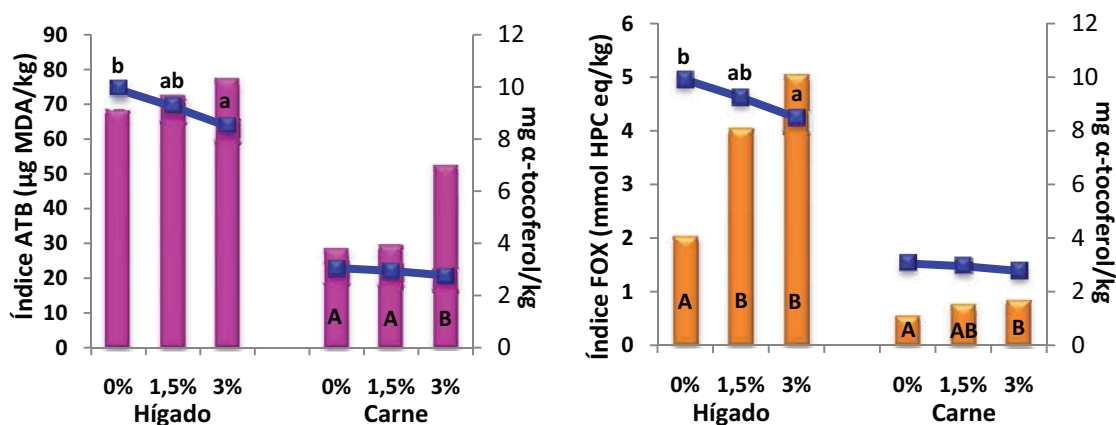


Figura 14. Efecto de la incorporación de aceite vegetal en pienso (0%, 1,5% o 3%, p/p, complementado con grasa animal hasta el 3%, p/p) sobre el contenido en α -tocoferol (en líneas), índice del ATB e índice FOX (HPC, hidroperóxido de cumeno) (en barras) en hígado y carne de conejo.

a,b diferencias significativas entre contenido en α -tocoferol según dosis diferentes en un tejido

A,B, diferencias significativas para el índice de ATB o de FOX en un tejido según dosis diferentes de grasa.

Aunque la susceptibilidad a la oxidación (índice FOX) no se modificó según el tipo de aceite vegetal incorporado al pienso, la oxidación de la carne (índice del ATB) dependió tanto de la dosis como del tipo de aceite vegetal, encontrándose los mayores índices del ATB cuando se utilizó un 3% (p/p) de aceite de linaza (Figura 15). El contenido en α T fue también menor cuando el aceite incorporado era linaza en lugar de girasol (Figura 15). Es más, al incorporar al pienso un 3% (p/p) de aceite de linaza

el contenido de α T en plasma fue significativamente menor (Figura 15). La misma tendencia se encontró en hígado y carne.

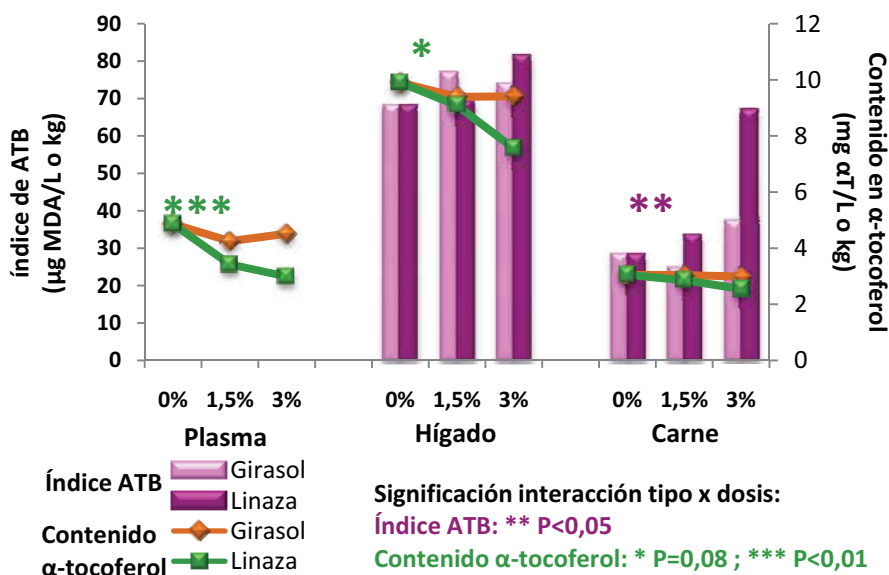


Figura 15. Índice del ATB (en barras) y contenido en α -tocoferol (en líneas) en plasma, hígado y carne de conejo según la dosis (0%, 1,5% o 3%, p/p, complementada con grasa animal hasta el 3%, p/p) y tipo de aceite vegetal (girasol o linaza) incorporado al pienso.

Reducciones en el contenido de α T y aumentos en la oxidación y la susceptibilidad a la oxidación de los tejidos se corresponden no sólo con el aumento en el contenido en AGPI al aumentar la dosis de aceite vegetal incorporado a los piensos, sino con el hecho de que estos AGPI eran más insaturados cuando el aceite añadido fue linaza (Figura 11). El hecho que los ácidos grasos son más susceptibles a oxidarse cuanto más número de insaturaciones presentan (Frankel, 1998) explica la mayor oxidación y susceptibilidad a la oxidación al añadir un 3% (p/p) de aceite de linaza al pienso, lo que llevó a que se perdiera parte del α T en los tejidos debido a su papel antioxidante. Esta pérdida de α T fue por lo tanto mayor cuanto más susceptible a la oxidación era el tejido.

Esta mayor oxidación en la carne procedente de dietas que incluían un 3% (p/p) de aceite de linaza se evitó al suplementar los piensos con 100 mg AT/kg porque hizo

aumentar el contenido en α T en la carne, obteniéndose valores de índice del ATB similares a los obtenidos en los tratamientos que contenían un 3% (p/p) grasa animal, un 3% (p/p) aceite de girasol, o un 1,5% (p/p) aceite de linaza (Figura 16). La misma tendencia, aunque no significativa, se encontró para el índice del ATB en el hígado tras la suplementación de la dieta con AT y la incorporación de un 3% (p/p) de aceite de linaza (Figura 15). En plasma, estos efectos de la suplementación de la dieta con AT (100 mg/kg) en la mejora de la oxidación y de la susceptibilidad a la oxidación, no tuvieron un efecto significativo ya que aunque aumentara su contenido de α T, su elevado cociente α T/grasa hizo que el plasma tuviera unos valores de oxidación muy leves, incluso cuando los animales no habían recibido suplementación de la dieta con AT (Figura 15).

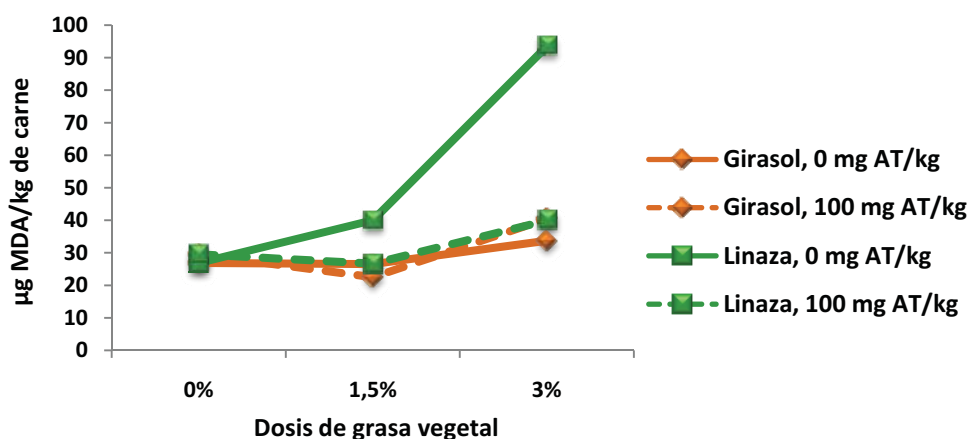


Figura 16. Índice del ATB en carne de conejo según la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) y la dosis y tipo de aceite vegetal incorporado al pienso.

Reducciones en la oxidación y en la susceptibilidad a la oxidación gracias a la suplementación con AT han sido descritas en conejo y otros animales, principalmente tras la incorporación de grasas insaturadas en los piensos (Monahan et al., 1990; Sheehy et al., 1994; Castellini et al., 2001; Dal Bosco et al., 2001; Grau et al., 2001b; Bou et al., 2004b; Lo Fiego et al., 2004). En plasma los efectos se han encontrado cuando el plasma procedente de dietas sin suplementación ya presentaba valores de oxidación considerablemente elevados (Sheehy et al., 1993; Sheehy et al., 1994;

Engberg et al., 1996; Oriani et al., 2001). El efecto de la suplementación con AT tras la incorporación de aceites con diferente nivel de oxidación o de diferentes dosis de grasas vegetales de diferente composición no ha sido estudiado hasta el momento en conejo.

6.7. Contenido en α -tocoferol, oxidación y susceptibilidad a la oxidación de plasma, hígado y carne de conejo tras la incorporación de aceites calentados en piensos.

Al calentar el aceite de girasol a 55°C durante 245 horas se produjo una pérdida en su contenido de α T (Tabla 7). Este menor contenido de α T se mantuvo al incorporar este aceite al 3% (p/p) en los piensos (Figura 17). Esto favoreció que plasma, hígado y carne de conejos alimentados con estos piensos presentaran un menor contenido de α T, y que la carne fuera más susceptible a la oxidación que cuando se incorporó aceite fresco u oxidado a los piensos (Figura 17). Plasma e hígado procedentes de dietas con aceite peroxidado también presentaron una tendencia a mayor susceptibilidad a la oxidación, aunque no fue significativa (Figura 17).

Sin embargo, el menor contenido en α T en el aceite peroxidado pudo no ser el único factor responsable de la disminución en el contenido en α T en plasma, hígado y carne. El aceite peroxidado presentaba un alto contenido en compuestos de oxidación primaria, los que pudieron haber destruido parte del α T tanto en pienso como en el tracto gastrointestinal, reduciendo todavía más el α T absorbible en estas dietas.

Pero a parte de una menor absorción de α T de la dieta, su contenido en tejidos pudo estar también reducido por haberse perdido al reaccionar con productos de oxidación formados en los propios tejidos dando lugar a una mayor susceptibilidad a la oxidación (índice FOX), tal como sucedía en la prueba 1 cuando los tejidos que tenían más AGPI fueron más susceptibles a oxidarse y presentaron menos α T (Figura 14).

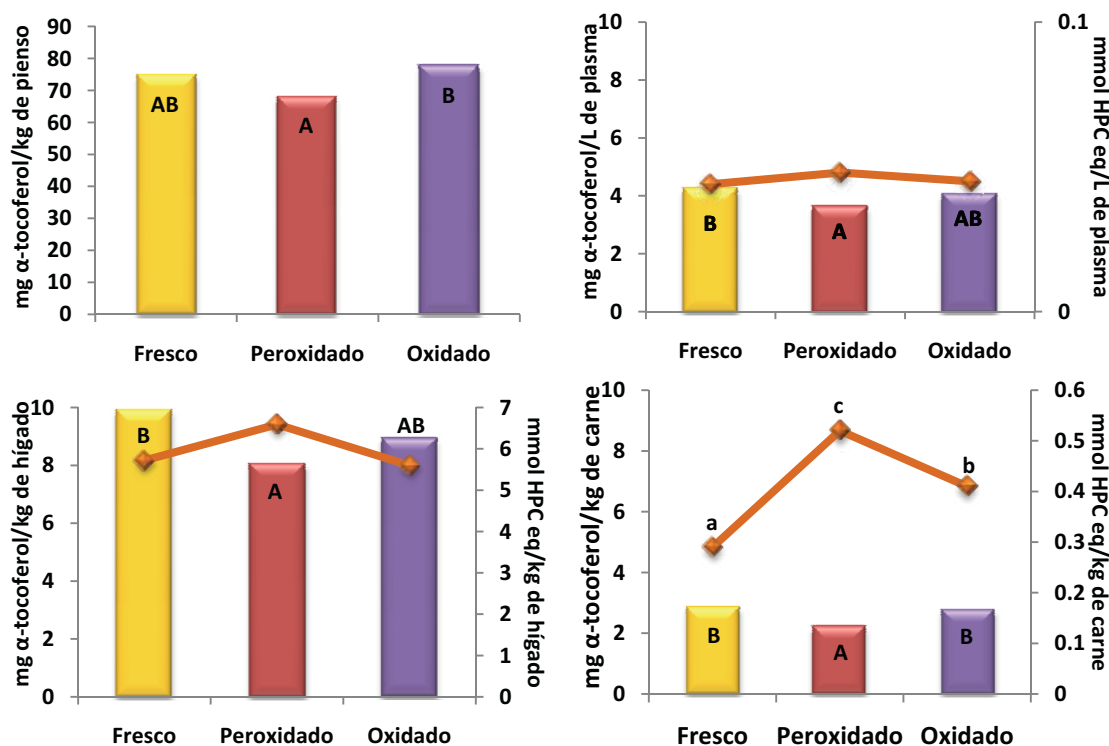


Figura 17. Contenido en α -tocoferol (en barras; diferencias indicadas con A,B) y susceptibilidad a la oxidación (en líneas; diferencias indicadas con a,b,c) en pienso, plasma, hígado y carne de conejo según el nivel de oxidación del aceite añadido al pienso (3%, p/p).

Además hay que tener en cuenta la posible absorción de compuestos de oxidación de la dieta. Parece ser que la absorción directa de compuestos primarios de oxidación es escasa ya que éstos serían previamente transformados en el estómago a compuestos con grupos aldehído, hidroxilo o cetona (Kanazawa et al., 1998). Además, en el caso que los peróxidos lipídicos escapasen de esta modificación estomacal, la GPx intestinal actuaría sobre ellos pasándolos a productos menos reactivos (Aw, 2005). Por lo tanto, la absorción de compuestos de oxidación de la dieta explicaría que aunque los piensos que contenían aceite oxidado tuvieran similar contenido en α T que los que tenían aceite fresco, la carne procedente del pienso con aceite oxidado fuera más susceptible a la oxidación (tal como indicaron en el método FOX inducido el tiempo de inducción, el área bajo la curva, el máximo valor de HPL y el tiempo para alcanzarlo), que la del pienso con aceite fresco. Sin embargo, esto no se tradujo a un mayor índice

del ATB en carnes de tratamientos oxidados en comparación con las de aceite fresco, el cual fue muy bajo en todas las carnes debido a que su contenido en AGPI con más de dos dobles enlaces (de los que deriva el MDA) fue bajo (Esterbauer et al., 1991).

Sin embargo, debido a que el contenido en α T en los piensos ensayados no fue igual, no se puede atribuir a ninguno de estos efectos en particular ni a varios de ellos, ni la reducción en α T en plasma, hígado y carne, ni la mayor susceptibilidad a la oxidación de ésta.

Tal como sucedió en la prueba 1, la suplementación con AT (100 mg/kg) al aumentar el contenido en α T en plasma, hígado y carne, redujo la oxidación (índice del ATB) en hígado y carne (siendo esta vez significativo sólo en hígado) y los hizo también más resistentes a la oxidación inducida (índice FOX).

En la carne (Figura 18), la suplementación de la dieta con AT fue menos efectiva para reducir el índice FOX cuando el aceite incorporado en pienso era girasol peroxidado, que cuando era aceite fresco u oxidado, ya que el índice FOX presentó tiempos de inducción más cortos, alcanzó antes el máximo valor de HPL, y tuvo mayores áreas bajo la curva y HPL finales (Figura 18). De hecho, cuando se incorporó aceite peroxidado a los piensos, aunque estos estuvieran suplementados con AT, la carne alcanzó similares valores finales de HPL tras la inducción aunque de forma más lenta que cuando no había suplementación con AT (Figura 18).

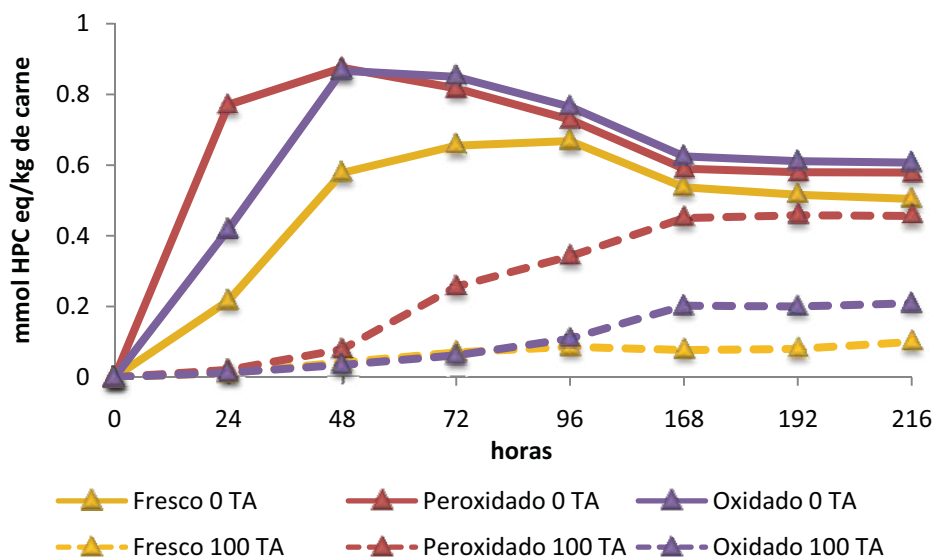


Figura 18. Evolución del índice FOX inducido en carne según el nivel de oxidación del aceite añadido en pienso y la suplementación con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg).

Estos resultados indican que la incorporación en piensos animales de un aceite en el que haya habido una elevada formación de compuestos primarios de oxidación, puede implicar un aumento de la susceptibilidad a la oxidación en los tejidos animales y una pérdida en su contenido en α T, siendo necesaria una suplementación con AT para mejorar su estabilidad oxidativa. Pese a que la presencia de un elevado número de compuestos de oxidación secundaria en el aceite incorporado en pienso también tienda a una mayor susceptibilidad a la oxidación en los tejidos del animal, esta no es tan acusada como en el caso anterior. Sin embargo, hay que tener en cuenta la posible presencia y absorción de otros compuestos formados en el aceite al exponerlo a altas temperaturas, como pudiera darse en un proceso de fritura.

6.8. Efectos de la cocción y de su almacenamiento en refrigeración sobre la composición, oxidación y susceptibilidad a la oxidación de la carne de conejo.

La cocción de la carne de conejo envasada al vacío redujo el contenido en AGPI como el C20:4n-6, C22:5n-6, C20:5n-3 o el C22:6n-3, tanto cuando se llevó a cabo en autoclave durante 36 minutos a 82°C (prueba 1), como por inmersión en baño de agua a 78°C, 5 minutos (prueba 2) (Tabla 12). Sin embargo, la conservación a refrigeración de la carne cocida durante 62 días a 5°C no modificó el contenido de estos AG.

Tabla 12. Efecto de la cocción de la carne de conejo sobre el contenido en ácidos grasos.

	Prueba 1		Prueba 2	
	Cruda	Cocida	Cruda	Cocida
C18:2n-6	550	550	990 b	940 a
C18:3n-6	1,59	1,55	2,02 b	1,85 a
C20:2n-6	7,2	7,1	12,2 b	11,5 a
C20:3n-6	4,7	4,6	6,7 b	6,0 a
C20:4n-6	38 b	34 a	52 b	45 a
C22:5n-6	11,1 b	10,3 a	18,5 b	15,9 a
C22:6n-6	4,4 b	3,8 a	6,6 b	5,5 a
AGPI n-6	610	610	1090 b	1020 a
C18:3n-3	150	140	49 b	44 a
C18:4n-3	0,56 b	0,52 a	0,39 a	0,50 b
C20:3n-3	3,61	3,29	1,30 b	1,14 a
C20:5n-3	2,97 b	2,69 a	0,83 b	0,78 a
C22:5n-3	12,7 b	11,0 a	5,66 b	4,64 a
C22:6n-3	2,66 b	2,34 a	1,89 b	1,47 a
AGPI n-3	170 b	160 a	59 b	53 a

Cocción de la carne envasada al vacío: Prueba 1; en autoclave a 82°C, 36 minutos; Prueba 2, en baño de agua a 78°C, 5 minutos.

Los valores que aparecen en la tabla corresponden a las medias cuadráticas residuales obtenidas de un ANOVA multifactorial (n= 84) en cada una de las pruebas.

a,b Letras diferentes en una misma fila y para una misma prueba indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA multifactorial, n=48 para cada prueba).

La pérdida en AGPI durante la cocción puede atribuirse, tal como ha sido descrito en estudios anteriores (Castellini et al., 1998; Castellini et al., 2001; Dal Bosco et al., 2001; Bou et al., 2006b), a la mayor degradación de los AGPI al ser éstos más oxidables que otros AG como los AGS o los AGMI (Frankel, 1998).

La composición en AG de la carne tras su cocción y posterior almacenamiento en refrigeración estuvo modificada por los factores dietéticos estudiados de la misma forma que la carne cruda. Así, la incorporación de aceite de linaza al pienso de los conejos llevó a un aumento en el contenido de ácido linolénico y de AGPI n-3 de cadena larga como el EPA y el DHA en la carne, hecho que hizo que se obtuviera un cociente n-6/n-3 de 1,8 y de 1,1 cuando se usó aceite de linaza al 1.5% (p/p) y al 3% (p/p) respectivamente, siendo ambas nutricionalmente más favorables que cuando se utilizó aceite de girasol (cociente n-6/n-3 de 12,0 y 16,9 al usarlo al 1,5% (p/p) y al 3% (p/p), respectivamente). De esta forma, 100 g de carne de conejo cocida procedente de pienso al que se incorporó un 1,5% o un 3% (p/p) de aceite de linaza proporcionaron un 10,9% y 18,5% respectivamente de la cantidad diaria recomendada de ácido linolénico (Simopoulos, 2002), y un 1,1% y un 1,5% de la cantidad diaria recomendada de EPA+DHA (Simopoulos, 2002).

La cocción produjo un aumento en el índice del ATB en ambas pruebas (Figura 19), ya que durante la cocción tienen lugar varias transformaciones en la carne que favorecen su oxidación. Entre ellas podemos destacar la ruptura de membranas celulares (hecho que pone en contacto prooxidantes con AGPI que antes se encontraban físicamente separados), la oxidación de la mioglobina, la desnaturalización proteica (que implica la liberación de hierro no hémico, así como una pérdida en la actividad enzimática antioxidante), y la descomposición de los HPL en especies prooxidantes (Gray et al., 1996; Lee et al., 2006; Erickson, 2007).

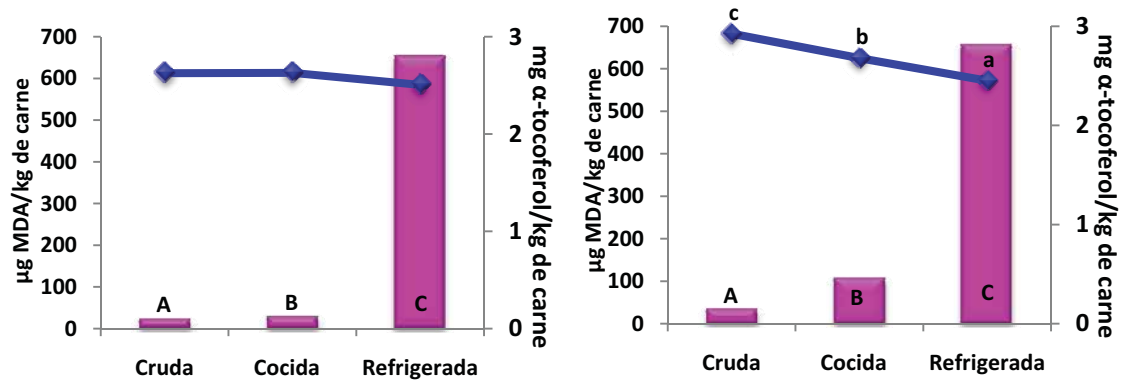


Figura 19. Efecto de la cocción de la carne y de la refrigeración de la carne cocida sobre la oxidación (índice del ATB, en barras, diferencias entre ellas indicadas en cada prueba con A,B,C) y el contenido en α -tocoferol (en líneas, diferencias entre ellas indicadas en cada prueba con a,b,c) en las dos pruebas realizadas.

El aumento en el índice del ATB tras la cocción fue más pronunciado en la prueba 1 que en la 2 (Figura 19), ya que la prueba 1 incluía carne que procedía de conejos alimentados con aceite de linaza presentaba un perfil de AG más insaturado (Figura 11) y por lo tanto más fácilmente oxidable (Frankel, 1998). Además, tal como sucedió en carne cruda (Figura 16), en la prueba 1 el índice del ATB alcanzó valores mayores en la carne cocida correspondiente a los tratamientos que incluían linaza al 3% (p/p) que en la procedente de tratamientos que sólo incluían grasa animal, o en los que ésta era sustituida por aceite de girasol o por linaza al 1,5% (p/p) (Figura 20).

Al comparar el tratamiento 3% (p/p) de aceite de girasol de la prueba 1 con el que incorporaba aceite de girasol sin tratamiento térmico (“aceite fresco”) de la prueba 2, se observa la carne cruda de ambos tratamientos presenta índices del ATB similares (37 y 25 μ g MDA/kg, respectivamente). Sin embargo tras la cocción, el ATB aumentó de forma mucho más pronunciada en la carne de la prueba 1 que en la prueba 2 (103 y 29 μ g MDA/kg, respectivamente). Al presentar estas carnes una composición similar, el diferente aumento del índice del ATB se puede atribuir al tipo de cocción y al tiempo y temperatura aplicados, que fueron mucho más suaves en la prueba 2 que en la 1.

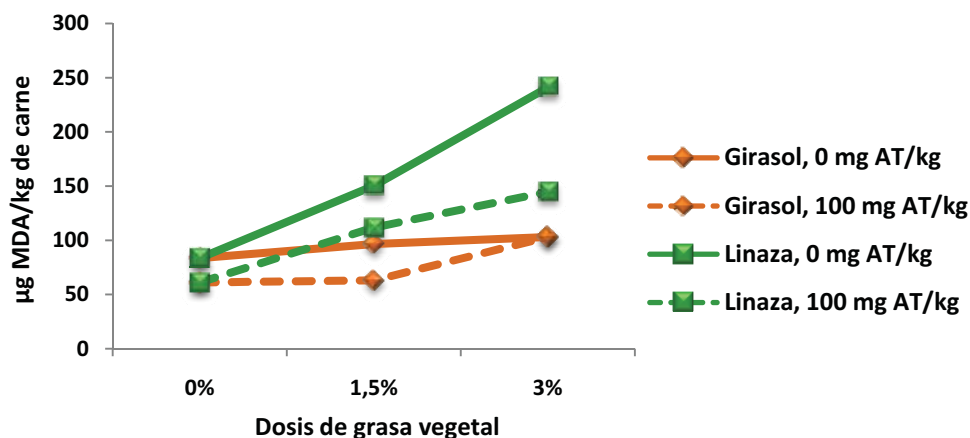


Figura 20. Oxidación de la carne de conejo cocida (índice del ATB) según la dosis (0%, 1,5% y 3%, p/p, complementada con grasa animal hasta el 3%, p/p) y tipo de aceite vegetal (girasol o linaza) y la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (0 o 100 mg/kg de pienso).

De todos modos, estos valores de oxidación en carne cocida siempre fueron inferiores a 300 μg de MDA/kg de carne, valor a partir del cual ha sido descrita la capacidad de detección de sabores a rancio en carne (Bou et al., 2004b; Bou et al., 2005; Campo et al., 2006). Esto hizo que no se encontraran diferencias en las características sensoriales entre las carnes cocidas de los tratamientos con suplementación de la dieta con AT y 3% linaza o 3% girasol (Hernandez et al., 2008). Esta baja oxidación se relaciona con el tipo de cocción realizado, el poco contenido graso de las carnes (alrededor de un 3%), y con su composición en AG, ya que el MDA es un producto de oxidación secundario originado a partir de AG con más de dos dobles enlaces (Esterbauer et al., 1991).

Pero además de las transformaciones sufridas durante la cocción, la estabilidad de la carne depende en gran medida de las condiciones en las que se almacena, entre ellas el tipo de envasado, el tiempo y temperatura de almacenamiento y la exposición a la luz (Kingston et al., 1998; Morrissey et al., 2004; Conchillo et al., 2005). En este estudio, la refrigeración a 5°C durante 62 días de la carne cocida envasada al vacío dio lugar a un aumento considerable en su índice del ATB (Figura 19).

La susceptibilidad a la oxidación medida mediante el índice FOX en la carne cruda y en la carne cocida fue similar, tal como indican el tiempo de inducción, el tiempo del valor HPL máximo y el área bajo la curva (Tabla 13). La oxidación alcanzada por la carne tras su cocción (índice del ATB) correlacionó de forma positiva con la susceptibilidad a la oxidación medida en carne cruda (índice FOX) en ambas pruebas, lo que muestra el interés de esta medida en carne cruda.

Tabla 13. Susceptibilidad a la oxidación evaluada mediante el índice FOX en carne cruda, cocida y cocida almacenada en refrigeración.

	Cruda	Cocida	Cocida refrigerada
TI (h)	81,7 a	100,1 b	97 b
Máximo HPL (mmol HPC eq/kg)	0,56	0,52	0,48
TMAX (h)	123 a	133 b	128 b
HPL final (mmol HPC eq/kg)	0,41 b	0,41 b	0,34 a
ABC ([mmol HPC eq/kg] × h)	82 b	74 a	70 a

Abreviaturas: TI, tiempo de inducción (horas); HPL, hidroperóxidos lipídicos; HPC, hidroperóxido de cumeno; TMAX, tiempo al que se alcanza el máximo valor de HPL; ABC, área bajo la curva.

Tras la refrigeración de la carne cocida, todos los parámetros medidos en el índice FOX fueron similares a los obtenidos en carne cocida antes de refrigerar (Tabla 13), mientras que índice de ATB aumentó de forma considerable (Figura 19). Ello puede explicarse por como avanza la oxidación tras la cocción en estas condiciones de almacenamiento. Pese a que durante la cocción, los cambios producidos en la carne pueden favorecer el desarrollo de la oxidación, la carne siempre estuvo envasada al vacío, tanto durante la cocción como durante el almacenamiento. Esto pudo hacer que el oxígeno disponible para que se desarrollara la oxidación fuera escaso. Así es posible que al estar reducido el oxígeno disponible, la formación de compuestos primarios de oxidación fuera más lenta que su descomposición en compuestos secundarios de oxidación, lo que habría dado lugar a una acumulación de MDA. En cambio, en otros estudios el almacenamiento en congelación de la carne cocida dio lugar a una mayor valor de HPL (Grau et al., 2001b; Conchillo et al., 2005). También durante almacenamientos aeróbicos que al vacío los compuestos primarios de oxidación aumentaron (Conchillo et al., 2005).

El índice FOX medido en carne cruda, en cocida y en cocida refrigerada no correlacionó con el índice de ATB tras la refrigeración de la carne cocida, lo que muestra que las condiciones de almacenamiento tienen una gran repercusión sobre el aumento en el ATB tras la refrigeración, hecho que no pudo ser detectado por la medida del índice FOX en carne cocida.

Por otro lado, tal como sucedió en carne cruda, la incorporación de aceites oxidados a los piensos de conejo no modificó la oxidación de la carne (índice del ATB) ni tras su cocción, ni tras la refrigeración de la carne cocida, mientras que la susceptibilidad a la oxidación (índice FOX) tras los tratamientos de cocción y de refrigeración fue mayor cuando la carne procedía de dietas en las que se añadió aceite peroxidado en comparación con aceite fresco u oxidado. De hecho, estas dos últimas siguieron presentando un contenido en α T mayor que las primeras, tal como sucedió en la carne cruda.

Aunque el contenido en α T disminuyera al cocer (en la prueba 1) éste seguía siendo mayor en las carnes cocidas procedentes de animales que recibieron suplementación con AT (100 mg/kg) (Figura 21). Gracias a ello, tras la cocción de la carne en la prueba 2, la suplementación con AT redujo ligera pero significativamente el índice del ATB (Figura 21). Del mismo modo, en la prueba 1 el índice del ATB en carne cocida procedente de piensos que contenían 1,5% (p/p) aceite de linaza se redujo a valores similares a los obtenidos cuando se usó aceite de girasol (Figura 20). Sin embargo, aunque cuando los piensos contenían un 3% (p/p) de aceite de linaza la suplementación con AT también redujera la oxidación en carne cocida, no lo hizo de forma tan efectiva como en carne cruda (Figura 20).

Pero aunque tras la refrigeración de la carne cocida el contenido en α T siguiera siendo superior en las carnes procedentes de dietas con suplementación con AT (100 mg/kg), éste no pudo evitar que aumentara la oxidación (índice del ATB). Sin embargo, gracias al papel antioxidante del α T, éstas tendieron a presentar un índice del ATB menor (aunque no fuera significativo debido a la variabilidad entre las réplicas tras la refrigeración) que las que no procedían de piensos con AT (Figura 21).

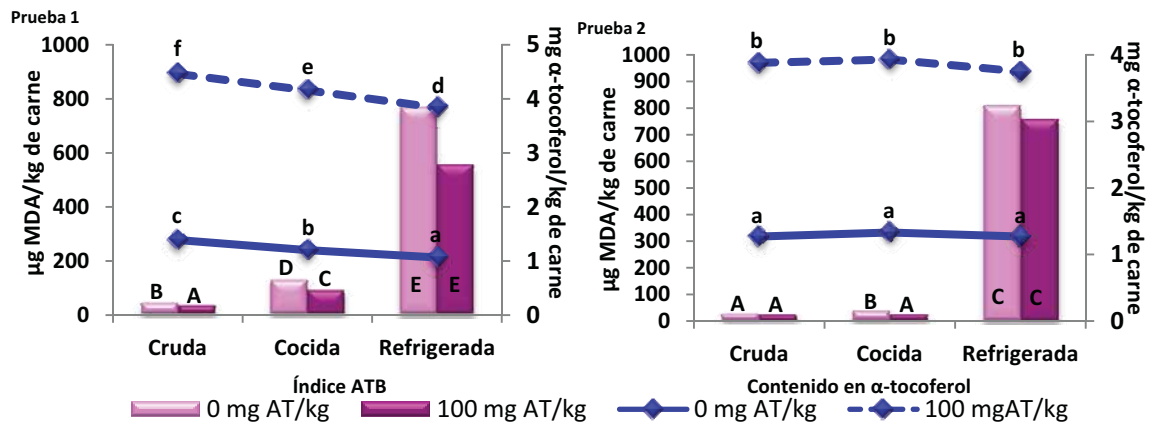


Figura 21. Oxidación (índice del ATB, en barras) y contenido en α -tocoferol en carne de conejo cruda, cocida y cocida refrigerada según la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (0 o 100 mg/kg de pienso). Las letras A,B,C,D,E y a,b,c,d,e,f indican diferencias entre los valores de ATB y contenido en α -tocoferol respectivamente, en cada una de las pruebas)

En ninguna de las dos pruebas de este estudio, la suplementación con AT pudo evitar la pérdida en AGPI al cocer, a diferencia de lo que ha sido descrito en otros estudios en los que se usaron ingredientes de origen marino en pienso (Castellini et al., 1998). A pesar de ello y de que el contenido en α T alcanzado tras la suplementación sólo proporcionara un 2,7% de la cantidad diaria recomendada de α T (Food and Nutrition Board, 2000b), se redujo la oxidación de la carne y aumentó la estabilidad oxidativa principalmente en la carne que presentaba un perfil de AG más insaturado y un menor contenido en α T, lo que demuestra que la suplementación de la dieta con AT contribuye a una mejor calidad nutritiva de la carne y a su estabilidad. De hecho, la suplementación de la dieta con AT ha sido recomendada para proteger el desarrollo de la oxidación en carne y productos cárnicos, así como para mejorar su vida útil y su calidad, principalmente cuando se añaden grasas insaturadas a los piensos (Gray et al., 1996; Wood et al., 1997; Morrissey et al., 2004).

7. Conclusiones

Conclusiones relativas a la incorporación de diferentes dosis y tipos de aceites poliinsaturados en pienso de conejo y la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg):

- La incorporación de dosis crecientes de aceite vegetal implicó un aumento en el contenido en AGPI en plasma, hígado y carne de conejo, obteniéndose un cociente n-6/n-3 inferior a 2 (en la carne) cuando se utilizó aceite de linaza, valor más favorable nutricionalmente que los obtenidos al utilizar grasa animal (7,4) o aceite de girasol (cociente mayor de 12).
- Al incorporar aceite de linaza al pienso aumentó el contenido en ácido linolénico y en AGPI n-3 de cadena larga, como el EPA y el DHA, en plasma, hígado y carne de conejo, con reducciones simultáneas en el contenido en AGPI n-6 de cadena larga. Así, una ración de 100 g de carne proporcionaría un 18,5% de la cantidad diaria recomendada de ácido linolénico, y aunque sólo aportaron un 1,5% de la cantidad diaria recomendada de EPA+DHA, ambos porcentajes fueron mayores que cuando se usó grasa animal (2,3% y 0,46%, respectivamente) o aceite de girasol (2,3% y 0,31%, respectivamente).
- La incorporación de dosis crecientes de aceite vegetal, y especialmente cuando este era aceite de linaza, provocó un aumento en la oxidación de la carne, y en su susceptibilidad a la oxidación que fueron significativamente superiores cuando se utilizó un 3% (p/p) de aceite de linaza.
- La suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) aumentó el contenido en α -tocoferol en plasma, hígado y carne de conejo, y redujo de forma efectiva su oxidación, incluso cuando se incorporó un 3% (p/p) de aceite de linaza. Así, aunque los contenidos de α -tocoferol alcanzados en carne supongan sólo el 2,7% de la cantidad diaria recomendada, se recomienda suplementar los piensos con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) principalmente al incorporar aceites altamente poliinsaturados, como el aceite de linaza, al pienso.

- La suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) cuando se incorporó aceite de linaza al pienso produjo un aumento en los AGPI de cadena larga en la carne de conejo, efecto que podría atribuirse a una inducción de la biosíntesis de estos AGPI.
- El contenido en α -tocoferol en plasma es un buen indicador en el conejo del contenido en α -tocoferol en otros tejidos, y de su estado oxidativo.

Conclusiones relativas a la incorporación de aceites oxidados en pienso para conejo y la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg):

- El calentamiento del aceite de girasol sin refinar a 140°C durante 31 horas produjo una pérdida en el contenido en ácido linoleico y linolénico, así como un leve aumento en su contenido en ácidos grasos *trans* como el c9,t12-18:2, el c9,t11-CLA o los *ditrans* CLA.
- La incorporación en el pienso de aceites (3%, p/p) con un elevado contenido en compuestos de oxidación primaria o secundaria no modificó de forma sustancial la composición en ácidos grasos en plasma y carne de conejo, aunque cuando se incorporó un 3% (p/p) del aceite de girasol calentado a 140°C durante 31 horas, el contenido en *ditrans* CLA en hígado aumentó.
- Al calentar el aceite de girasol a 55°C durante 245 horas, se redujo su contenido en α -tocoferol y aumentó su contenido en compuestos de oxidación primaria. La incorporación de este aceite al 3% (p/p) al pienso de conejo redujo el contenido en α -tocoferol de plasma, hígado y carne de conejo y aumentó su susceptibilidad a la oxidación.
- Cuando el aceite de girasol fue calentado a 140°C durante 31 horas su contenido en compuestos de oxidación secundaria se incrementó, pero permaneció dentro de los límites permitidos actualmente en España para aceites calentados. Su

incorporación a los piensos al 3% (p/p) no modificó el nivel de oxidación en los tejidos del conejo, ni su contenido en α T, aunque sí dio lugar a una mayor susceptibilidad a la oxidación en la carne en comparación con el aceite fresco.

- La suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) redujo la susceptibilidad a la oxidación en hígado y carne de conejo cuando el pienso contenía aceites con un elevado nivel de oxidación.
- La suplementación de la dieta con 200 mg de zinc/kg de pienso no modificó el contenido en Zn, Se o Fe de la carne de conejo, sin embargo, redujo significativamente su contenido en Cu. Esta modificación no afectó a la oxidación de la carne de conejo.

Conclusiones relativas al efecto de la cocción de la carne y su posterior almacenamiento en refrigeración:

- La cocción de la carne (envasada al vacío), ya fuera en autoclave a 80°C durante 35 minutos, o en baño de agua a 78°C durante 5 minutos, así como su posterior conservación a 5°C durante 62 días, produjeron un aumento en la oxidación de la carne, especialmente cuando ésta presentaba un perfil lipídico más insaturado. Este aumento en la oxidación fue más pronunciado durante su conservación en refrigeración.
- La medida de la susceptibilidad a la oxidación de la carne cruda mediante el índice FOX se revela como un excelente sistema de predicción del aumento de la oxidación alcanzado tras la cocción.
- La incorporación de un 1,5% (p/p) de aceite de linaza más un 1,5% (p/p) de grasa animal al pienso suplementado 100 mg de acetato de α -tocoferol por kilo fue la combinación dietética que ofreció una composición en ácidos grasos más favorable nutricionalmente en los tejidos del conejo sin implicar un aumento en su oxidación ni en la carne cruda ni tras la cocción y su refrigeración.

8. Bibliografía

American Heart Association. (2001). Summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health: conference summary from the nutrition committee of the American Heart Association. *Circulation*, 103, 1034-1039.

AOCS. (1998-2008). *Official methods and recommended practices of the American Oils Chemists Society*. 5th edn. AOCS Press. Champaign, IL.

Arterburn, L. M., Hall, E. B., y Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*, 83(6), 1467S-1476S.

Aw, T. Y. (2005). Intestinal glutathione: Determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204(3), 320-328.

Belitz, H. D., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4 ed. Springer. Berlin, Germany.

Bernardini, M., Dal Bosco, A., y Castellini, C. (1999). Effect of dietary n-3/n-6 ratio on fatty acid composition of liver, meat and perirenal fat in rabbits. *Anim Sci*, 68(4), 647-654.

Billek, G. (2000). Health aspects of thermoxidized oils and fats. *Eur J Lipid Sci Technol*, 102(8-9), 587-593.

Block, G. et al. (2008). The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Radic Biol Med*, 45(4), 377-384.

Boatella, J., Codony, R., Rafecas, M., y Guardiola, F. (2000). *Recycled cooking oils: assessment of risks for public health*. European Parliament, Directorate General for Research, Directorate A, the STOA Programme. Luxembourg.

Boletín Oficial del Estado (1989). Orden 2265 de 26 de Enero de 1989 por la que se aprueba la norma de calidad para los aceites y grasas calentados.

Boletín Oficial del Estado (2002). Real Decreto 56/2002, de 18 de Enero por el que se regulan la circulación y utilización de materias primas para la alimentación animal y la circulación de piensos compuestos.

Boletín Oficial del Estado (2003). Real Decreto 465/2003, de 25 de Abril, sobre las sustancias indeseables en la alimentación animal.

Boletín Oficial del Estado (2007). Orden PRE/890/2007 de 2 de abril, por la que se modifica el anexo del Real Decreto 465/2003, de 25 de abril, sobre las sustancias indeseables en nutrición animal.

Botsoglou, N. A., Grigoropoulou, S. H., Botsoglou, E., Govaris, A., y Papageorgiou, G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Sci*, 65(3), 1193-1200.

Bou, R., Codony, R., Baucells, M. D., y Guardiola, F. (2005a). Effect of heated sunflower oil and dietary supplements on the composition, oxidative stability, and sensory quality of dark chicken meat. *J Agric Food Chem*, 53(20), 7792-7801.

- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Baucells, M. D., y Guardiola, F. (2005b). Increase of geometrical and positional fatty acid isomers in dark meat from broilers fed heated oils. *Poult Sci*, 84(12), 1942-1954.
- Bou, R., Grimpa, S., Baucells, M. D., Codony, R., y Guardiola, F. (2006a). Dose and duration effect of alpha-tocopheryl acetate supplementation on chicken meat fatty acid composition, tocopherol content, and oxidative status. *J Agric Food Chem*, 54(14), 5020-5026.
- Bou, R., Grimpa, S., Guardiola, F., Barroeta, A. C., y Codony, R. (2006b). Effects of various fat sources, alpha-tocopheryl acetate and ascorbic acid supplements on fatty acid composition and alpha-tocopherol content in raw and vacuum-packed, cooked dark chicken meat. *Poult Sci*, 85(8), 1472-1481.
- Bou, R., Guardiola, F., Barroeta, A. C., y Codony, R. (2005). Effect of dietary fat sources and zinc and selenium supplements on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult Sci*, 84(7), 1129-1140.
- Bou, R. et al. (2001). Influence of dietary fat source, alpha-tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. *Poult Sci*, 80(6), 800-807.
- Bou, R., Guardiola, F., Padró, A., Pelfort, E., y Codony, R. (2004a). Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS. *J Anal At Spectrom*, 19(10), 1361-1369.
- Bou, R., Guardiola, F., Tres, A., Barroeta, A. C., y Codony, R. (2004b). Effect of dietary fish oil, alpha-tocopheryl acetate, and zinc supplementation on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult Sci*, 83(2), 282-292.
- Budowski, P., Bartov, I., Dror, Y., y Frankel, E. N. (1979). Lipid oxidation products and chick nutritional encephalopathy. *Lipids*, 14, 768-779.
- Burdge, G. C. y Calder, P. C. (2005a). Alpha-linolenic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *Eur J Lipid Sci Technol*, 107, 426-439.
- Burdge, G. C. y Calder, P. C. (2005b). Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev*, 45(5), 581-597.
- Campo, M. M., Nute, G. R., Hughes, S. I., Enser, M., Wood, J. D., y Richardson, R. I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Sci*, 72(2), 303-311.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., y Bernardini, M. (2001). Improvement of lipid stability of rabbit meat by vitamin E and C administration. *J Sci Food Agric*, 81(1), 46-53.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Bernardini, M., y Cyril, H. W. (1998). Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability of raw and cooked rabbit meat. *Meat Sci*, 50(2), 153-161.
- Cheeke, P. R. (1995). *Alimentación y nutrición del conejo*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

- Cherian, G., Wolfe, F. W., y Sim, J. S. (1996). Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poult Sci*, 75(3), 423-431.
- Combe, N., Clouet, P., Chardigny, J., Lagarde, M., y Léger, C. L. (2007). Trans fatty acids, conjugated linoleic acids, and cardiovascular diseases. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109(9), 945-953.
- Conchillo, A., Ansorena, D., y Astiasaran, I. (2005). Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *J Sci Food Agric*, 85(1), 141-146.
- Corino, C. et al. (2007). Influence of dietary conjugated linoleic acids and vitamin E on meat quality, and adipose tissue in rabbits. *Meat Sci*, 76(1), 19-28.
- Dal Bosco, A., Castellini, C., y Bernardini, M. (2001). Nutritional quality of rabbit meat as affected by cooking procedure and dietary vitamin E. *J Food Sci*, 66(7), 1047-1051.
- Dal Bosco, A., Castellini, C., Bianchi, L., y Mugnai, C. (2004). Effect of dietary α -linolenic acid and vitamin E on the fatty acid composition, storage stability and sensory traits of rabbit meat. *Meat Sci*, 66(2), 407-413.
- Dalle Zotte, A. (2002). Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livest Prod Sci*, 75(1), 11-32.
- De Blas, C., y Wiseman, J. (1998). *The nutrition of the rabbit*. CABI Publishing. Cambridge, MA.
- Decker, E. A. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol*, 9(6), 241-248.
- Decker, E. A. (2008). *Antioxidant mechanisms*. En *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3ª ed. C. C. Akoh y D. B. Min., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Decker, E. A. y Xu, Z. M. (1998). Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technol*, 52(10), 54-59.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., y Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metabol Cardio Dis*, 15(4), 316-328.
- DeLany, J. P., Windhauser, M. M., Champagne, C. M., y Bray, G. A. (2000). Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*, 72(4), 905-911.
- Destailats, F. y Angers, P. (2005). Thermally induced formation of conjugated isomers of linoleic acid. *Eur J Lipid Sci Technol*, 107(3), 167-172.
- Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) (2000) DGF Method C-III 3d.
- Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) (2002) DGF method C-VI 6a.

Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (German Society for Fat Science). (2000) Recommendations for Frying Oils. *3rd Symposium on Deep-Fat Frying*, Hagen/Westphalia, Germany.

Dokoupilová, A., Marounek, M., Skřivanová, V., y Březina, P. (2007). Selenium content in tissues and meat quality in rabbits fed selenium yeast. *Czech J. Anim. Sci.*, 52(6), 165-169.

Dunford, H. B. (1987). Free radicals in iron-containing systems. *Free Radical Biol Med*, 3, 405-421.

Engberg, R. M., Lauridsen, C., Jensen, S. K., y Jakobsen, K. (1996). Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets: Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. *Poult Sci*, 75(8), 1003-1011.

Enser, M., Richardson, R. I., Wood, J. D., Gill, B. P., y Sheard, P. R. (2000) Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Sci*, 55 (2): 201-212.

Erickson, M. C. (2007). *Lipid oxidation of muscle foods*. En *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, C. C. Akoh y D. B. Min., CRC Press, Boca Raton, FL,

Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and Genotoxicity of Lipid-Oxidation Products. *Am J Clin Nutr*, 57(5), S779-S786.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., y Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med*, 11 (1): 81-128.

European Communities. (September 5th, 1991). Regulation No 2568/91. *Official Journal of European Community*, L246.

Evans, M. E., Brown, J. M., y McIntosh, M. K. (2002). Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem*, 13(9), 508-516.

Fernandez, C. y Fraga, M. J. (1996). The Effect of Dietary Fat Inclusion on Growth, Carcass Characteristics, and Chemical Composition of Rabbits. *J Anim Sci*, 74(9), 2088-2094.

Firestone, D. (2004). *Regulatory requirements for the frying industry*. En *Frying Technology and Practices*, M. K. Gupta, K. Warner y P. J. White., AOCS Press, Champaign, IL.

Fischer, P. W. F., Giroux, A., y L'Abbe, M. R. (1981). The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am J Clin Nutr*, 34(9), 1670-1675.

Fischer, P. W. F., Giroux, A., y L'Abbe, M. R. (1983). Effects of zinc on mucosal copper binding and on the kinetics of copper absorption. *J Nutr*, 113(2), 462-469.

Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO). (1994). Consultation on fats and oils. Fats and oils in human nutrition. *FAO nutrition Paper*, n° 57 Rome

- Food and Nutrition Board (2000a). *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. The National Academies Press. Washington, DC.
- Food and Nutrition Board (2000b). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. The National Academies Press. Washington, DC.
- Food and Nutrition Board. (2005). *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids (macronutrients)*. The National Academies Press. Washington, DC.
- Food Standards Agency. (2002). *McCance and Widdowson's The Composition of Foods*. 6 th. Cambridge, UK.
- Frankel, E. N. (1998). *Lipid oxidation*. The Oily Press LTD. Dundee, UK.
- Galvin, K., Morrissey, P., y Buckley, D. J. (1997). Influence of dietary vitamin E and oxidised sunflower oil on the storage stability of cooked chicken muscle. *Br Poult Sci*, 38(5), 499-504.
- Gläser, K. R., Wenk, C., y Scheeder, M. R. L. (2002). Effects of feeding pigs increasing levels of C 18:1 trans fatty acids on fatty acid composition of backfat and intramuscular fat as well as backfat firmness. *Arch.Anim.Nutr.*, 56(2), 117-130.
- Gómez-Conde, M. S., Menoyo, D., Chamorro, S., Lopez-Bote, C. J., García-Rebollar, P., y De Blas, J. C. (2006). Conjugated linoleic acid content in cecotrophes, suprarenal and intramuscular fat in rabbits fed commercial diets. *World Rabbit Sci.*, 14(2), 95-99.
- Grau, A., Codony, R., Rafecas, M., Barroeta, A. C., y Guardiola, F. (2000a). Lipid hydroperoxide determination in dark chicken meat through a ferrous oxidation-xylene orange method. *J Agric Food Chem*, 48(9), 4136-4143.
- Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A. C., y Codony, R. (2000b). Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: influence of various parameters. *J Agric Food Chem*, 48(4), 1155-1159.
- Grau, A., Codony, R., Grimpa, S., Baucells, M.D., Guardiola, F. (2001a) Cholesterol oxidation in frozen dark chicken meat: Influence of dietary fat source, and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Meat Sci*, 57(2), 197-208.
- Grau, A., Guardiola, F., Grimpa, S., Barroeta, A. C., y Codony, R. (2001b). Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: influence of dietary fat and alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poult Sci*, 80(11), 1630-1642.
- Gray, J. I., Goma, E. A., y Buckley, D. J. (1996) Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci*, 43: S111-S123.
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., y Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *J Nutr*, 130(9), 2285-2291.

Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., y Savage, G. P. (2002). *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*. AOCS Press. Champaign, IL.

Guardiola, F., Tres, A., Codony, R., Addis, P. B., Bergmann, S. D., y Zavoral, J. H. (2007). Lack of effect of oral supplementation with antioxidants on cholesterol oxidation product concentration of human plasma, as revealed by an improved gas chromatography method. *Anal Bioana Chem*, 389(1), 277-289.

Gutteridge, J. M. C. y Halliwell, B. (1990). The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *Trends Biochem Sci*, 15(4), 129-135.

Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., y Smet, S. (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Sci*, 74(3), 476-486.

Haak, L., Raes, K., Van Dyck, S., y De Smet, S. (2008). Effect of dietary rosemary and α -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration. *Meat Sci*, 78(3), 239-247.

Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd edn. Oxford University Press. Oxford, UK.

Hambidge, M., y Krebs, N. F. (2001) Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: Relevance to dietary zinc requirements. *Annu Rev Nutr*, 21: 429-452.

Harbottle, L. y Schonfelder, N. (2008). Nutrition and depression: A review of the evidence. *J Ment Health*, 17(6), 576-587.

Health and Welfare Canada. (1990). *Nutrition recommendations: the report of the Scientific Review Committee*. Ottawa, Canada.

P. Hernandez y M. Pla. (2008). Effect of the dietary n-3 and n-6 fatty acids on texture properties and sensory characteristics of rabbit meat. En *Book of Abstracts of the 9th World Rabbit Congress* (pp. 1359-1363) Verona, Italy.

Hoz, L. et al. (2003). Effect of dietary linseed oil and alpha-tocopherol on pork tenderloin (Psoas major) muscle. *Meat Sci*, 65(3), 1039-1044.

Infante, J. P. (1999). A function for the vitamin E metabolite alpha-tocopherol quinone as an essential enzyme cofactor for the mitochondrial fatty acid desaturases. *FEBS Lett*, 446, 1-5.

IUPAC. (1992). *Standard method 2508*. En *IUPAC Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives*. 1st supplement to the 7th Ed., Blackwell Science, Oxford, UK.

Juanéda, P., Brac De la Périère, S., Sébédio, J.L., y Grégoire, S. (2003). Influence of Heat and Refining on Formation of CLA Isomers in Sunflower Oil. *JAOCs J Am Oil Chem Soc*, 80(9), 937-940.

- Kanazawa, K. y Ashida, H. (1998). Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. *Biochim Biophys Acta*, 1393(2-3), 349-361.
- Kanazawa, K., Kanazawa, E., y Natake, M. (1985) Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rat. *Lipids*, 20 (7): 412-419.
- Kanner, J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Mol Nutr Food Res*, 51(9), 1094-1101.
- Katsiki, N. y Manes, C. (2009). Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? *Clin Nutr*, 28(1), 3-9.
- Kingston, E. R., Monahan, F. J., Buckley, D. J., y Lynch, P. B. (1998). Lipid oxidation in cooked pork as affected by vitamin E, cooking and storage conditions. *J Food Sci*, 63(3), 386-389.
- Kinsella, J. E., Lokesh, B., y Stone, R. A. (1990). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 52(1), 1-28.
- Kouba, M., Enser, M., Whittington, M., Nute, G. R., y Wood, J. D. (2003) Effect of a high-linolenic acid diet on lipogenic enzyme activities, fatty acid composition, and meat quality in the growing pig. *J Anim Sci*, 81 (8): 1967-1979.
- L'Abbe, M. R. y Fischer, P. W. F. (1984). The effects of high dietary zinc and copper deficiency on the activity of copper-requiring metalloenzymes in the growing rat. *J Nutr*, 114(5), 813-822.
- Ledoux, M., Juanéda, P., y Sébédio, J.L. (2007). Trans fatty acids: Definition and occurrence in foods. *Eur J Lipid Sci Technol*, 109(9), 891-900.
- Lee, S. et al. (2006). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *J Food Sci*, 71(3), C233-C238.
- Lo Fiego, D. P., Macchioni, P., Santoro, P., Rossi, R., Pastorelli, G., y Corino, C. (2005). Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on intramuscular fatty acid composition in rabbit. *Ital J Anim Sci*, 4(SUPPL. 2), 553-555.
- Lo Fiego, D. P. et al. (2004). The effect of dietary supplementation of vitamins C and E on the α -tocopherol content of muscles, liver and kidney, on the stability of lipids, and on certain meat quality parameters of the longissimus dorsi of rabbits. *Meat Sci*, 67(2), 319-327.
- Lopez-Ferrer, S., Baucells, M. D., Barroeta, A. C., y Grashorn, M. A. (1999). n-3 Enrichment of chicken meat using fish oil: alternative substitution with rapessed and linseed oils. *Poult Sci*, 78, 356-365.
- Maertens, L. (1998). Fats in rabbit nutrition: a review. *World Rabbit Sci*, 6, 341-348.
- Marchioli, R. (1999). Dietary supplementation with N-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: Results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*, 354(9177), 447-455.

Maret, W. (2000). The function of zinc metallothionein: A link between cellular zinc and redox state. *J Nutr*, 130(5), 1455S-1458S.

Maret, W. (2009). Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: Redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals*, 22(1), 149-157.

Marquez-Ruiz, G., y Dobarganes, M. C. (1996). *Nutritional and physiological effects of used frying fats*. En *Deep Frying: Chemistry, Nutrition and Practical Applications*, E. G. Perkins y M. D. Erickson., AOCS Press, Champaign, IL.

Marquez-Ruiz, G., Garcia-Martinez, M. C., y Holgado, F. (2008). Changes and effects of dietary oxidized lipids in the gastrointestinal tract. *Lipids Insights*, 2, 11-19.

Martin, J. C. et al. (2000). Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids*, 35(1), 91-98.

McCloy, U., Ryan, M. A., Pencharz, P. B., Ross, R. J., y Cunnane, S. C. (2004). A comparison of the metabolism of eighteen-carbon C-13-unsaturated fatty acids in healthy women. *J Lipid Res*, 45(3), 474-485.

Min, B. y Ahn, D. U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products - A review. *Food Sci Biotechnol*, 14(1), 1-12.

Ministry of Health Labor and Welfare. (1999). *Nutrition requirements for japanese*. 6th edn. Japan.

Monahan, F. J. et al. (1990). Effect of dietary Vitamin E on the stability of raw and cooked pork. *Meat Sci*, 27(2), 99-108.

Morris, M. C. et al. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 60(7), 940-946.

Morrissey, P. A., y Kerry, J. P. (2004). *Lipid oxidation and the shelf-life of muscle foods*. En *Understanding and measuring the shelf-life of food*, R. Steele., CRC Press, Boca Raton, FL.

Morrissey, P. A., Kerry, J. P., y Galvin, K. (2003). *Lipid oxidation in muscle foods*. En *Freshness and shelf life of foods (ACS Symposium Series, 836)*, K. R. Cadawallader y H. Weenen. , American Chemical Society, Washington, DC.

Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J. P., y Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci*, 49, S73-S86.

Muller, A. S., Pallauf, J., y Most, E. (2002). Parameters of dietary selenium and vitamin E deficiency in growing rabbits. *J Trace Elem Med Biol*, 16(1), 47-55.

National Heart Foundation. (1999). Position statement on dietary fats. *Aust J Nutr Diet*, 56 (suppl), S3-S4.

- National Heart Foundation. (2001). Lipid management guidelines. *Med J Australia*, 175 (suppl), S57-S90.
- National Research Council. (1977). *Nutrient requirements of rabbits*. 2nd edn. National Academy Sciences. Washington, DC.
- Navas, J. A., Tres, A., Codony, R., Boatella, J., Bou, R., y Guardiola, F. (2004). Modified ferrous oxidation-xylenol orange method to determine lipid hydroperoxides in fried snacks. *Eur J Lipid Sci Technol*, 106(10), 688-696.
- Niki, E. (2007). Vitamin E function. *Free Radic Biol Med*, 43(10), 1466-1467.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., y Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(1), 668-676.
- Nordic Council of Ministers. (1996). Nordic nutrition recommendations. *Scand J Nutr*, 40, 161-165.
- Ntambi, J. M. (1992). Dietary regulation of stearyl-Coa desaturase-1 gene expression in mouse liver. *J Biol Chem*, 267(15), 10925-10930.
- Nuchi, C. D., Guardiola, F., Bou, R., Bondioli, P., Della Bella, L., y Codony, R. (2009). Assessment of the levels of degradation in fat co- and byproducts for feed uses and their relationship with some lipid composition parameters. *J Agric Food Chem*, 57, 1952-1959.
- Nuernberg, K. et al. (2005) Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. *Meat Sci*, 70 (1): 63-74.
- Oriani, G., Corino, C., Pastorelli, G., Pantaleo, L., Ritieni, A., y Salvatori, G. (2001). Oxidative status of plasma and muscle in rabbits supplemented with dietary vitamin E. *J Nutr Biochem*, 12(3), 138-143.
- Ostrowska, E., Cross, R. F., Muralitharan, M., Bauman, D. E., y Dunshea, F. R. (2003). Dietary conjugated linoleic acid differentially alters fatty acid composition and increases conjugated linoleic acid content in porcine adipose tissue. *Br J Nutr*, 90(5), 915-928.
- Pariza, M. W., Park, Y., y Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*, 40(4), 283-298.
- Powell, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *J Nutr*, 130(5), 1447S-1454S.
- Racanicci, A. M. C., Menten, J. F. M., Regitano-d'Arce, M. A. B., Torres, E. A. F. S., Pino, L. M., y Pedroso, A. A. (2008). Dietary oxidized poultry offal fat: Broiler performance and oxidative stability of thigh meat during chilled storage. *Rev Bras Cienc Avic*, 10(1), 29-35.
- Reeves, P. G., Briske-Anderson, M., y Johnson, L. (1998). Physiologic concentrations of zinc affect the kinetics of copper uptake and transport in the human intestinal cell model, Caco-2. *J Nutr*, 128(10), 1794-1801.

Rhee, K. S. (1988). Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol*, 42, 127-132.

Ruiz, J., Perez-Vendrell, A. M., y Esteve-Garcia, E. (2000). Effect of dietary iron and copper on performance and oxidative stability in broiler leg meat. *Br Poult Sci*, 41(2), 163-167.

Russell, E. A., Lynch, P. B., O'Sullivan, K., y Kerry, J. P. (2004). Dietary supplementation of α -tocopheryl acetate on α -tocopherol levels in duck tissues and its influence on meat storage stability. *Int J Food Sci Technol*, 39(3), 331-340.

Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, J. A., y Millington, K. J. (2007). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*, 20(3), 275-285.

Salas-Salvadó, J., Márquez-Sandoval, F., y Bulló, M. (2006). Conjugated Linoleic acid intake in humans: A systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(6), 479-488.

SanGiovanni, J. P. et al. (2007). The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS report no. 20. *Arch Ophthalmol*, 125(5), 671-679.

Schwarz, W. (2000). Formation of trans polyalkenoic fatty acids during vegetable oil refining. *Eur J Lipid Sci Technol*, 102(10), 648-649.

Sciuto, A. M. (1997). *Antioxidant properties of glutathione and its role in tissue protection*. En *Oxidants, Antioxidants and Free Radicals*, S. I. Baskin y H. Salem., Taylor and Francis, Washington, DC.

P. J. A. Sheehy, P. A. Morrissey y D. J. Buckley y M. Frigg. (1993). Modification of alpha-tocopherol concentration, fatty acid composition and oxidative stability of chick tissues by consumption of fresh or heated sunflower and linseed oils. En *Proceedings of the 11th European Symposium on the Quality of Poultry Meat* (pp. 448-454), Tours, France.

Sheehy, P. J. A., Morrissey, P. A., y Flynn, A. (1994). Consumption of thermally-oxidized sunflower oil by chicks reduces alpha-tocopherol status and increases susceptibility of tissues to lipid oxidation. *Br J Nutr*, 71(1), 53-65.

Siddiqui, R. A., Harvey, K. A., y Zaloga, G. P. (2008). Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health. *J Nutr Biochem*, 19(7), 417-437.

Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, 56(8), 365-379.

Sinn, N. (2008). Nutritional and dietary influences on attention deficit hyperactivity disorder. *Nutr Rev*, 66(10), 558-568.

Spiteller, G. (2006). Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biol Med*, 41(3), 362-387.

- Steinhubl, S. R. (2008). Why Have Antioxidants Failed in Clinical Trials? *Am J Cardiol*, 101(10 SUPPL.)
- Stocker, R. y Keaney Jr., J. F. (2005). New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost*, 3, 1825-1834.
- Sundaresan, P. R., Kaup, S. M., Wiesenfeld, P. W., Chirtel, S. J., Hight, S. C., y Rader, J. I. (1996). Interactions in indices of vitamin A, zinc and copper status when these nutrients are fed to rats at adequate and increased levels. *Br J Nutr*, 75(6), 915-928.
- Suomela, J.P., Ahotupa, M., y Kallio, H. (2005). Triacylglycerol hydroperoxides not detected in pig small intestinal epithelial cells after a diet rich in oxidized triacylglycerols. *Lipids*, 40(4), 349-353.
- Surai, P. F. y Sparks, N. H. C. (2000). Tissue-specific fatty acid and α -tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poult Sci*, 79(8), 1132-1142.
- Swanson, C. A. et al. (1991). Human [74Se]selenomethionine metabolism: A kinetic model. *Am J Clin Nutr*, 54(5), 917-926.
- Tres, A., Bou, R., Codony, C., y Guardiola, F. (2008). Influence of different dietary doses of n-3- or n-6-rich vegetable fats and alpha-tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability. *J Agric Food Chem*, 56, 7243-7253.
- Vivekananthan, D. P., Penn, M. S., Sapp, S. K., Hsu, A., y Topol, E. J. (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: Meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 361(9374), 2017-2023.
- Wahle, K. W. J., Heys, S. D., y Rotondo, D. (2004). Conjugated linoleic acids: Are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res*, 43(6), 553-587.
- Wood, J. D. y Enser, M. (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br J Nutr*, 78(1), S49-S60.
- World Health Organization (WHO). (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases *Technical report series* 916, http://www.who.int/hpr/NPH/docs/who_fao_expert_report.pdf.
- Yanishlieva, N. V., Aitzetmuller, K., y Raneva, V. G. (1998). Beta-carotene and lipid oxidation. *Fett-Lipid*, 100(10), 444-462.
- Yuzbasiyan-Gurkan, V., Grider, A., Nostrant, T., Cousins, R. J., y Brewer, G. J. (1992). Treatment of Wilson's disease with zinc: X. Intestinal metallothionein induction. *J Lab Clin Med*, 120(3), 380-386.

9. Anexos

9.1. Lista de abreviaturas utilizadas

AA	Ácido araquidónico
AG	Ácido graso
AGI	Ácido graso insaturado
AGS	Ácido graso saturado
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
ATB	Ácido tiobarbitúrico
AT	Acetato de α -tocoferol
α T	α -Tocoferol
CLA	Ácido linoleico conjugado
CHP	Hidroperóxido de cumeno
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FOX	Ferrous oxydation-xyleneol orange
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
HPL	Hidroperóxido lipídico
IP	Índice de Peróxidos
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MDA	Malondialdehído
SOD	Superóxido dismutasa

9.2. Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Recomendaciones dietéticas respecto a los ácidos grasos poliinsaturados para adultos sanos.</i>	14
<i>Tabla 2. Principales compuestos de degradación de los ácidos grasos formados en los aceites de fritura y los efectos en el organismo tras su ingestión</i>	28
<i>Tabla 3. Principales efectos biológicos de los productos de oxidación del colesterol</i>	29
<i>Tabla 4. Composición de carne de conejo alimentado con una dieta estándar (por 100 g)</i>	46
<i>Tabla 5. Prueba 1: diseño factorial</i>	66
<i>Tabla 6. Ingredientes y composición de la dieta basal</i>	67
<i>Tabla 7. Tratamiento térmico, composición y variables de oxidación de los aceites de girasol utilizados en la prueba 2</i>	69
<i>Tabla 8. Diseño factorial correspondiente a la prueba 2</i>	70
<i>Tabla 9. Contenido en t9,c12-18:2 y de isómeros conjugados del ácido linoleico según la oxidación del aceite incorporado al pienso</i>	232
<i>Tabla 10. Contenido en t9,c12-18:2 y CLA en pienso, hígado y carne según el tipo de grasa incorporada al pienso</i>	233
<i>Tabla 11. Concentración de Zn, Fe, Se y Cu en 100 g de carne de conejo según la suplementación de la dieta con zinc (0 o 200 mg Zn/kg de pienso)</i>	235
<i>Tabla 12. Efecto de la cocción de la carne de conejo sobre el contenido en ácidos grasos.</i>	245
<i>Tabla 13. Susceptibilidad a la oxidación evaluada mediante el índice FOX en carne cruda, cocida y cocida almacenada en refrigeración.</i>	249

9.3. Lista de Figuras

Figura 1. Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-6 y n-3 _____	10
Figura 2. Esquema de la utilización del ácido linolénico por el hígado _____	11
Figura 3. Estructuras moleculares de un ácido graso saturado (esteárico), uno monoinsaturado (oleico, C18:1n-9), ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, C18:2n-6 y linolénico, C18:3n-3), y ácidos grasos tipo trans (t11-18:1, 9c,11t-CLA y 10t,12c-CLA) _____	12
Figura 4. Esquema de la autooxidación de los ácidos grasos _____	17
Figura 5. Estructura de los tocoferoles y tocotrienoles _____	24
Figura 6. Inactivación de radicales por el α -tocoferol, y su regeneración mediante el ácido ascórbico y el glutatión _____	25
Figura 7. Esquema de los principales factores que influyen sobre la oxidación lipídica en carnes y las reacciones implicadas _____	34
Figura 8. Mecanismo de oxidación lipídica mediada por grupos porfirínicos _____	37
Figura 9. Efecto de la incorporación de aceite vegetal al pienso sobre el perfil de ácidos grasos de plasma, hígado y carne _____	225
Figura 10. Contenido de C18:0, C18:1n-9 y AGPI en pienso, hígado y carne de conejo según la dosis de aceite vegetal incorporado en pienso (0%, 1,5% o 3% (p/p), complementado con grasa animal hasta el 3%, p/p) _____	226
Figura 11. Modificación del cociente n-6/n-3 en plasma, hígado y carne de conejo según la dosis (0%, 1,5% o 3%, complementada con grasa animal hasta el 3%, p/p) y tipo de aceite vegetal (girasol o linaza) incorporado al pienso _____	227
Figura 12. Contenido de C18:2n-6, C18:3n-3, C22:5n-6 y C22:6n-3 en plasma, hígado y carne de conejo según la incorporación de 3% (p/p) de grasa animal o de aceite de linaza al pienso _____	229
Figura 13. Contenido en ácido linolénico y en ácidos grasos de cadena larga sintetizados a partir de él en carne de conejo según la dosis y tipo de aceite (girasol o linaza) incorporados al pienso, y la suplementación con acetato de α -tocoferol _____	230
Figura 14. Efecto de la incorporación de aceite vegetal en pienso sobre el contenido en α -tocoferol, índice del ATB e índice FOX en hígado y carne de conejo _____	238
Figura 15. Índice del ATB y contenido en α -tocoferol en plasma, hígado y carne de conejo según la dosis y tipo de aceite vegetal (girasol o linaza) incorporado al pienso _____	239
Figura 16. Índice del ATB en carne de conejo según la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) y la dosis y tipo de aceite vegetal incorporado al pienso _____	240

Figura 17. Contenido en α -tocoferol y susceptibilidad a la oxidación en pienso, plasma, hígado y carne de conejo según el nivel de oxidación del aceite añadido al pienso (3%, p/p) _____ 242

Figura 18. Evolución del índice FOX inducido en carne según el nivel de oxidación del aceite añadido en pienso y la suplementación con acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) _____ 244

Figura 19. Efecto de la cocción de la carne y de la refrigeración de la carne cocida sobre la oxidación y el contenido en α -tocoferol en las dos pruebas realizadas. _____ 247

Figura 20. Oxidación de la carne de conejo cocida según la dosis y tipo de aceite vegetal (girasol o linaza) y la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (0 o 100 mg/kg de pienso) _____ 248

Figura 21. Oxidación y contenido en α -tocoferol en carne de conejo cruda, cocida y cocida refrigerada según la suplementación de la dieta con acetato de α -tocoferol (0 o 100 mg/kg de pienso) _____ 251

9.4. Comunicaciones a Congresos relacionadas con esta Tesis

Doctoral

Título: Oxidized oils in animal feeding: effects on the composition and oxidation of rabbit meat, liver and plasma.

Autores: Tres A, Codony R, Guardiola F.

Congreso: 6th Euro Fed Lipid Congress – Oils Fats and Lipids in the 3rd millenium: challenges, achievements and perspectives.

Ámbito: Internacional

Entidad organizadora: Euro Fed Lipid

Lugar: Atenas, Grecia

Fecha: Septiembre 2008

Tipo de presentación: Poster

Título: Effect of dietary fat source and alpha-tocopheryl acetate supplementation on the oxidation and alpha-tocopherol levels of rabbit meat, liver and plasma.

Autores: Tres A, Codony R, Guardiola F.

Congreso: 6th Euro Fed Lipid Congress – Oils Fats and Lipids in the 3rd millenium: challenges, achievements and perspectives.

Ámbito: Internacional

Entidad organizadora: Euro Fed Lipid

Lugar: Atenas, Grecia

Fecha: Septiembre 2008

Tipo de presentación: Poster

Título: Oxidized oils in animal feeding: effects on the oxidative stability of rabbit meat.

Autores: Tres A, Nuchi CD, Guardiola F, Codony R.

Congreso: 5th Euro Fed Lipid Congress – Oils, fats and lipids: from science to application.

Ámbito: Internacional

Entidad organizadora: Euro Fed Lipid

Lugar: Gothenburg, Suecia

Fecha: Septiembre 2007

Tipo de comunicación: Poster

Título: Effect of dietary supplementation with different fat sources and doses, and alpha-tocopheryl acetate on the fatty acids composition of raw, cooked and refrigerated rabbit meat.

Autores: Tres A, Bou R, Guardiola F, Codony R.

Congreso: 4th Euro Fed Lipid Congress – Fats, Oils and Lipids for a Healthier Future.

Ámbito: Internacional

Entidad organizadora: Euro Fed Lipid

Lugar: Madrid, España

Fecha: Octubre 2006

Tipo de comunicación: Poster.

Título: The effect of dietary supplementation of alpha-tocopheryl acetate and different oil sources and doses on oxidative stability and alpha-tocopherol levels of raw and cooked meat.

Autores: Tres A, Bou R, Guardiola F, Codony R.

Congreso: 26th World congress and Exhibitions of the ISF. Modern Aspects of Fats and Oils – A Fastinating Source of Knowledge.

Ámbito: Internacional

Entidad organizadora: International Society for Fat Research

Lugar: Praga, República Checa

Fecha: Septiembre, 2005.

Tipo de comunicación: Poster.

9.5. Notificaciones de las Revistas

Sobre la publicación nº 2: “Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and antioxidants: effects on fatty acid composition stability of rabbit plasma, liver and meat”

Dear Prof. Guardiola,

Manuscript number: ANIMAL-08-20723

Title: Dietary n-6- or n-3-rich vegetable fats and antioxidants: effects on fatty acid composition and stability of rabbit plasma, liver and meat.

Editor's decision: Major Revision

Reviewers have now commented on your paper, and you will see there are some changes requested. If you are prepared to undertake the work required the Editor would be pleased to reconsider your paper. The reviewers' comments are appended below along with my comments.

If you decide to revise the work, please submit a response to the reviewers' comments when you submit the revised manuscript detailing how you have dealt with each comment and giving reasons if you disagree with some comments.

Your revision is due by 21 Apr 2009.

To submit a revision, go to <http://animal.edmgr.com/> and log in as an Author. You will be able to find and revise your submission in the 'Submission Needing Revision' folder.

In addition please check your references carefully. Firstly, that they are in the correct format (see Instructions to authors http://www.animal-journal.eu/instructions_to_authors.htm) and secondly that there are no errors or

disparities between the text and reference list or the citation of the reference by checking the View Reference Checking Results which can be found in the Action column when you click on your manuscript.

I look forward to hearing from you.

Kind regards,

Gabriela Gonzalez Mariscal, PhD

Section 3: Physiology & functional biol

On behalf of the Editorial Board

Animal: An International Journal of Animal Bioscience

